

vous or humoral mechanism, or whether it is autonomous³. The present investigation was undertaken to ascertain whether the phagocytic activity of the reticulo-endothelial system is influenced by the thymus.

The reticulo-endothelial system is able to store formed organic or inorganic substances taken up from the blood stream⁴. Phagocytosis can therefore be evaluated by determination of the blood clearance of radioactive colloids⁵. The blood clearance is an exponential function of time. The $K = \log C_1 - \log C_2 / t_2 - t_1$, phagocytic index is a measure of the phagocytic activity of the RES⁶.

The experiments were performed with 90 male 5-week-old Swiss mice, divided into 2 groups. In both groups, 15 mice were thymectomized, 15 sham thymectomized and 15 served as controls⁷. 7 days later, all 45 mice of the second group were irradiated with 350 R (200 kV, 20 mA, FHD 50 cm) in order to induce immuno-suppression. On the 14th post-operative day, the clearance of 120 μ g of colloidal radiogold (size 250 Å) was measured with a scintillation counter over the neck⁸. The phagocytic index was determined between 3 and 6 min after the intravenous injection of radiogold.

Results. The phagocytic index of the thymectomized mice is $K = 0.400 \pm 0.05$, which is lower than the index of the controls (Table). This difference is statistically significant at the 5% level. This means that the radiogold clearance of the animals thymectomized 2 weeks previously is reduced in comparison to the sham thymectomized and the control mice. On the other hand, the whole-body irradiation with 350 R has no influence on the clearance. The phagocytic index corresponds to that of the non-irradiated mice.

The phagocytic index K and standard deviation 14 days after thymectomy or sham thymectomy

| | | |
|-----------------|---------|-------------------|
| Thymectomy | | 0.400 \pm 0.051 |
| Sham thymectomy | | 0.450 \pm 0.064 |
| Control group | | 0.446 \pm 0.071 |
| Thymectomy | + 350 R | 0.404 \pm 0.049 |
| Sham thymectomy | + 350 R | 0.446 \pm 0.073 |
| Control group | + 350 R | 0.450 \pm 0.067 |

Discussion. The reduced radiogold clearance of the adult thymectomized mice may be the result of a lower colloid storage capacity of the organism. It therefore seems that the phagocytic activity is lower after thymectomy. Since radiation damage of the lymphatic tissue does not reduce radiogold clearance, one may assume that this effect on phagocytic activity is not due to delayed immune response but caused by the loss of the thymus. We can therefore assume that the thymus influences both immunity and phagocytosis. Each system, however, is a functional unit per se which is controlled cellularly or humorally by the thymus⁹.

Zusammenfassung. Die Radiogoldclearance thymektomierter erwachsener Mäuse ist gegenüber scheinthymektomierten bzw. den Kontrolltieren vermindert. Eine zusätzliche Immundepression durch Ganzkörperbestrahlung mit 350 R führt gegenüber den einzelnen Vergleichsgruppen zu keiner Änderung der Radiogoldclearance. Daraus kann mit aller Vorsicht geschlossen werden, dass der Thymus sowohl die Immunreaktionen als auch die Phagozytosefunktion als übergeordnetes Zentrum steuert. Jedes System scheint aber für sich eine funktionelle Einheit zu bilden.

R. FRIDRICH and M. SCHÄFER

Universitätsinstitut für Röntgendiagnostik und Strahlentherapie, Bürgerspital, Basel (Switzerland), April 18, 1966.

³ B. N. HALPERN, J. Pharm. Pharmac. 11, 321 (1959).

⁴ B. N. HALPERN, G. BIOZZI, and B. BENACERRAF, Am. J. Physiol. 189, 520 (1957).

⁵ E. L. DOBSON, *Physiopathology of the RES* (Pergamon Press, Oxford 1957).

⁶ G. BIOZZI, B. N. HALPERN, and C. STIFFEL, *Radioactive Isotope in Klinik und Forschung III* (Urban und Schwarzenberg, München-Berlin 1958).

⁷ We thank Dr. P. DUKOR for introducing us to the operation technique.

⁸ R. FRIDRICH and M. SCHÄFER, *Experientia* 21, 40 (1965).

⁹ The experiments were supported by a grant from the Swiss National Fund.

PRO EXPERIMENTIS

Fluorometrische Bestimmung von Mikromengen Calcium in Muskelgewebe

Die komplexometrische Bestimmung von Calcium in biologischem Material ist durch Verwendung des Indikators Calcein (Fluoresceinbismethyliminodiessigsäure), der in stark alkalischem Milieu (pH \sim 13) mit Ca^{2+} einen fluoreszierenden Komplex bildet, und durch automatische Registrierung und graphische Auswertung der Titrationskurven bereits beträchtlich verbessert worden¹. Ausgehend von der Beobachtung, dass unter bestimmten Bedingungen eine direkte Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität des Ca-Calcein-Komplexes von der Ca-Konzen-

tration besteht², wurde nun eine einfachere und noch empfindlichere fluorometrische Ca-Bestimmungsmethode entwickelt.

