

Following the injection of RNA into the marrow cavity of the sternum, the electrophoretic diagrams revealed an asymmetrical main component (Figure 2). The base of this component was substantially HbA, but the upper part tended towards the region of slow Hb. This was

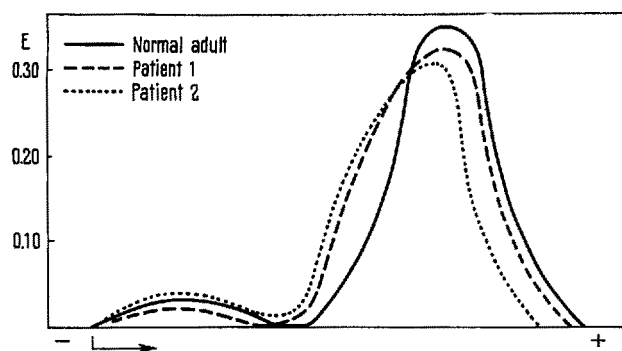


Fig. 2. Electrophoretic diagrams of the Hb extracted from the erythropoietic cells of two patients suffering from Cooley's disease after the introduction of RNA into the marrow cavity of the sternum.

because the percentage of HbF in the solution was still high, and on account of its slow movement caused a trail phenomenon on the starch-block. In the second examination a component of HbA β similar to that of the normal adult was also present. The divided quantitative determination of Hb gave the following results: *Patient 1* – HbF 16.90, HbA β 1.50, HbA 81.60; *Patient 2* – HbF 22.80, HbA β 2.30, HbA 74.90.

The experiment therefore demonstrated that by injecting into the marrow cavity RNA possessing the information necessary for the normal haemoglobin formation, it is possible to obtain a notable increase in the quota of HbA in the erythropoietic cells of patients affected with Cooley's disease.

Riassunto. L'introduzione nella cavità midollare dello sterno di soggetti affetti da morbo di Cooley di ARN II° estratto dalle cellule emopoietiche normali, provoca un netto aumento della quota di HbA nelle cellule della serie eritroblastica.

S. ESPOSITO

*Clinica Medica dell'Università, Pavia (Italy),
June 23, 1964.*

PRO EXPERIMENTIS

Eine Anlage zur Perfusion isolierter Organe

Die Perfusion isolierter Organe¹⁻⁵ hat sich als wertvolle Methodik erwiesen, um bestimmte Leistungen dieser Organe in einem möglichst physiologischen Zustand zu erfassen. Die Funktionen laufen während einiger Zeit mit befriedigender Geschwindigkeit oder Intensität ab, ohne von anderen Organsystemen beeinflusst zu werden. Dabei ist die Struktur im Gegensatz zu Gewebsschnitten oder Homogenaten intakt.

Trotzdem sind die klassischen Perfusionssysteme mit einem *Kreislauf* mit Nachteilen behaftet. Da die zu Beginn des Experimentes verwendete Perfusionslösung nicht ohne weiteres quantitativ durch eine andere ersetzt werden kann, ergeben sich rasch Grenzen in der experimentellen Anwendbarkeit.

(1) So ist zum Beispiel die *Streubreite* der Resultate recht gross⁶ und spiegelt die Streubreite der Resultate wieder, die mit gleicher Bestimmungsmethodik an intakten Ganztieren erhoben worden sind. Es wäre deshalb vorteilhaft, *Vergleichswerte* von einem Organ aus einem *Experiment* zu erhalten. Das ist theoretisch möglich, da die Geschwindigkeit von Stoffwechselvorgängen zu Beginn der Experimente konstant ist.

(2) Perfusionsanlagen mit einem *Kreislauf* gestatten nicht, die *Reversibilität* verschiedenster Einflüsse am perfundierten Organ zu studieren.

