

Relation entre l'activité anticomplémentaire du sérum décomplémenté et les états glycémiques chez le rat

		No. de rats examinés	Poids corporel g ($\bar{x}$)	Glycémie mg/100 ml ($\bar{x}$)	Unités C'H ₅₀ inhibées % ($\bar{x} \pm$ S.E.)	P
Groupe I	hypoglycémique	5	287	40	$39,80 \pm 1,015$	GI:GII; $P < 0,01$ GI:GIII; $P < 0,01$
Groupe II	normoglycémique	6	327	150	$35,65 \pm 0,421$	GII:GIII; $P < 0,1$
Groupe III	hyperglycémique	5	318	250+	$32,14 \pm 1,682$	

Six rats mâles, Wistar, pesant 225–400 g furent soumis au cours de 3 semaines, consécutivement aux états hypo, normo et hyperglycémique. 4 ml de sang furent soutirés à la jugulaire, sous anesthésie à l'éther, une fois par semaine. Le sérum fut séparé et immédiatement mis en expérience. L'état hyperglycémique fut produit par l'injection de 8 mmoles de glucose/100 g de p.c. par voie s.c., 1 h avant la prise de sang. L'état hypoglycémique fut obtenu par un jeûne de 18 h suivi d'une injection de 1 μ /100 g de p.c. par voie s.c. d'insuline Zn (Connaught, 'Insulin Toronto') 1 h avant la prise de sang. La glycémie fut déterminée par le test du Dextrostix (Ames Co.).

Les moyennes, les erreurs standard et les valeurs P furent déterminées selon les méthodes usuelles⁷ pour chacun des 3 états glycémiques.

Résultats et discussion. Le sérum décomplémenté de rat inhibe l'hémolyse des érythrocytes de mouton en présence d'anticorps spécifiques, et du complément de cobaye. L'effet inhibiteur persiste jusqu'à une dilution du sérum de rat allant de 1:16 à 1:32. Au cours des expériences présentes la dilution de 1:8 fut employée.

L'état glycémique du rat détermine le degré d'activité anticomplémentaire dans le sérum décomplémenté. Le sérum provenant de rats hypoglycémiques démontre une activité anticomplémentaire plus forte que le sérum de rats normo ou hyperglycémique ($P < 0,01$). Le sérum de rat hyperglycémique démontre l'activité anticomplémentaire la plus faible (Tableau).

La relation inverse entre le degré d'activité anticomplémentaire des séra décomplémentés et le niveau de la glycémie s'observait chez tous les rats étudiés (Figure).

Une plus forte augmentation d'activité anticomplémentaire a lieu en allant de l'état normo à l'état hypoglycémique, qu'en allant de l'état hyper à l'état normoglycémique (Tableau).

Summary. The anticomplementary activity of decomplicated rat serum was determined using a technique of inhibition of guinea-pig complement in a 50% hemolysis system. The anticomplementary activity of the serum varies inversely to the glycemic state of the rats, being highest in the serum from hypo, and lowest in that of hyperglycemic animals.

V. W. ADAMKIEWICZ et I. M. JANKOWSKA

Département de Microbiologie et d'Immunologie,
Faculté de Médecine, Université de Montréal (Canada),
28 octobre 1968.

⁷ R. A. FISHER et F. YATES, *Statistical Tables for Biological Agricultural and Medical Researchers* 2nd edn (Oliver, London 1943).

Gewinnung präzipitierender Insulin-Antikörper von der Ziege, *Caper domesticus*

Die immunogene Eigenschaft des Insulins wurde durch die gelungene Erzeugung von Antiseren gegen verschiedene artspezifische Insuline bei einer Reihe von Tierarten unter Beweis gestellt^{1,2}, wobei jedoch nur selten präzipitierende Insulin-Antikörper auffindbar waren^{3–6}, so dass deren Existenz noch immer angezweifelt wird⁷.

