

hergestellt ist (vgl. Figur 3, oberer Pfeil). Die Membran Me_2 verschiebt sich nach aussen, bewirkt eine Zunahme des Manometerinnenraumes und erzwingt so das Umkippen des Meniskus. Die Kapillarität macht sich voll wirksam und verursacht den Druckabfall (vgl. Figur 3, unterer Pfeil). Es stellt sich ein Gleichgewicht her zwischen Kapillarität und Manometerdruck $2\sigma/r = -p$. Die Messung kann beliebig wiederholt werden. Unter gleichen Bedingungen erhält man immer wieder die gleiche Druckkurve.

Das Verfahren kann auch umgekehrt angewandt werden. Es kann durch geeignete Me_2 -Stellung bzw. R_2 -Unterdruck der kugelförmige Meniskus mit $\varphi = 0$ hergestellt werden. Durch Umstellung von R_2 auf R_1 erfolgt eine Verschiebung von Me_2 nach innen. Der Meniskus geht dabei in eine Ebene über und das Manometer schlägt nach

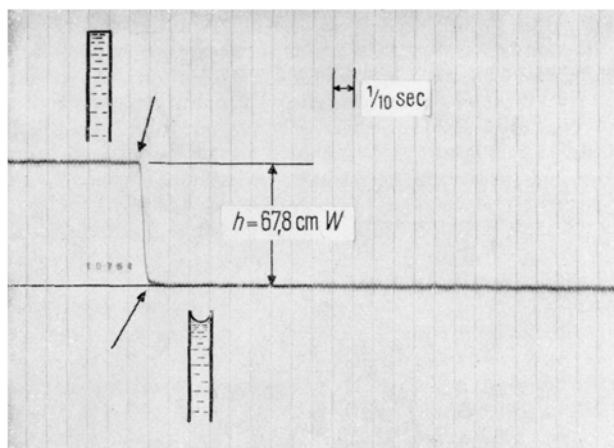


Fig. 3. Druckänderung bei Umkippen des Meniskus aus der Ebene in die Kugelform. – Die bei diesem Versuche benützte Kapillare hatte die Länge $l = 0,753$ cm. Der Radius der oberen Öffnung war $r = 0,00226$ cm, der mittlere Radius, aus dem Durchfluss berechnet, $\bar{r} = 0,00221$ cm. Die Druckhöhe betrug $h = 67,8$ cm. Daraus ergab sich für σ von Wasser bei 18°

$$\sigma = \frac{67,8 \times 0,002235 \times 981 \times 1}{2} = 74,3 \text{ dyn/cm}.$$

Das zu diesem Versuche benützte Manometer besass den Volumelastizitätsmodul $\Delta P/\Delta V = 1,25 \times 10^{10}$ dyn/cm⁵. Beim Einpressen eines Volumens von $0,000001$ cm³ trat eine Druckerhöhung von $12,7$ cm auf.

oben aus. Der negative Kapillardruck steigt zum O-Druck an. Diese Messungsart kann bei konischer Kapillare zur Messung des Durchmessers benützt werden. Der Stab St erlaubt unter mikroskopischer Kontrolle eine genaue Einstellung des Meniskus.

Die Überprüfung der Methode geschah durch Berechnung der Oberflächenspannung σ von Wasser nach Formel 2. Benützt wurden circa 1 cm lange, möglichst regelmässige Kapillaren² mit Innendurchmessern von 30 bis 80 μ . Die Enden dieser Röhrchen wurden mit einem speziellen Verfahren derart geschliffen, dass sie glatte, ebene auf die Achse senkrecht stehende Kreisringe darstellen. Länge und Öffnungsdurchmesser wurden mikroskopisch gemessen. Ferner wurde der mittlere Radius aus dem Durchfluss unter Anwendung der Hagen-Poiseuille'schen Formel berechnet. Unter Benützung verschiedener Kapillaren ergaben sich Werte für σ (Wasser bei 18°), die zwischen 71 und 76 dyn/cm lagen (Kohlrausch gibt 72,8 an). Diese relativ grosse Streuung ist auf die begrenzte Messgenauigkeit des Kapillardurchmessers zurückzuführen.

Aus diesen Untersuchungen geht hervor, dass die Oberflächenspannung auch bei Benützung von Kapillaren mit Durchmessern bis zu 30 μ aus der Kapillaritätsmessung nach Formel 2 berechnet werden kann – Tastversuche mit Kapillaren mit Durchmessern von circa 10 μ deuten darauf hin, dass die Formel auch für diese gültig bleibt. – Da die beschriebene Methode sehr empfindlich und die Einstellzeit sehr kurz ist, eignet sie sich vorzüglich zur Ermittlung von Oberflächen- und Grenzflächenspannungsänderungen bei Milieuänderungen. Über diese Untersuchungen soll später berichtet werden.