Apparaturen. Gemessen wurde (a) mit einem Spektralfluorometer (Zeiss ZFM 4C mit 2 Monochromatoren, Xenonlampe XBO 450 W/P) gegen den Zeiss-Standard

¹ P. CARTIER und J. CLÉMENT-MÉTRAL, *Clinica chim. Acta* 4, 357 (1959). – W. KLAUS, *Klin. Wschr.* 42, 1123 (1962).

² D. F. WALLACH und T. L. STECK, *Analyt. Biochem.* 6, 176 (1963). – D. F. WALLACH, D. M. SURGENOR, J. SODERBERG und E. DELANO, *Analyt. Chem.* 31, 456 (1959). – S. ZEPF, *Zeiss-Mitteilungen*, im Druck.

F 53/10152. Nach Bestimmung der Anregungs- und Emissionsspektren des Calcein und seines Ca-Komplexes (Figuren 1 und 2) wurde folgende Einstellung gewählt: Anregung: 330 (oder 480) nm, Spalt 0,1 mm; Emission: 540 nm, Spalt 1,0 mm. (b) Mit einem Filtergerät (Beckman Ratiofluorometer, Hg-Lampe Typ 77299) gegen einen Chininstandard oder einen Ca-Eichwert. Nach Unterdrückung des Leerwertes wird das Fluoreszenzverhältnis Probe/Standard ermittelt. Verwendet wurde das Primärfilter UG 11 und das Sekundärfilter WRATTEN 2A. Mit beiden Geräten wurden übereinstimmende Resultate erhalten.

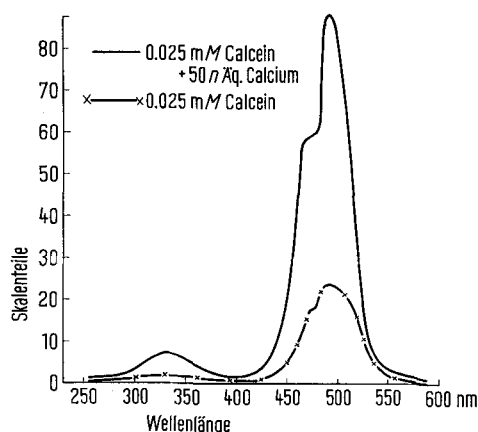


Fig. 1. Anregungsspektrum des Calcein und des Ca-Calcein-Komplexes. Emission: 540 nm Wellenlänge. Ca-Zusatz in nÄq./Ansatz, Calceinkonzentration in mM/l.

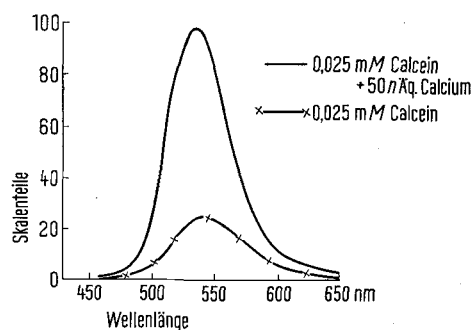


Fig. 2. Emissionsspektrum des Calcein und des Ca-Calcein-Komplexes. Anregung: 480 nm Wellenlänge. Ca-Zusatz in nÄq./Ansatz, Calceinkonzentration in mM/l.

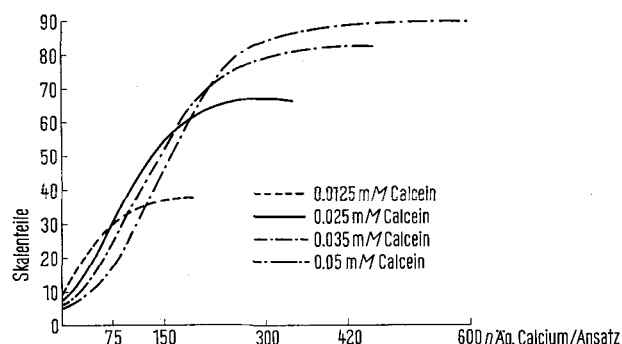


Fig. 3. Eichkurven bei verschiedenen Calceinkonzentrationen.

Die Lösungen wurden mit quartzdestilliertem Wasser hergestellt und in Polyäthylenflaschen aufbewahrt: (a) 3 mM Calcein (Fluka). (b) CaCl_2 -Standard 0,5 mM. (c) Chininsulfat-Standard ($3,5 \cdot 10^{-6}$ g/ml in 0,1N H_2SO_4). (d) 3M KOH. (e) 0,1N und 1% HCl. (f) Veraschungsgemisch (65%ige HNO_3 und 60%ige HClO_4 1:1). (g) 2 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$.