Im Zusammenhang mit Untersuchungen zur Ätiopathogenese des Diabetes mellitus arbeiten wir an der chemischen und biologischen Charakterisierung von Insulin-Antikörpern (IAK), wozu sich die Bereitstellung grösserer Mengen präzipitierender IAK (PIAK) erforderlich macht. Wir versuchten deshalb, nachdem es uns auch gelungen war, PIAK gegen Rinderinsulin am Meeresschweinchen zu erzeugen, entsprechende Immunisierungen an der Ziege vorzunehmen.

Dazu gaben wir männlichen Ziegen (*Caper domesticus*, 20–30 kg) zehnfach rekristallisiertes Rinderinsulin (VEB

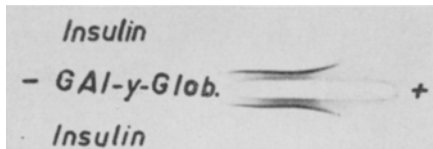
Berlin-Chemie) in komplettem Freundschens Adjuvans⁸. Die Injektionen wurden insgesamt viermal in Abständen von jeweils 4 Wochen verabreicht; die oft sehr protrahiert auftretenden hypoglykämischen Reaktionen beherrschten wir durch Glukosegaben (per os bzw. i.v.). 3 Wochen nach der letzten Insulinapplikation erfolgte die Entblutung durch Herzpunktion mit rascher Gewinnung des Serums, das bei -20°C zur Lagerung kam.

Während der Immunisierungsperiode fanden wiederholte Überprüfungen des IAK-Titers im Serum mittels des Agargel-Präzipitationstests nach OUCHTERLONY⁹ statt (Agargel 1,2%, Insulin bzw. Serum in Veronalpuffer pH 8,6).

Aus dem Ziegen-Antiinsulinserum (vorgeschlagener Terminus: GAIS = goat anti-insulin-serum) wurde das Immunglobulin nach der von Voss¹⁰ für die Gewinnung von γ -Globulinen aus Kaninchenimmuns serum beschrieben

benen Methode isoliert: in GAIS wird bei 4°C unter kräftigem Rühren tropfenweise ein Aliquot von 3,2 M Ammoniumsulfat (in NaCl 0,9%) eingebracht, der Niederschlag in der Kälte abzentrifugiert, zweimal gewaschen, in NaCl 0,9% aufgenommen und über eine Sephadex-G-50-Säule entsalzt; abschliessend erfolgen Reinigung über DEAE-Sephadex A 50 und Konzentrierung mittels Druckfiltration (Ultrafilter Lsg 60 Sartorius Göttingen). Das gewonnene GAI- γ -Globulin ist eine elektrophoretisch einheitliche Fraktion; die Ausbildung einer starken Präzipitationslinie mit Rinderinsulin in der Immunelektrophorese (Figur) weist einen hohen Anteil von PIAK im GAI- γ -Globulin aus.

Mit unseren Befunden ist erneut der Beweis erbracht, dass es gelingt, präzipitierende IAK zu erzeugen und dazu eine Spezies heranzuziehen, die grosse Mengen eines einheitlichen hochtitrigen Antiserums zu gewinnen erlaubt. An der Isolierung der PIAK aus GAI- γ -Globulin und deren physikochemischer Charakterisierung wird gegenwärtig noch gearbeitet¹¹.



Immunelektrophoretischer Nachweis der PIAK im GAI- γ -Globulin.

Summary. Antiserum was produced against beef insulin in male goats (goat anti-insulin-serum). It contains precipitating insulin antibodies; they were identified by immunoelectrophoresis as a fraction of γ -globulin.