(3) «*Short pulse labelling*»-Experimente können am perfundierten Organ nur unter unphysiologischen Bedingungen durchgeführt werden. Die Methodik des «*short pulse labelling*» besteht darin, biologische Materialien *kurze Zeit* einer bestimmten markierten Verbindung auszusetzen. Diese markierte Verbindung oder ihre Umwand-

lungsprodukte finden sich dann dort, wo die Stoffwechselaktivität in Bezug auf die Gruppe dieser Verbindungen am höchsten ist, zum Beispiel in einer Fraktion *z*. Wird die markierte Verbindung nach kurzer Zeit aus dem System entfernt, so erscheint nur die Fraktion *z* markiert, während die markierte Verbindung in der kurzen Zeit nur geringgradig in weniger aktive Stoffwechselwege eingeschleust wird. Damit kann das Schicksal der allein markierten Fraktion *z* über verschiedene Zeiten nach Wegnahme des Vorläufers verfolgt werden.

In der Praxis lässt sich indessen eine markierte Verbindung nicht mehr ohne weiteres aus einem biologischen System entfernen. Man hat sich deshalb mit Isotopenverdünnungsmethoden beholfen. Dieses Vorgehen ist selbstverständlich nicht physiologisch, da das biologische Objekt plötzlich mit grossen Mengen der nicht markierten Verbindung überschwemmt werden muss.

Beschreibung der Apparatur. Bei dem hier zu beschreibenden Perfusionssystem handelt es sich um eine Weiterentwicklung des von JEUNET und QUITT⁵ beschriebenen Apparates. Es soll die eben erwähnten Nachteile älterer

¹ L. FINCKER, Thèse d'université, Strasbourg (1960).

² N. D. CHAPMAN, P. D. GOLDSWORTHY, W. VOLWILER, L. M. NYAUS und A. J. MARTINIS, J. exp. Med. 113, 981 (1961).

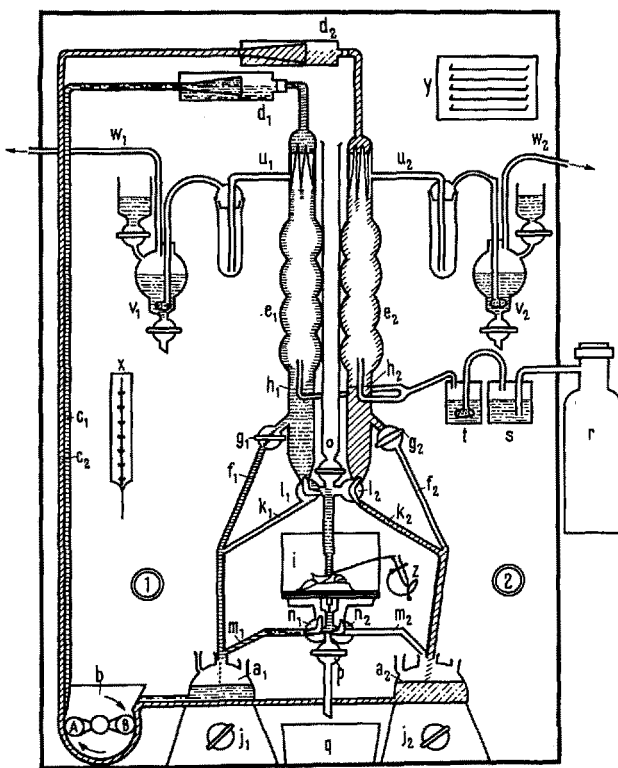
³ R. W. BRAUER, R. L. PESOTTI und P. PIZZOLATO, Proc. Soc. exp. Biol. N.Y. 78, 174 (1951).

⁴ L. L. MILLER, C. G. BLY, M. L. WATSON und W. F. BALE, J. exp. Med. 94, 431 (1951).

⁵ F. JEUNET und J. QUITT, J. Physiol. 54, 625 (1962).

⁶ H. KOBLET, H. DIGGELMANN und F. JEUNET, Helv. med. Acta 31, 169 (1964).

