

assay suitable for the detection of small variations in ILA and it is hoped that, during further development, the precision will be improved.

The use of insulin antibodies to separate the total ILA into antigenic and non-antigenic fractions is not an innovation as this system is already in use in the assays of FROESCH⁸ and SAMAN and FRASER⁹. Antibodies are used by WARDLOW and MOLONEY⁷ to improve the precision of the diaphragm assay. The introduction of anti- γ -globulin serum into the system to improve the binding of insulin decreases the possibility that some of the sample insulin binds to the tissue used in the assay rather than to the antibodies. This improved binding may explain the low percentage of residual ILA found in whole serum.

The AI, determined by a system which is specific for insulin, can be considered as the insulin in the serum which is both biologically and antigenically active. It is not certain that the total ILA measured in the whole serum is a true measurement of the *in vivo* effect of the serum. The finding that the AI is only 55% of the immunoinsulin, indicates that the serums so far measured have contained a component which reduces the *in vitro* biological effect of serum insulin. This is supported by the finding of an anti-insulin effect of the anti- γ -globulin serum used and by the observation that there is not al-

ways a 100% recovery of human insulin added to human serum. If an anti-insulin exists in the human serum there is no conclusive evidence that this factor will exert the same effect *in vivo* as *in vitro*; until such time as the question of anti-insulins is clarified the AI measured may best be considered a minimum estimate of the circulating insulin rather than an absolute estimate.

The precision of this assay combined with the antigenic specificity afforded by the use of insulin antibodies and anti- γ -globulin serum make it suitable for the investigation of the state of human insulin as well as for the routine measurement of serum ILA and AI.

Résumé. Description d'une méthode de détermination de l'insuline antigénique utilisant le diaphragme de souris avec et sans addition d'anticorps anti-insuline préalablement précipités par de l'anti- γ -globuline.

A. J. MOODY and J.-P. FELBER

Laboratoire de Biochimie de la Clinique Médicale
Universitaire, Lausanne (Suisse), le 27 novembre 1963.

Technik der Kanülierung des Confluens sinuum beim Kaninchen für Versuche mit partiellem extrakorporellem Kreislauf

Der extrakorporelle Blutkreislauf bei Jung- oder Kleintieren, Foeten, Neugeborenen und Kleinkindern hat in den letzten Jahren sehr an Interesse gewonnen, sei es zur Oxygenierung eines Teils des zirkulierenden Blutes, sei es zur Hämodialyse¹⁻⁹.

Im Rahmen unserer Untersuchungen über die humorale Vermittlung der Schlaf- und Wachzustände ist es uns daran gelegen, venöses Hirnblut zu erhalten. Da beim Kaninchen die Venae jugulares internae sehr wenig ausgebildet sind, haben wir versucht, das Blut aus dem Confluens sinuum zu erhalten. Gleichzeitig interessierte uns im Zusammenhang mit den klinisch-physiologischen Forschungen der Universitätsfrauenklinik Basel die Frage, ob sich der leicht zugängliche Confluens sinuum als Blutentnahmestelle für einen veno-arteriellen «Bypass» bei Neugeborenen mit pulmonaler Insuffizienz eignen könnte.

Bei rund 40 Kaninchen eröffneten wir den Confluens sinuum und führten dessen Blut mit Hilfe einer Spezialkanüle dem extrakorporellen Kreislauf zu.

Technik. Der Confluens sinuum des Kaninchens liegt unter der Spitze des Os interparietale¹⁰ (Figur 1). Zur Eröffnung dieses venösen Blutleiters gehen wir wie folgt vor: (1) Im Bereich zwischen den Ohren Längsschnitt der Haut bis auf den Knochen (Länge ca. 3 cm). (2) Präparation des Os interparietale durch seitliches Abschieben des Periostes (Figur 1). (3) Planfeilen des Os interparietale bis keine Unebenheiten mehr vorhanden sind. (4) Aufsetzen einer trepanartigen Bohrerführung aus rostfreiem Stahl auf die in Figur 1 eingezeichnete Stelle (schwarzer Punkt). (5) Anbohren des Knochens. Am besten eignet sich ein von einem Elektromotor angetriebener Hohlbohrer (Aussen-