M. ZIEGLER und H. G. LIPPMANN

*Institut für Diabetes «Gerhard Katsch»,
Bereich experimentelle Diabetesforschung,
2201 Karlsburg/Greifswald (DDR), 23. September 1968.*

- ¹ K. BRUNFELDT und T. DECKERT, *Acta endocr., Copenh.* 47, 353 (1964).
- ² E. R. ARQUILLA und J. FINN, *J. exp. Med.* 122, 771 (1965).
- ³ P. J. MOLONEY und M. A. APRILE, *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 793 (1959).
- ⁴ O. J. BIRKENSHAW, S. S. RANDALL und P. C. RISDALL, *Nature* 193, 1089 (1962).
- ⁵ Y. HIRATA und H. T. BLUMENTHAL, *J. Lab. clin. Med.* 62, 683 (1963).
- ⁶ H. FINGER, W. SCHAEF und H. NIEMANN, *Z. Immun. allg. klin. Immun.* 134, 293 (1967).
- ⁷ J. H. HUMPHREY und R. G. WHITE, in *Immunology for Students of Medicine* (Blackwell Scientific Publications, Oxford 1965), p. 446.
- ⁸ J. FREUND und M. V. BONANTO, *J. Immun.* 48, 325 (1944).
- ⁹ O. OUCHTERLONY, *Acta path. microbiol. scand.* 26, 507 (1949).
- ¹⁰ H. VOSS, G. HENNEBERG, R. HERRMANN, H. PICHL, S. SCHULTE-OBERBERG und H. WERNER, *Zbl. Bact. Orig.* 1, 203 (1967).
- ¹¹ Die Untersuchungen wurden mit Mitteln eines Forschungsauftrages des Ministeriums für Gesundheitswesen der DDR durchgeführt.

Modified in vitro Assay for Melanocyte-Stimulating Hormone

A method for increasing the sensitivity of the in vitro bioassay¹ for melanocyte-stimulating hormone (MSH) has been recently reported². The present communication describes some modifications of this assay method which decrease its variability.

Methods. The equipment used for this assay has been described by LONG and GUILLEMIN³. The gray enamel standard reflects approximately 28% of the light which is supplied by the Photovolt Photoelectric Reflection Meter model 610 and is used to set the reflectance scale at 100. The procedure of GESCHWIND and HUSEBY² is followed, except that reflectance readings with MSH standard (A_1) are obtained before addition of the unknown sample (A_2) and the treated skins are rinsed twice with Ringer's solution during the 1 h equilibration periods.

A 3 factor factorial experiment was designed to evaluate the effects of the following on the variation of the assay procedure: (A) constant illumination of the frogs, (B) pretreatment of the frog skins with MSH, and (C) application of 2 rules for selection of suitable skins.

Exposure of the frogs to constant illumination (900 foot candles) was accomplished by means of fluorescent lights placed approximately 15 cm above the frogs for at least 48 h. Control frogs were kept in darkness for the same period of time.

Pretreatment of each frog skin with 1 unit of MSH for 1 h was followed by a rinse with Ringer's solution for 1 h. This preceded the usual addition of 1 unit of MSH standard which resulted in the A_1 reading.

The first selection rule requires that a frog skin must give an initial response of at least 8 reflectance units to

qualify for use in the assay. The second skin selection stipulates that 1 h after treatment with 1 unit of MSH standard, the light reflectance of the frog skin must be similar to its original value. Since the failure of a skin to return exactly to its baseline state of pigmentary dispersion will be a function of its initial sensitivity to the standard MSH, the following arbitrary values were used for the second rule: if the initial response (A_1) to the 1 unit of MSH standard is 8–10 reflectance units, the frog skin must return exactly to the original value; if 11–20, it must return to within 1 reflectance unit; if 21–30 to within 2 reflectance units; if over 30, to within 3 reflectance units.

In order to examine the potential effects and interaction of the 3 sources of variation just indicated, an analysis of variance of the within cell variances was performed. Since sample variances are distributed as χ^2 square variables, a square root transformation was made, thus satisfying the requirement of normality by the analysis of variance. The sampling provided the required independence. The response to 0.5 units of MSH was utilized as the 'unknown' and designated A_2 .

Results and discussion. The results of the analysis of variance of the experimental variances after light, pre-

- ¹ K. SHIZUME, A. B. LERNER und T. B. FITZPATRICK, *Endocrinology* 54, 553 (1954).
- ² I. I. GESCHWIND und R. A. HUSEBY, *Endocrinology* 79, 97 (1966).
- ³ J. M. LONG und R. GUILLEMIN, *Experientia* 17, 132 (1961).