Perfusionsgeräte umgehen. Die Figur zeigt ein Schema des Aufbaus. Das Prinzip besteht darin, mit einer geeigneten Umschalt- und Spülvorrichtung das perfundierte Organ, z. B. die Leber, einmal in den einen, ein anderes Mal in den anderen Kreislauf einbeziehen zu können. In beiden Kreisläufen zirkuliert die Perfusionsflüssigkeit («Blut») kontinuierlich, wobei die beiden Kreisläufe völlig voneinander getrennt sind. Im verschliessbaren Gehäuse herrscht eine konstante Temperatur (37°C) mittels der Heizung y und eines Thermostaten x. Aus den beiden Reservoiren a_1 und a_2 wird das Blut mit einer rotierenden Quetschpumpe b durch die Plasticschläuche c_1 und c_2 in die Höhe gepumpt, wo es durch die Nylonfilter d_1 und d_2



Schema der Perfusionsanlage (Maßstab nicht einheitlich). a_1 und a_2 Reserveflaschen; b Quetschpumpe; A und B rotierende Flügel der Quetschpumpe; c_1 und c_2 Plasticschläuche; d_1 und d_2 Nylonfilter; e_1 und e_2 Kühlmäntel («Lungen»); f_1 und f_2 Kurzschlüsse mit den Niveauhähnen g_1 und g_2 , mit denen die Höhen h_1 und h_2 der Säulen der Perfusionsflüssigkeiten (Perfusat, «Blut») einreguliert werden können; i Plexiglasskammer, enthaltend eine Leber. Kanülen sind in die Pfortader, in die Vena cava inferior und in den Ductus choledochus eingebunden. Die Galle wird in dem Mikrozentrifugenröhrchen z aufgefangen. j_1 und j_2 Magnetrührer; k_1 und k_2 Umleitungen mit den Umleithähnen l_1 und l_2 , durch die das Perfusat entweder in die Leber oder unter Umgehung der Leber direkt in die Reserveflaschen a_1 und a_2 geleitet werden kann. m_1 und m_2 Rückflussröhre, durch die das Perfusat nach Passage der Leber via Umleithähnen n_1 und n_2 in die Reservoir a_1 und a_2 geführt wird. o Spülfäß mit oberem Spülhahn; p unterer Spülhahn; q Auffanggefäß für die Spülflüssigkeit; r Gasflasche (je nachdem 95% O_2 + 5% CO_2 oder 100% O_2); s Sicherheitsventil; t Gasbefeuchter; u_1 und u_2 Ableitschläuche für Überschüsse von O_2 und CO_2 ; v_1 und v_2 Waschflaschen, enthaltend 10% NaOH; w_1 und w_2 Ableitung für Überschüsse von O_2 in die Kapelle; x Thermostat, regulierend auf 37°C ; y Heizung. 1 linker Kreislauf; 2 rechter Kreislauf. Eine Leber wird mit dem Kreislauf 1 durchströmt, Kreislauf 2 ist bei l_2 kurzgeschlossen.

in die beiden Kugelhühler e_1 und e_2 , die als künstliche Lungen dienen, gelangt. Dabei bedienen wir uns eines besonderen Verteilers, der das Perfusat gleichmässig in dünner Schicht über die Kühlerinnenflächen verteilt. Es sammelt sich im unteren Abschnitt der Lungen an und geht von hier aus verschiedene Wege:

(1) Durch die Kurzschlüsse f_1 und f_2 . Je nach Stellung der Niveauhähnen g_1 und g_2 stellt sich das Niveau der Blutsäulen h_1 und h_2 auf der gewünschten Höhe ein. Die beiden Kurzschlüsse und Niveauhähnen dienen demnach vorwiegend der Einstellung der Höhen h der über der Leber lastenden Blutsäule. Diese Anordnung gestattet, die Durchströmung der Leber zu variieren und bestimmt den Perfusionsdruck (um 12 cm H_2O) und mit die Durchflussgeschwindigkeit (rund 15–20 ml/min).

(2) Bei Perfusion der Leber: durch die Umleithähnen l_1 und l_2 gelangt das Perfusat in die Leber in der schliessbaren Plexiglasskammer i.

(3) Ohne Perfusion einer Leber: durch die Umleithähnen l_1 und l_2 gelangt das Perfusat durch die Umleitungen k_1 und k_2 direkt in die Reservoir a_1 oder a_2 zurück.

Ein O_2 - CO_2 -Gemisch strömt aus der Flasche r via Sicherheitsventil s und Befeuchter t in die Basis der beiden Lungen und oxygeniert im Gegenstrom die Erythrocyten des Perfusates. Überschüsse des Gasgemisches werden je nach Versuchsanordnung direkt in die Kapelle oder via u_1 und u_2 in die 10% NaOH enthaltenden Absorptionsflaschen (Na_2CO_3) v_1 und v_2 abgeleitet. Im zweiten Fall entweicht der überschüssige Sauerstoff allein durch die Ableitungen w_1 und w_2 .