Summary. The present paper describes a new method, which permits an accurate determination of capillarity in very narrow and very short capillaries.

A. MÜLLER

Physiologisches Institut der Universität Fribourg (Schweiz), 23. Juli 1963.

² Die Siemens-Werke hatten uns freundlicherweise eine grosse Zahl von Quarzröhrchen, die bei ihrem Elektrokardiographen-Direkt-schreiber verwendet werden, zur Verfügung gestellt. Sie besaßen Längen bis zu 30 cm. Aus diesen konnten sehr gleichmässige Stücke herausgeschnitten werden.

Chromosome Preparations from the Intestinal Mucosa

Techniques for chromosomal analysis have been successfully applied both to the study of different experimental tumours¹⁻³ and to the field of human pathology, especially with regard to some haematological disorders where various chromosomal abnormalities have been observed⁴⁻⁸. In these latter researches chromosomal investigations have been performed mainly on peripheral blood or on bone marrow samples or, in some cases, on the spleen and lymph-nodes also⁹⁻¹¹: that is parenchymatous organs which are easily dissociable into the single cell elements for chromosomal analysis. Other organs have not yet been used extensively for chromosomal studies owing to their structural characteristics. This is the case

of the intestinal tract which quite recently some authors¹² have studied with regard to the chromosome complement of some solid tumours immediately after their surgical excision.

Since the intestinal mucosa is a renewal system with high mitotic index¹³⁻¹⁵ and its involvement during experimental or therapeutic treatment with cytostatic drugs is remarkable, we have examined the possibilities of chromosomal analysis of the intestinal cells. The greatest difficulties which occur during the chromosome preparations from the intestinal mucosa are the removal of the mucous coating of the villi, and the homogeneous separation of the cells. We have observed that a brief treatment with oxidizing substances enables one to remove the mucous coating of the intestinal surface. The villi are easily broken when the oxidizing action is prolonged.

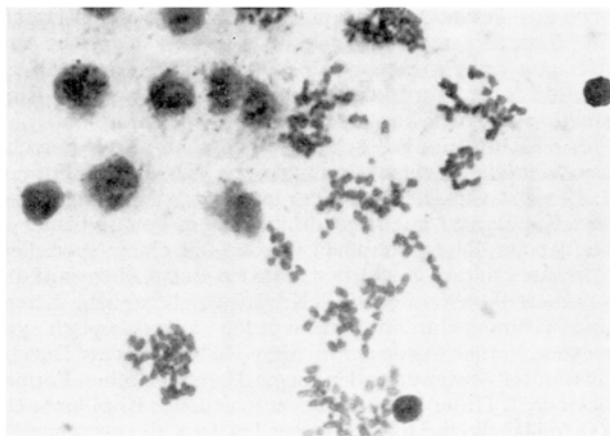


Fig. 1

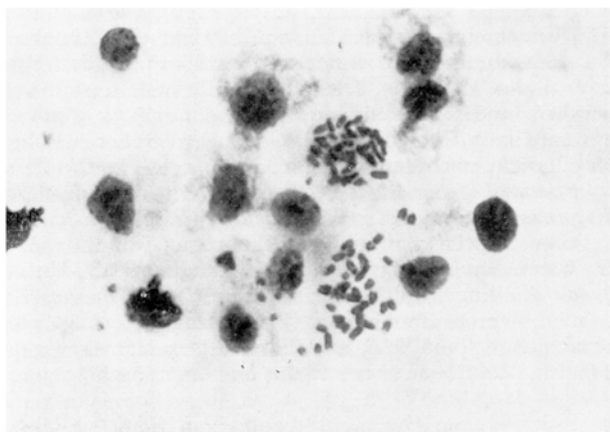


Fig. 2

Metaphases from the intestinal exfoliated cells of the normal mouse (after colchicine, 6 mg/kg).