durchmesser 3 mm). (6) Entfernen der Bohrerführung. Kontrolle der angebohrten Stelle, wobei die beiden vorderen Suturen des Os interparietale tangential angeschnitten sein sollen (vgl. Figur 1). (7) Unter möglichst geringem Druck senkrecht durchbohren des Knochens und der Wand des Confluens sinuum (Dura mater) ohne abzusetzen. Dabei spürt man zwei Veränderungen des Bohrwiderstandes: die eine beim Übergang zwischen Tabula externa und interna, die andere beim Durchbruch durch die Tabula interna. Daraufhin soll der Bohrer nicht sofort hochgezogen werden, damit die Dura sicher ausgestanzt und der Sinus auf der ganzen Fläche eröffnet wird. Unter diesen Umständen haftet das kleine Scheibchen aus harter Hirnhaut am entfernten Knochenstück, welches sich in der Höhlung des Bohrers befindet. (8) Mit Hilfe

¹ J. C. CALLAGHAN und J. DE LOS ANGELES, Surg. Forum 12, 215 (1961).

² A. FLEISCH und P. C. FREI, Vox Sang. 6, 489 (1961).

³ P. M. GALETTI, F. J. MARTINEZ, D. E. BRINSFIELD und E. C. PEIRCE II, Trans. ASAIO 9, 244 (1963).

⁴ R. O. HICKMAN und B. H. SCRIBNER, Trans. ASAIO 8, 309 (1962).

⁵ R. HOIGNÉ und W. GROSSMANN, Acta med. scand. 158, 253 (1957).

⁶ L. LAWN und R. A. McCANCE, Proc. Roy. Soc. London 155 B, 500 (1962).

⁷ E. SALING, Arch. Gynäk. 197, 123 (1962).

⁸ C. H. M. WALKER, J. M. WERSHING, S. L. SIMONS, J. H. HOLMES und V. SITPRIJA, Trans. ASAIO 9, 86 (1963).

⁹ B. WESTIN, R. NYBERG und G. ENHÖRNING, Acta paediat. (Uppsala) 47, 339 (1958).

¹⁰ W. KRAUSE, Die Anatomie des Kaninchens in topographischer und operativer Rücksicht (Verlag W. Engelmann, Leipzig 1884).

eines Steckschlüssels Einschrauben der mit einem Zäpfchen verschlossenen und mit Heparin gefüllten Kanüle aus rostfreiem V₂A-Stahl (Figur 2). Diese ist innen poliert und nach den Angaben von FLEISCH und FREI² mit «Araldit XV»¹¹ überzogen. (9) Abdichten der Kanüle gegen den Knochen mit Wachs. (10) Am Ende des Versuches kann der Knochendefekt mit einem Pfropfen aus «Palacos» (Kulzer) verschlossen werden.

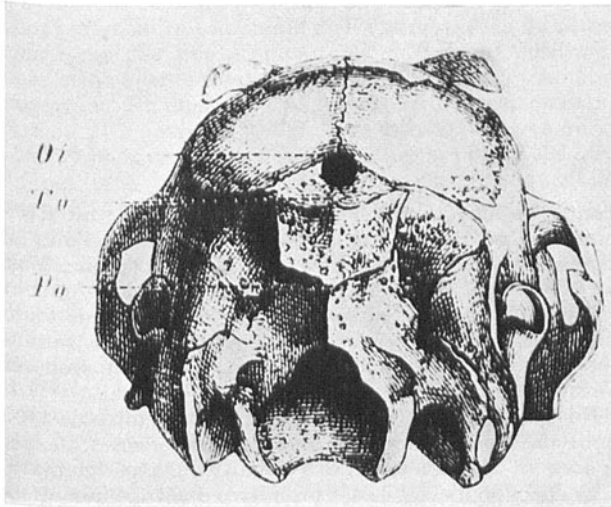


Fig. 1. Kaninchenschädel von hinten. Beim Durchbohren des vordern Teils des Os interparietale (Oi) gelangt man in den Confluens sinuum. To = Tuberculum occipitale. Po = Protuberantia occipitalis externa. (Zeichnung des Schädels aus: W. KRAUSE, *Die Anatomie des Kaninchens in topographischer und operativer Rücksicht* (Leipzig 1884).)

