

$P < 0.001$  for  $V_c$  values) a closer examination seems recommendable. Comparison of the  $V_i$  values in the crosses and their parent lines shows always a similar or somewhat higher  $V_i$  in the crosses. But the situation for  $V_c$  is less obvious.

The behaviour of this character recalls that of abdominal chaetae<sup>1,2,5</sup> but is clearly different from that of body size, in which  $V_c$  is by far the larger component which when inbred lines are crossed, declines sharply while the mean increases<sup>3</sup>. In number of ovarioles, too,  $V_i$  is several times larger than  $V_c$ <sup>4</sup> but in this character crossing of inbred lines led to a clear decline in  $V_c$  along with an increase in the mean. The expression of  $ci^D$  differs from sternopleural bristles where the relatively high  $V_i$  generally decreases when inbred lines are crossed, while  $V_c$  is unaltered and the mean is intermediate<sup>2,6</sup>.

These contrasts underline the dangers inherent in the *a priori* argument that it must be an advantage for a bilaterally symmetrical organism to have its two sides as similar as possible, and that therefore asymmetry in bilateral characters can be used as a measure of general developmental stability or homeostasis<sup>10</sup>. Each case must be considered on its own merits.

Development in heterozygotes is supposed to be more efficiently buffered against environmental and genetic differences than is development in inbred lines<sup>11</sup>. On the basis of this assumption we should expect that the expression of mutants would tend to regress to wild type when inbred lines were crossed. This is not so, either in our experiments or in those of SONDHI with ocelliless in *Drosophila subobscura*<sup>12</sup>. A possible explanation would be that the greater buffering ability of heterozygotes is only

effective for a certain range and variety of disturbances commonly encountered in populations, but not for mutant effects which greatly transgress the normal levels of variation<sup>13</sup>.

**Zusammenfassung.** In Versuchen mit der Mutante  $ci^D$  von *Drosophila melanogaster* wurden die Komponenten der nichtgenetischen Varianz der Merkmalsausprägung bestimmt durch Einkreuzen von  $ci^D$  in verschiedene Inzuchttämme. Die unabhängige Komponente ( $V_i$ ) für die beiden Flügel ist mehrere Male grösser als die gemeinsame Komponente ( $V_c$ ). Nach Kreuzung zwischen den Inzuchttämmen wurde keine Veränderung der  $V_i$ -Werte und in den Werten der Merkmalsausprägung keine Annäherung an den normalen Phänotypus festgestellt.

W. SCHARLOO

Genetisch Laboratorium der Rijksuniversiteit, Leiden (The Netherlands), January 11, 1963.

<sup>9</sup> F. W. ROBERTSON, J. Genet. 55, 410 (1957).

<sup>10</sup> J. M. THODAY, Heredity 12, 401 (1958).

<sup>11</sup> I. M. LERNER, *Genetical Homeostasis* (Edinburgh 1954).

<sup>12</sup> K. C. SONDHI, J. Genet. 57, 193 (1960).

<sup>13</sup> This paper was written during the tenure of a NATO Science Fellowship awarded to the author by the Netherlands Organisation for the Advancement of Pure Research. The author wishes to thank Prof. C. H. WADDINGTON (Edinburgh) for hospitality in his institute and Dr. F. W. ROBERTSON (Edinburgh) for making available his inbred lines, as well as for helpful discussion.

## Gewinnung von Leukocyten aus Rinderblut unter Verwendung von Wasser als Hämolytikum

Im Verlaufe unserer Untersuchungen über Inhaltsstoffe von präparativ gewonnenen eosinophilen Granulocyten des Pferdeblutes<sup>1</sup> erschien es uns wünschenswert, diese Zellen auch aus Rinderblut zu erhalten.

Voraussetzung für die Isolierung von Eosinophilen ist das Vorhandensein einer Leukocytensuspension<sup>2</sup>. Nur aus Pferdeblut lassen sich derartige Suspensionen ohne weiteres gewinnen, da sich die Erythrocyten infolge Geldrollenbildung schneller absetzen als die Leukocyten. Bei der Durchsicht der Literatur nach Methoden der Abtrennung von weissen Blutzellen aus Vollblut<sup>3-7</sup> stellten wir fest, dass dieses Problem noch keine befriedigende Lösung gefunden hat. Am aussichtsreichsten erschien für unsere Arbeiten die unter anderem von POLL<sup>8</sup> angewandte Methode, die Senkungsgeschwindigkeit der Erythrocyten durch Zusatz von *Gummi arabicum* zu beschleunigen, um ähnliche Verhältnisse wie beim Pferdeblut zu schaffen. Dieses Verfahren führte jedoch bei Rinderblut nicht zum Ziel. Das veranlasste uns, nach einem anderen Weg zu suchen. Die schliesslich von uns gefundene Methode ist einfach. Sie verlangt keinen besonderen apparativen und zeitlichen Aufwand und ermöglicht es, beliebig grosse Blutmengen zu verarbeiten.