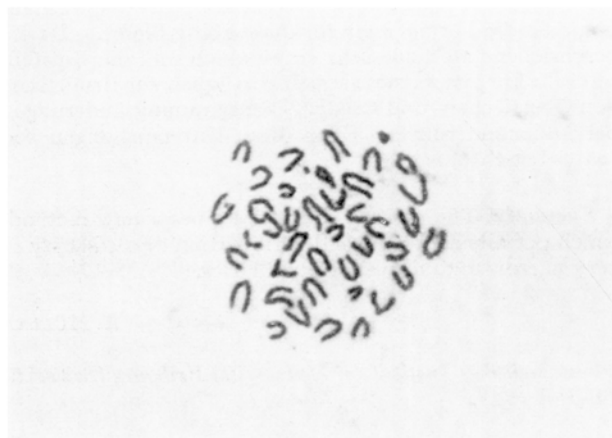


Fig. 3

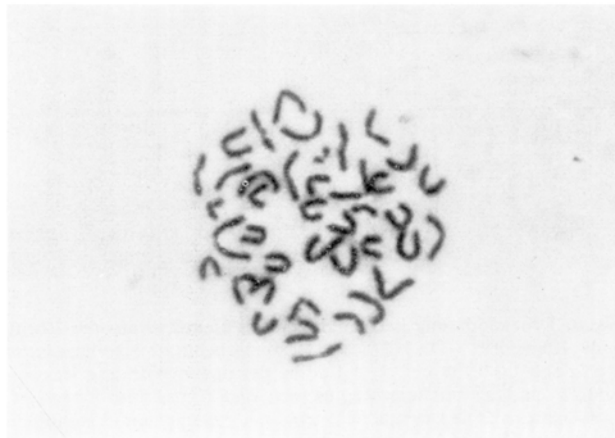


Fig. 4

Metaphases from the small intestine of mouse treated with colchicine (6 mg/kg).



Fig. 5



Fig. 6

Metaphases from the small intestine of mouse treated with Cyclophosphamide (48 h after injection of a lethal dose of Endoxan).

Therefore we have devised a technique based on the previous oxidizing treatment of the intestinal mucosa in order to avoid the cell conglutination through the mucous. The technique combines this new procedure with the usual air-dried preparation.

Technique. (1) Kill the animal (possibly after treatment with colchicine in order to obtain a great number of metaphases) and rapidly remove the intestinal tract. (2) Wash the intestines in saline, open longitudinally and cut into small pieces about 1 cm long. (3) Place the pieces in hypotonic solution (sodium citrate 1% in distilled water) and add H_2O_2 3% (10 drops of H_2O_2 /5 cm³ of hypotonic solution). Shake rapidly for 2-3 min. The mucous coating is thus removed and the solution becomes turbid. This solution is discarded and the pieces are put into a test-tube containing hypotonic solution. (4) Shake again until the solution becomes homogeneally turbid. Then transfer the pieces to a new test-tube containing hypotonic solution and shake again. At this stage the pieces are thin; their histological examination shows a complete exfoliation of the cells. The pieces are discarded and the latter two tubes remain at room temperature for 30-45 min. (5) Then centrifuge and remove the supernatant. Add Carnoy's fixative (alcohol-acetic acid 3:1) and resuspend by shaking. Leave for 10 min and repeat this procedure. (6) Centrifuge and remove all the supernatant, add some drops of fixative and resuspend the cells. (7) Put droplets of the cell suspension with a Pasteur pipette on clean slides and leave to dry thoroughly. (8) Stain with diluted Giemsa.

In the sediment of the 2nd and 3rd tubes, there are normally several mitoses (Figures 1 and 2). This technique has been tried not only with mice, to which colchicine was given (Figures 3 and 4), but also with animals which have been poisoned with different antimetabolic drugs (Cyclophosphamide, Methotrexate) (Figures 5 and 6).

An attempt to identify the type of cell in mitosis has been performed. For the demonstration of the enterochromaffin cells, we have previously treated with formalin (hypotonic solution with 10% formalin) the cell suspension¹⁶. No mitoses were found in the enterochromaffin

cells, while some appeared in goblet cells and the greatest number in the epithelial cells.¹⁷

Zusammenfassung. Es wird eine Technik zur cytogenetischen Untersuchung von Dünndarmzellen beschrieben. Die Arbeit vergleicht Ergebnisse bei der normalen Maus mit solchen bei Tieren, die mittelst verschiedener Cyto-statika vergiftet worden sind.

G. L. CASTOLDI

Istituto di Patologia Medica, Università degli Studi di Ferrara (Italy), Juli 16, 1963.