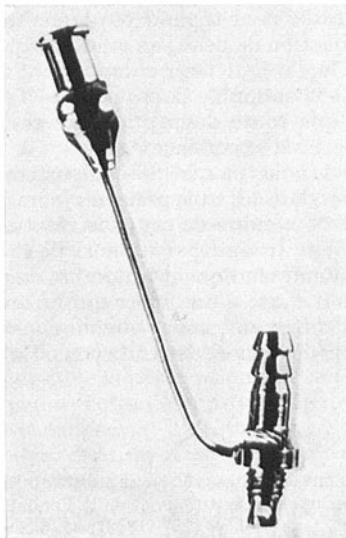


Fig. 2. Sinuskanüle aus rostfreiem Stahl, innen auf Hochglanz poliert und mit «Araldit XV» ausgekleidet. (Diese Kanüle kann vom Physiologischen Institut der Universität Basel bezogen werden.)

Bei der Anwendung dieser Technik sind folgende Punkte *besonders zu beachten*: Das Bohrloch muss mit Hilfe der Suturen sehr genau lokalisiert werden, da die angegebene Kanüle den Confluens sinuum eines 3–4 kg schweren Kaninchens fast ausfüllt. Gefahr der Luftembolie! Nach Eröffnung des Sinus kann bei über die Horizontale hochgehaltenem Kopf leicht Luft angesogen werden. Wir empfehlen daher das Bohren bei leichter Tieflage des Kopfes. Die Kanüle muss gegen den Knochen sehr gut abgedichtet sein, da sonst beim Ansaugen des Blutes Luft in den extrakorporellen Kreislauf gelangt. Die Hämolyse wird grösser und das Minutenvolumen nimmt ab. Bei innen ungenügend polierter Kanüle oder bei inadäquater Hemmung der Blutgerinnung bildet sich leicht ein Gerinnsel, das den Blutausfluss erheblich beeinträchtigen kann. Was das Antikoagulieren anbetrifft, so hat sich bei uns am besten die kontinuierliche Heparinisierung mit Hilfe einer Infusionspumpe bewährt, die an einen seitlichen Eingang der Sinuskanüle angeschlossen wird (Figur 2). Dadurch erreicht man eine maximale Heparinkonzentration am Entnahmeort des Blutes bei geringerer Gerinnungshemmung im Organismus. Wir haben die optimale Dosis für das Kaninchen bestimmt: sie beträgt 3 mg Heparin pro kg Körpergewicht und pro Stunde, verdünnt in 10 ml 0,3 molarer THAM-Lösung¹² pro kg Körpergewicht und pro Stunde (Pufferlösung zur Bekämpfung der metabolischen Acidose). Das *maximal mögliche Minutenvolumen*, das aus einer solchen Sinuskanüle bei einem Kaninchen zwischen 2,8–4 kg erhalten werden kann, liegt in der Grössenordnung von 15–20 ml pro min und pro kg Körpergewicht. Für den physiologischen Versuch genügt jedoch meistens ein viel geringeres Minutenvolumen.

Diskussion. Die oben beschriebene Technik bewährt sich bei veno-arteriellem kleinem Minutenvolumen, auch bei veno-venösem «Bypass». Sie bietet dabei folgende Vorteile gegenüber dem Blutausfluss aus einer Vene:

Da die Hirnsinus in die straffe Dura mater eingebaut sind, können deren Wände beim Ansaugen des Blutes nicht kollabieren. Dadurch ist es möglich, das Blut direkt mit der Pumpe ohne dazwischengeschaltetes Reservoir vom extrakorporellen System zuzuführen. Bei Verwendung eines geeigneten Membranoxygenators oder einer künstlichen Niere genügt eine Pumpe in einem geschlossenen, luftfreien extrakorporellen Kreislauf.