**Prinzip.** Wir hämolysieren Citratblut mit einer ausreichenden Menge Wasser und stellen unmittelbar anschliessend durch Zusatz einer entsprechend konzentrierten NaCl-Lösung das isotonische Milieu wieder her.

**Methode.** 1600,0 cm<sup>3</sup> Blut werden in 400,0 cm<sup>3</sup> 3,8%iger Na-Citratlösung aufgefangen und durch Zusatz von 4 l Wasser zur Hämolysen gebracht (Blut: Wasser-Verhältnis

1:2). Man bringt das Citratblut in einen Kunststoffeimer und giesst aus einem zweiten 4 l Wasser hinzu. Durch mehrmaliges Umschütten von Eimer zu Eimer wird für eine gute Durchmischung gesorgt. Dabei ist entsprechend behutsam vorzugehen, um Schädigungen der weissen Blutzellen und störende übermässige Schaumbildung zu vermeiden. Zur Wiederherstellung physiologischer Verhältnisse wird das hämolytische Blut in einen Eimer mit 1 l 4,5%iger NaCl-Lösung (Stammlösung) eingegossen und wie oben durch Umgießen von Eimer zu Eimer gut durchmischt. Beide Arbeitsgänge – Hämolysen und Wiederherstellung der Isotonie – lassen sich leicht in ca. 30 bis 60 sec bewerkstelligen. Auf diese Weise sind die Leukocyten nur kurze Zeit hypotonischen Verhältnissen ausgesetzt. Bei kleineren Blutmengen lässt sich schneller arbeiten. Die angegebene Zeit sollte jedoch nicht unterschritten werden, damit eine ausreichende Hämolysen gesichert ist.

Anstatt mit NaCl-Lösungen bestimmter Konzentration kann man die Isotonie auch mit entsprechend konzentrierten Stammlösungen physiologischer Lösungen wiederherstellen. Diese Stammlösungen müssen die einzelnen

<sup>1</sup> M. BEHRENS und H. R. MARTI, Biochim. biophys. Acta 65, 551 (1962).

<sup>2</sup> M. BEHRENS und M. TAUBERT, Hoppe-Seylers Z. 290, 228 (1952).

<sup>3</sup> P. SZILLÁRD, Pflügers Arch. ges. Physiol. 211, 597 (1926).

<sup>4</sup> R. K. ARCHER, Brit. J. Haemat. 6, 229 (1960).

<sup>5</sup> H. KÖHLER und D. SPRINGER, Zbl. Bakt., I. Abt. 180, 264 (1960).

<sup>6</sup> A. DITTMER, F. H. DOST und H. RIND, Klin. Wschr. 38, 450 (1960).

<sup>7</sup> E. KLEIN, S. ERIDANI, J. DJERASSI und R. RESNICK, Amer. J. clin. Path. 29, 550 (1958).

<sup>8</sup> E. E. POLL, Exper. 7, 138 (1951).

Komponenten in einer solchen Menge enthalten, dass sie zusammen mit dem vorher zur Hämolyse des Blutes zugesetzten Wasser Isotonie ergeben.

Aus dem hämolytischen Blut werden die Leukocyten durch differenziertes Zentrifugieren gewonnen; man zentrifugiert bei möglichst geringer Tourenzahl, um eine Schädigung und Verklumpung der weissen Blutzellen zu vermeiden, bis die Leukocyten zu Boden gegangen sind, die Blutschatten und Blutplättchen sich aber noch grösstenteils in Suspension befinden. Die noch durch der Hämolyse entgangene Erythrocyten rotgefärbten Bodensätze vereinigt man in ca. 100 cm<sup>3</sup> physiologischer NaCl-Lösung und wäscht sie an der Zentrifuge, bis der Bodensatz der Leukocyten nicht mehr oder nur noch gering gefärbt ist. Da man jetzt in kleineren Zentrifugengläsern arbeitet, verringert man die Zentrifugierdauer.

Bei dieser Art des Vorgehens geraten einige Leukocyten, besonders die kleineren Lymphocyten, in die Überstände. Will man auch jene noch erfassen, zentrifugiert man die abgegossenen Überstände zu Boden und wiederholt den oben beschriebenen Vorgang.

Wir benutzen eine Zentrifuge der Fa. Stock, Marburg, des Typs 8 × 350 und zentrifugieren bei der geringstmöglichen Geschwindigkeit (750 Upm entsprechend 800 g) zunächst in Gläsern von 250 cm<sup>3</sup> Inhalt 4 min lang (Anlaufzeit mit eingerechnet) und bremsen anschliessend ab. Die anfallenden Bodensätze werden in 100 cm<sup>3</sup> physiologischer NaCl-Lösung suspendiert und in zwei 50 cm<sup>3</sup> fassenden Gläsern 2 bis 3 min zentrifugiert.