Ca-Eichkurven wurden bei verschiedenen Calcein-Konzentrationen aufgenommen (Figur 3). Zusammensetzung des Küvetteninhalts (insgesamt 3 ml): 0,5 ml 3M KOH; 0,25 ml 0,1N HCl; verschiedene Mengen Ca-Standardlösung; Aqua bidest.; verschiedene Mengen Calceinlösung (Reihenfolge der Zugabe). Bei konstanter Calceinkonzentration ergibt sich eine S-förmige Eichkurve. Der für Messungen optimale lineare Bereich hängt nach Lage und Ausdehnung von der Calcein-Konzentration ab (Tabelle I). Ist diese möglichst niedrig, so erhält man eine hohe Messgenauigkeit. Zur Erweiterung des Messbereiches kann eine Ca-Vorgabe bei hohen Calcein-Konzentrationen vorgenommen werden.

Gewebeaufschluss. Proben von Meerschweinenvorhöfen und -ventrikeln (5–100 mg) wurden in Duranglasröhrchen nach Zusatz von 0,15 ml Veraschungsgemisch pro 20 mg Feuchtgewicht in einem elektrisch geheizten Aluminiumblock nass verascht. Nach Aufheizen auf 140°C während 120 min wurde in den folgenden 60 min eine Temperatur von 210°C erreicht und bis zum Ende der Veraschung konstant gehalten. Müssen höhere Temperaturen gewählt werden, so bilden sich aus den organischen Phosphor-Verbindungen des Gewebes Meta- und Polyphosphate³, welche Ca^{2+} stärker komplex binden als Calcein und dadurch die Messung stören. Diese «negative Kontamination»⁴ kann durch Hydrolyse der Polyphosphate (0,1N HCl, 80–95°C, mindestens 10 h) behoben werden.

Messungen. Die Veraschrückstände wurden in 0,3 ml 0,1N HCl pro 20 mg Feuchtgewicht gelöst, eventuell wurde mit Aqua bidest. weiter verdünnt. Ein aliquoter Teil wurde zur Ca-Bestimmung entnommen. Die Wahl der Calceinkonzentration richtete sich nach dem zu erwartenden Messwert. Zur Vermeidung von Ca-Kontaminationen der Küvetten wurde nach jeder Messung mit H_2O , 1% HCl, $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ und mehrmals mit Aqua bidest. gespült. Die Veraschröhrchen wurden 12 h in Chromschwefelsäure gelegt, dann wie die Küvetten behandelt.

Um einen Ca-Konzentrationsunterschied von 10 nÄq./Ansatz statistisch sichern zu können ($0,02 > p > 0,01$), sind jeweils 4–5 Einzelmessungen nötig. Bei

Tabelle I. Lineare Messbereiche bei verschiedenen Calceinkonzentrationen

| Calceinkonzentration | Linearer Bereich nÄq. Ca/Ansatz |
|----------------------|------------------------------------|
| 0,0125 mM | 10–60 |
| 0,0250 mM | 40–110 |
| 0,0350 mM | 60–160 |
| 0,0500 mM | 80–200 |

³ A. F. HOLLEMAN und E. WIBERG, *Anorganische Chemie* (Walter de Gruyter und Co., Berlin 1947), p. 254.

⁴ R. E. THIERS, *Meth. biochem. Analysis* 5, 273 (1957).

einem Ca-Gehalt von 3 mÄq./kg Feuchtgewicht werden zur Bestimmung 6–10 mg Gewebe benötigt. Man kann die Messgenauigkeit durch Verminderung von Pipettierfehlern steigern, indem man ein einheitliches Gemisch von Calceinlösung:KOH:Aqua bidest. in den angegebenen Relationen herstellt und dann zu den gelösten Muskelproben in gleichen Mengen direkt zusetzt. Diese Messansätze verlieren in 6 h nur 2% ihrer Fluoreszenz.