Die Untersuchung des Sinusblutes (Blutgase, Reaktion, chemische Zusammensetzung) gibt Aufschluss über das innere Milieu des Gehirns während der Perfusion.

Der Querschnitt der Blutausflussöffnung ist im Vergleich zum Minutenvolumen gross, so dass die kritische Geschwindigkeit der Wirbelbildung nicht erreicht wird.

Dank der Infusion des Heparins unmittelbar am Ort der Blutentnahme wird die regionale, extrakorporelle Gerinnungshemmung möglich (Neutralisation des Heparins durch Protaminsulfat vor der Reinjektion des Blutes), falls annähernde Normocoagulabilität im Organismus gewünscht wird.

Der chirurgische Eingriff ist klein und bei entsprechender Übung schnell durchgeführt.

Die Anwendbarkeit der beschriebenen Methode wird durch das im Vergleich zur Herzarbeit kleine Minutenvolumen (15–20 ml/min/kg) begrenzt.

¹¹ «Araldit XV» (CIBA) = Lösungsmittelhaltiges Epoxydharz.

¹² THAM = Trihydroxymethylaminomethan.

Vorversuche haben gezeigt, dass sich die gleiche Technik auch beim neugeborenen Ferkel anwenden lässt. Bei diesem Tier ist der Confluens sinuum, wie übrigens auch beim menschlichen Neugeborenen, wesentlich grösser als beim ausgewachsenen Kaninchen, was die Gefahr der Läsion der hirnwärts gelegenen Wände dieser Blutleiter beim Durchbohren durch den Knochen vermindert¹³.

Summary. Since an adequate venous blood outflow from the internal jugular vein is not available in the rabbit, a method for venous blood outflow from the Confluens sinuum was developed. It appeared to be useful in experiments with partial extracorporeal circulation and for par-

tial oxygenation of the blood circulation during haemodialysis.

TH. KOLLER JR.,
M. MONNIER und R. GAMP

*Physiologisches Institut der Universität, Basel, und
Universitätsfrauenklinik, Basel, (Schweiz),
22. November 1963.*

¹³ Besonderer Dank gilt den Herren S. GRABER und H. BITTERLI aus dem Physiologischen Institut sowie Herrn E. DÖBELI aus der Universitätsfrauenklinik für ihre wertvolle Mitarbeit.

STUDIORUM PROGRESSUS

Action de la piqûre et de l'eau distillée sur le développement de l'embryon de poulet¹

Nous nous occupons depuis quelque temps de l'action biologique de certains métabolites et antimétabolites et avons porté tout particulièrement notre attention sur l'antivitamine B₆ ou désoxyypyridoxine, en essayant l'action de cette substance sur le développement de l'embryon de poulet et sur des organes d'embryon de poulet cultivés *in vitro*. La désoxyypyridoxine dissoute dans de l'eau distillée, dans de l'eau physiologique ou dans du liquide de tyrode a été injectée à des doses variables dans le blanc ou dans le jaune de l'œuf. Les premiers résultats de ces recherches nous ont permis de constater que l'embryon de poulet est très polymorphe dans ses réponses aux différentes stimulations qui s'exercent sur lui, qu'il est d'une extrême sensibilité, même vis-à-vis des stimulations minimales – la réponse est parfois disproportionnée à l'intensité du stimulus – et qu'il réagit vivement aux variations, mêmes très petites, du milieu d'incubation (température, humidité).

Pour nous mettre à l'abri des facteurs pouvant interférer au cours d'une expérience, avec l'action de la substance employée, et en particulier des facteurs représentés d'une part par l'action du solvant dans lequel la substance est dissoute et d'autre part par l'action mécanique traumatique de la piqûre, nous essayons de mettre au point une méthode standard qui, pour les substances hydrosolubles, nous permette de séparer l'action de la substance de celle de ces deux autres facteurs.