Die Leber wird mit einer Kanüle in der Vena portae im System aufgehängt. Eine Kanüle in der Vena cava inferior hängt in einen Hohlraum unter der Plexiglasskammer i, so dass die ausströmende Tropfenzahl als Mass der Durchblutungsgeschwindigkeit sichtbar ist. Anschliessend fliesst das Perfusat je nachdem via Umleithähnen n_1 oder n_2 und die Rückflussschläuche m_1 oder m_2 in das zugehörige Reservoir a_1 oder a_2 zurück.

Beim Umstellen vom einen auf den anderen Kreislauf darf die Durchströmung des Organs, zum Beispiel der Leber, nicht unterbrochen werden. Andererseits muss eine Durchmischung der zur Perfusion verwendeten Flüssigkeiten, die je nach Versuchsbedingungen verschiedene Zusätze enthalten, vermieden werden. Deshalb wurde zusätzlich ein Spülsystem mit einem oberhalb (o) und einem unterhalb (p) des Organs gelegenen Spülhahn eingebaut. Die Figur zeigt die Verhältnisse bei der Perfusion eines Organs durch den Kreislauf 1. Beim Umschalten auf Kreislauf 2 ist nach dem oben Gesagten folgendermassen vorzugehen: (1) Umstellen des Umleithähnen l_1 auf Kurzschluss (Abfluss durch k_1); (2) Schliessen des Umleithähnen n_1 ; (3) Öffnen des oberen (o), dann des unteren (p) Spülhähnen; (4) Schliessen des oberen Spülhähnen (o); (5) Umstellen des Umleithähnen l_2 auf Perfusion; (6) Schliessen des unteren Spülhähnen p; (7) Öffnen des Umleithähnen n_2 ; (8) Regulierung von h_2 mit dem Niveauhähnen g_2 .

Wir führen die Operation zur Isolierung von Rattenlebern und die Herstellung der Perfusionslösung entsprechend den Angaben von JEUNET und QUITT⁵ durch.

Material. Die Apparatur steht in einer Holzkammer mit folgenden Innenabmessungen: Breite 75 cm, Höhe 95 cm, Tiefe 40 cm. Die Thermostatisierung der Kammer erfolgt mit einem Braunlüfter mit Heizung. Bei der Quetschpumpe handelt es sich um eine WAB-Pumpe (Firma Iseli, Luzern). Sämtliche Glaswaren wurden bei der Glastechnik AG., Bern, hergestellt. Die Gesamtlänge der Kugelhühler beträgt 42 cm, der Durchmesser der

Kugeln 38 mm. Die selbstverfertigte Plexiglaskammer für das isolierte Organ weist einen Durchmesser von 8 cm, eine Höhe von 6 cm auf. Beim Schlauchmaterial handelt es sich um Spezial-Silikon-Schlauch mit den Durchmessern von 9 und 5 mm (Firma Haska, Bern). Die Nylonfilter entstammen Infusionsbestecken.

Summary. A device for perfusion of isolated organs is described, with which it is possible to perform short pulse labelling experiments or experiments on reversibility of various influences on one organ in one experiment. In principle there is a double circulation. Each circulation

may be used *per se* to perfuse the organ, one after the other, without danger of mixing the perfusates.

H. KOBLET und J. TRACHSEL¹

Medizinisch-chemisches Institut und Institut für klinische Eiweissforschung der Universität Bern (Schweiz),
7. August 1964.

¹ Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung für die Unterstützung dieser Arbeit.

A Bioassay for Insulin Using the *in situ* Mouse Diaphragm

Serum insulin-like activity (ILA) may be determined by a number of *in vitro* bioassays, the majority of these bioassays using either the rat diaphragm^{1,2} or the epididymal fat pad^{3,4}. There has not yet been a direct comparison of the *in vivo* and *in vitro* response to insulin of a tissue used in an *in vitro* bioassay.