Tabelle II. Wiedergewinnung zugesetzter Ca-Mengen (angegeben sind Mittelwerte \pm mittlere Fehler der Mittelwerte von jeweils 10 Bestimmungen)

| Zusatz nÄq. Ca | Wiedergefunden nÄq. Ca | % |
|-------------------|---------------------------|--------------|
| 50 | 56 \pm 8 | 112 \pm 16 |
| 100 | 105 \pm 4 | 105 \pm 4 |
| 150 | 148 \pm 4 | 99 \pm 3 |
| 200 | 205 \pm 3 | 103 \pm 2 |
| 250 | 252 \pm 2 | 101 \pm 1 |

Tabelle III. Zusatz von Stör-Ionen zu einem Ca-Standard von 200 nÄq., %-Abweichung der ermittelten Ca-Menge vom Sollwert

| Zusatz | 500 | 1000 | 2500 | 5000 | 10000 nÄq. |
|-------------------------------|---------|-------|-------|-------|------------|
| Mg ²⁺ | — 2,0 | + 4,5 | + 6,0 | — | — % |
| Zn ²⁺ | \pm 0 | + 1,0 | + 6,1 | — | — % |
| PO ₄ ³⁻ | \pm 0 | — 0,9 | — 1,2 | — 0,5 | — 8,0% |

Trotzdem empfiehlt es sich, die Messungen zu einem definierten Zeitpunkt nach Herstellung der Messansätze vorzunehmen.

Innerer Standard. Veraschten Proben von Meerschweinchenventrikeln wurden nach erfolgter Ca-Bestimmung (Ca-Konzentrationen 301 \pm 6 nÄq./100 mg Feuchtgewicht; Ca-Gehalt der Ansätze 50–350 nÄq.) definierte Mengen der Ca-Standardlösung zugesetzt, dann wurde erneut verascht und in jeweils 10 Ansätzen nochmals der Ca-Gehalt ermittelt. Tabelle II gibt Aufschluss über die wiedergefundenen Ca-Mengen, im Mittel 104 \pm 5%. Die Abweichung ist bei niedrigen Zusätzen am grössten, vermutlich wegen grösserer Pipettierfehler.

Zusatz von Stör-Ionen. Zu einem Ca²⁺-Standard von 200 nÄq. wurden verschiedene Mengen Mg²⁺, Zn²⁺- oder PO₄³⁻-Ionen zugesetzt. Nach Veraschung wurde der Ca-Gehalt ermittelt und die mittleren prozentualen Abweichungen vom Ca-Standard für jeweils 10 Einzelmessungen berechnet (Tabelle 3). Die Ergebnisse zeigen, dass die Ca-Bestimmung erst durch Konzentrationen dieser Ionen beeinflusst wird, die unter biologischen Verhältnissen nicht zu erwarten sind.

Summary. A method for fluorometric estimation of micro-amounts of calcium (about 10 nEq./sample) in biological materials using calcein as indicator. Its applicability to heart muscle specimens (6–100 mg wet weight) and its limitation by interfering substances are described.

H. M. V. HATTINGBERG, W. KLAUS,
H. LÜLLMANN und S. ZEPF

Pharmakologisches Institut der Universität, 65 Mainz,
und Pharmakologisches Institut der Universität, 23 Kiel
(Deutschland), 27. Dezember 1965.

Growth of *Aedes aegypti* Embryonic Cells and Tissues in vitro

In a previous paper¹, the cultivation of tissues from newly hatched *Aedes aegypti* larvae was reported. Under the experimental conditions used, the first appearance of cells outside the explant was observed only after 8–10 days. The number of cells then slowly increased and mitotic figures were observed even in 5-month-old cultures, but the extent of growth was generally small and limited to the vicinity of the explant. In the present communication, some further progress in the field of mosquito tissue culture is reported by growing cells from wholly or partially disintegrated *Aedes aegypti* embryos.

Pools of eggs which were deposited during a 48 h period, containing non-uniformly developed embryos, were found to give the most satisfactory results. The eggs, after being removed from the filter paper, were placed in sterile water containing the following antibiotics per ml, penicillin 500 U, streptomycin 250 U and mycostatin 100 U, and were left there for 30 min at 37°C. After 2 additional treatments as above, the eggs were immersed for 5 min in 0.05% HgCl₂ in 70% ethyl alcohol, followed by rinsing in 7 changes of sterile water and once in the culture medium. The sterilized eggs were then homo-

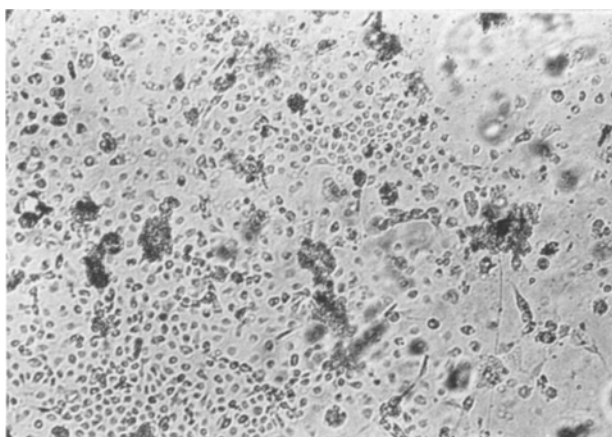


Fig. 1. 10-day-old culture grown in Leighton tube (\times 100).

¹ J. PELEG, Nature 206, 427 (1965).