Die von uns nach Hämolyse bei einem Blut:Wasser-Verhältnis von 1:2 gewonnenen Leukocyten aus Rinderblut (normale und leukotische Tiere) phagocytieren gut; sie zeigen im histologischen Bild keinerlei morphologische Veränderungen, und das zahlenmässige Verhältnis der einzelnen Leukocytenarten zueinander entspricht in etwa dem des benutzten Gesamtblutes.

Die geschilderte Methode lässt sich auch auf das Blut anderer Tierarten übertragen. Die zuzusetzende Wassermenge wird ermittelt, indem man eine abgemessene kleine

Menge des zu verarbeitenden Blutes aus einer Bürette mit soviel Wasser vermischt, bis ein ausreichender Hämolysegrad erreicht ist; dieser lässt sich mikroskopisch einfach feststellen.

Die zur Hämolyse benötigte Wassermenge ist beim Menschen und den einzelnen Tierarten sehr unterschiedlich; so beträgt das Blut:Wasser-Verhältnis beim Menschen 1:4, bei der Ziege 1:1.

Wie orientierende Versuche ergaben, liegen die Dinge praktisch so, dass bei manchen Blutarten die angegebene Methode, bei anderen die Verwendung von *Gummi arabicum* oder ähnlichen Zusätzen angebracht ist. Untersuchungen in dieser Richtung sind im Gange. Die beschriebene Methode hat den Vorteil, dass sie alle Leukocytenarten erfasst und sich rasch durchführen lässt; aus letztem Grund verwenden wir sie sogar bei Pferdeblut, bei dem das rasche Sedimentieren der Erythrocyten eine besondere Methode erübrig<sup>9</sup>.

**Summary.** A method is described for separating the white elements of cow's blood. Addition of water causes a complete haemolysis. About 30 sec later, isotonic conditions are restored by admixing appropriate concentrations of physiological solutions. Differential centrifugation follows for separating the leucocytes.

M. BEHRENS und F. ESCH

*Abteilung für Zell- und Gewebechemie am Physiologisch-Chemischen Institut der Justus-Liebig-Universität, Giessen (Deutschland), 26. Februar 1963.*

\* Die histologische Untersuchung der anfallenden Leukocyten wurde freundlicherweise von Herrn Dr. HOFMANN (Medizinische und Gerichtliche Veterinärklinik der Justus-Liebig-Universität) vorgenommen. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung der Arbeiten.

### Theophylline Plasma Levels Following the Oral and Rectal Administration of Theophylline *p*-Aminobenzoate of Piperazine

**Introduction.** Theophylline, whilst being a useful drug in the treatment of bronchial asthma, suffers from two serious disadvantages, namely its low aqueous solubility and its action in causing gastric irritation. In order to overcome or minimize these effects, water soluble derivatives have been prepared which are stable over a wide range of pH. TURNER-WARWICK<sup>1</sup> has studied several such compounds for their effectiveness when taken orally by patients suffering from asthma.

We report here the plasma concentrations of theophylline following the oral and rectal administration of theophylline *p*-aminobenzoate of piperazine (Antalby, Baily Ltd., London).

**Experimental.** All subjects fasted overnight and were allowed no tea or coffee before or during the period in which blood samples were taken. The complex was given as a single dose and samples of venous blood taken immediately prior to administration and at known intervals of time up to 8 h. The blood was taken into sequestrene tubes, centrifuged and the theophylline content determined, using a spectrophotometric method similar to that described by SCHACK and WAXLER<sup>2</sup>. Preliminary investi-

gations showed that quantitative extraction of theophylline into the final solvent occurred and that the other constituents did not interfere with the theophylline determination. A plasma 'blank' was performed on each subject immediately prior to administration and the value obtained used to correct the concentrations calculated for all subsequent samples.

**Results and Discussion.** The theophylline plasma levels obtained from the six subjects are shown in Tables I and II.

With reference to Table I, it is apparent that there is a wide individual variation in response to the drug as measured by the time at which the maximum plasma concentration is reached, although the time taken by any one individual to reach his maximum concentration is approximately constant and independent of the dose received.

There is also a substantial variation between subjects, in the amount of theophylline present in the plasma at these peak concentrations. Unfortunately it was not possible to continue sampling until the plasma level at zero time was regained. In this way it would have been possible to see if the total amount absorbed by each subject was

<sup>1</sup> M. TURNER-WARWICK, Brit. Med. J. 2, 67 (1957).

<sup>2</sup> J. A. SCHACK and S. H. WAXLER, J. Pharmacol. 97, 283 (1949).