Dans la littérature, nous avons trouvé très peu de données concernant l'action de l'eau distillée sur le développement de l'embryon de poulet. FÉRÉ², en 1893 et 1896, a fait quelques expériences analogues aux nôtres. En injectant $\frac{1}{2}$ cm³ d'eau distillée dans le blanc de l'œuf de poule et en ouvrant les œufs après 3 jours d'incubation, il a trouvé 1 embryon malformé (10%). Cet auteur a répété trois ans plus tard les expériences mais sur un matériel plus vaste et avec des quantités plus petites d'eau; en injectant $\frac{1}{20}$ cm³ d'eau distillée dans le blanc de 72 œufs et en les ouvrant après trois jours d'incubation, il a trouvé les 70,8% d'embryons normaux et les 29,2% d'embryons malformés. D'ailleurs, FÉRÉ n'insiste pas sur ces résultats qui lui avaient servi uniquement comme expériences de contrôle pour essayer l'influence des injections de peptone sur l'évolution de l'embryon. ANCEL³ a observé que la déposition d'une goutte d'eau distillée directement sur l'embryon, mis à nu après 20 h d'incubation, fait aug-

menter l'effet léthal et l'effet tératogène, qui sont d'ailleurs déjà manifestes par la simple ouverture de l'œuf au moyen d'un petit orifice pratiqué dans la coquille. Mais les expériences d'ANCEL ont été conduites dans un but différent du nôtre et en se servant d'une technique toute particulière; elles ne nous semblent pas démonstratives pour éclairer le problème que nous nous sommes proposés d'étudier.

Nos expériences ont été faites sur un ensemble de 1400 embryons de poulet. Nous avons réalisé 5 séries d'expériences en faisant varier les conditions expérimentales dans chacune d'elles. Les 4 premières ont trait aux effets de l'eau distillée injectée dans le blanc de l'œuf avec une micro-seringue à des doses de $\frac{1}{20}$, $\frac{1}{10}$, $\frac{1}{2}$ et 1 cm³; l'eau a été injectée avant l'incubation et après 1, 2, 3, 4, et 5 jours d'incubation. A côté d'œufs ayant subi des injections d'eau distillée, nous avons mis en couveuse des œufs de contrôle qui n'avaient subi aucun traitement et également d'autres œufs que nous avons piqués avec la même seringue, dans le même endroit et en suivant exactement la technique employée pour les injections (série V). La piqûre des œufs a été faite afin de voir si ce petit traumatisme peut, pour sa part, provoquer des effets nuisibles et, le cas échéant, pour séparer ces effets de ceux déterminés par l'injection de l'eau; en effet, lorsque l'on injecte de l'eau distillée, il faut tenir compte de 2 facteurs, l'action de l'eau et l'action de la piqûre. Les Tableaux montrent, mieux que toute description, les résultats principaux de ces séries d'expériences⁴.

Le Tableau I nous montre le comportement de l'embryon de poulet dans les trois premiers jours qui suivent le traitement; dans nombre de cas, une réaction immédiate se manifeste et se traduit par la mort de l'embryon. Les chiffres des colonnes indiquent le nombre en pour-cent des morts; puisqu'il s'agit d'une mort qui intervient tout de suite après le traitement, nous pouvons considérer celui-ci comme la cause de la mort des embryons. Le Tableau nous

¹ Ces recherches ont été faites grâce à un subside du Fonds National Suisse de la recherche scientifique et de la Fondation E. Barel.

² Ch. FÉRÉ, C. R. Soc. Biol. 46, 787 (1893); 48, 424 (1896).

³ P. ANCEL, Arch. Anat. micr. Morph. exp. 45, 203 (1956).

⁴ Nous sommes en train de répéter toutes les expériences avec une variante: au lieu de l'eau distillée, nous injectons de l'eau physiologique ou du liquide de tyrode. Les résultats de ces expériences feront l'objet de communications ultérieures.