- ¹ T. S. HAUSCHKA, *Cancer Res.* **21**, 957 (1961).
- ² P. C. NOWELL, S. FERRY, and D. A. HUNGERFORD, *J. Nat. Cancer Inst.* **30**, 687 (1963).
- ³ J. PONTEN, *J. Nat. Cancer Inst.* **30**, 897 (1963).
- ⁴ P. C. NOWELL and D. A. HUNGERFORD, *J. Nat. Cancer Inst.* **27**, 1013 (1960).
- ⁵ A. G. BAIKIE, W. M. COURT BROWN, K. E. BUCKTON, D. G. HARDNEN, P. A. JACOBS, and I. M. TOUGH, *Nature* **188**, 1165 (1960).
- ⁶ A. A. SANDBERG, T. ISHIHARA, L. H. CROSSWHITE, and T. S. HAUSCHKA, *Blood* **20**, 393 (1962).
- ⁷ A. BASERGA, L. BOSI, G. L. CASTOLDI, E. PUNTURIERI, and N. RICCI, *Haematol.* **47**, Suppl. 83 (1962).
- ⁸ G. L. CASTOLDI, N. RICCI, E. PUNTURIERI, and L. BOSI, *Lancet* **i**, 1963, 829.
- ⁹ A. SPRIGGS and M. M. BODDINGTON, *Lancet* **ii**, 1962, 153.
- ¹⁰ N. RICCI, E. PUNTURIERI, L. BOSI, and G. L. CASTOLDI, *Lancet* **ii**, 1962, 564.
- ¹¹ E. PUNTURIERI, L. BOSI, G. L. CASTOLDI, and N. RICCI, *Rif. Med.* **76**, 1047 (1962).
- ¹² H. A. LUBS and R. CLARK, *New Engl. Med. J.* **268**, 907 (1963).
- ¹³ C. P. LEBLOND and B. E. WALKER, *Physiol. Rev.* **36**, 255 (1956).
- ¹⁴ F. D. BERTALANFFY, *Acta anat.* **40**, 130 (1960).
- ¹⁵ A. BASERGA, *Panminerva med.* **2**, 457 (1960).
- ¹⁶ A. G. E. PEARSE, *Histochemistry*. Theoretical and Applied, 2nd Ed. (J. A. Churchill, London 1960), p. 645.
- ¹⁷ We should like to mention that a technique of intestinal cell dispersal in which oxidised ascorbic acid is used, has recently been applied for other purposes by W. K. COWAN, *J. Path. Bact.* **84**, 439 (1962).

A Simple Method for Separation and Determination of Aldosterone, Hydrocortisone and Corticosterone

Several methods for determination of aldosterone have been described. Most of them use paper chromatography¹⁻⁴ or column chromatography combined with paper chromatography^{5,6} for separation of the steroids after extraction from biological fluids. The method to be described here makes use of thin-layer chromatography. This makes it possible to separate aldosterone, hydrocortisone, cortisone, corticosterone, oestrone, oestradiol and oestriol in a very short time.

After elution of the aldosterone spot directly with concentrated sulphuric acid, this steroid can be measured quantitatively by its fluorescence⁷.

Material and Methods. The thin layer of silica gel is prepared as described by STAHL⁸. The silica gel is mixed with about 3% of a fluorescent drug⁹. Standard solutions of pure steroids in ethanol are made in a concentration of 1 mg per ml. The solution is applied to the silica gel with a capillary pipette. As mobile phase we used 8% ethanol (96%) in chloroform (Merck, p.a.). The T.L. is placed in

a closed chamber. The chromatogram is developed at 38.5°C for 1 h (ascending technique). The spots of the corticosteroids are visible in UV-light (figure), oestron and oestradiol are visible in UV-light after about 24 h. After marking the steroids, the aldosterone spot is scraped off and transferred to a centrifuge tube. Aldosterone is eluated directly from the silica gel by means of 1 ml concentrated sulphuric acid. The silica gel is well mixed with

- ¹ R. NEHER and A. WETTSTEIN, *J. clin. Invest.* **35**, 800 (1956).
- ² J. MOOLENAAR, *Acta endocrin.* **25**, 161 (1957).
- ³ P. J. AYRES, O. GARROD, S. A. SIMPSON, and J. F. TAIT, *Biochem. J.* **65**, 639 (1957).
- ⁴ W. NOWACZYNSKI, E. KOIW, and J. GENERT, *Can. J. Biochem. Physiol.* **35**, 425 (1957).
- ⁵ S. SOBEL, R. J. HENRY, O. J. GOLUB, and M. RUDY, *J. clin. Endocrin. Metab.* **19**, 1302 (1959).
- ⁶ C. FLOOD, D. LAYNE, S. RAMCHARAN, E. ROSSIPAL, J. F. TAIT, and S. A. S. TAIT, *Acta endocrin.* **36**, 237 (1961).
- ⁷ J. BRUINVELS and J. VAN NOORDWIJK, *Nature* **193**, 1260 (1962).
- ⁸ E. STAHL, *Dünnschichtchromatographie* (Springer-Verlag, 1962).
- ⁹ S. 5. Grün/1 531957. Leuchtstoffwerk, GMBH & Co. Vertriebs-gesellschaft, Heidelberg.