A comparison is presented between the response to insulin of the *in situ* mouse diaphragm and the response to insulin of the *in vitro* mouse diaphragm. In both studies the diaphragm glycogen content is the insulin sensitive metameter. The response of the *in situ* mouse diaphragm is sufficiently sensitive and linear for this system to be used as an insulin assay.

The *in vitro* studies have been carried out using the *in vitro* mouse diaphragm assay of MOODY and FELBER⁵. The *in situ* assay is based on the demonstration by RAPHAELSON⁶ that, in the rat, an intraperitoneal injection of insulin increases the diaphragm glycogen content.

Four characteristics of the systems are compared: the sensitivity, the linearity of the response to insulin, the kinetics of the response to insulin and the response to serum. The *in situ* system is more sensitive to insulin than the *in vitro* system. The kinetics and the response to serum of the two systems are very similar.

Materials and methods. Mice: Fasting male albino mice of between 13 and 20 g are used; at this weight the mice are immature and have little adipose tissue.

Buffer: Krebs-Ringer bicarbonate buffer pH 7.4⁷ containing 2.0 mg gelatine and 3.0 mg glucose per ml is used.

Standard insulin solutions: Standard insulin solutions in the range 1 to 500 μ U/ml are made up daily by dilution, in buffer, of a stock of 1 mg/ml beef insulin⁸.

Experiment design: 0.5 ml of sample is injected into each mouse. For semi-quantitative experiments one mouse is used for each point; when higher precision is required at least two mice are injected with each sample.

Injection of the mice: Before injection the samples are gassed with 95% oxygen-5% carbon dioxide and warmed to 37°C. A Hamilton syringe, fitted with a No. 20 detachable needle, is used for the injection. The mice are gripped behind the ears and held stomach uppermost by an assistant. The injections are made into the peritoneal cavity through the abdominal wall. The incubation is timed from the withdrawal of the needle until the mouse is killed by decapitation.

Determination of the glycogen: The diaphragms are removed, in halves, within 1 min of the death of the mice. The glycogen of the hemidiaphragms is then prepared and determined as described elsewhere⁵. The values for the diaphragm glycogen loading are expressed as μ g of glycogen per mg wet tissue.

***In vitro* technique:** *In vitro* incubations are carried out as already described⁵ using the formation of glycogen by isolated hemidiaphragms as the insulin sensitive metameter.

Results. The minimum detectable dose in the *in situ* assay is 1 μ U/ml of beef insulin. The values for the glycogen content of *in situ* diaphragms after incubation for 30 min following injection of 0.5 ml of 1 μ U/ml insulin are significantly greater ($p = 0.001$) than the values obtained following injection with buffer alone (see Table I).

Table I. Response of the *in situ* mouse diaphragm to injection with Krebs' buffer and with 1 μ U/ml of beef insulin

Krebs' buffer	1 μ U/ml of beef insulin
1.16	1.48
1.19	2.04
0.45	2.07
0.70	2.46
Mean values 0.88	2.01

The probability that the two responses are the same is less than 0.001. Each value represents the mean response, as μ g of glycogen/mg, of one mouse. The incubations were carried out for 30 min.

¹ J. GROEN, C. E. KAMMINGA, A. F. WILLEBRANDS, and J. R. BLICKENAU, J. clin. Invest. 31, 97 (1962).

² P. J. RANDLE, Brit. med. J. 1954 i, 1237.

³ A. E. RENOLD, D. B. MARTIN, X. M. DAGENALS, J. STEINKE, R. J. NICKERSON, and M. C. SHEPS, J. clin. Invest. 39, 1487 (1960).

⁴ E. G. BALL and M. A. MERRIL, Endocrinol. 69, 596 (1961).

⁵ A. J. MOODY and J.-P. FELBER, Exper. 20, 105 (1964).

⁶ A. E. RENOLD and J. STEINKE, Fortschritte der Diabetesforschung. I. Symposium des Deutschen Diabetes Komitee (1963).

⁷ W. W. UMBREIT, R. H. BURRIS, and J. F. STAUFFER, *Manometric Techniques and Tissue Metabolism* (Burgess Publishing Co., Minneapolis 1957), p. 149.

⁸ Burroughs Wellcome are thanked for their gift of beef insulin.