

Kallikrein like activity in 1 ml of urine expressed in ng bradykinin oxytocic equivalent effect

No. of experiment	Days after operation	Strain	Group of rats				Blood pressure
			Normal	Uninephrectomized	Fig of 8 in one kidney	Fig of 8 uninephrectomized hypertensive	
I	48	Wistar	745 ± 113 (4)	300 ± 48 (4)	280 ± 83 (4)	40 ± 10 (5)	158
II	90	Wistar	950 ± 103 (4)		480 ± 112 (11)	27 ± 14 (6)	165
III	101	Wistar	520 ± 82 (8)	355 ± 70 (6)	370 ± 92 (8)	30 ± 12 (6)	155
IV	70	Sprague Dawley	450 ± 72 (10)	310 ± 88 (6)		< 10 (8)	192 ± 18
	75	Sprague Dawley		285 ± 81 (4)		< 10 (9)	188 ± 15.5
	84	Sprague Dawley		200 ± 53 (9)		< 10 (10)	188 ± 15.5
	108	Sprague Dawley	420 ± 83 (10)	270 ± 78 (9)		< 10 (8)	190 ± 15

Mean values and S.D. of the KA found in 1 ml of urine, expressed in ng of bradykinin. Figures in parenthesis correspond to the number of animals used in each group. Different series of animals were used for the experiments I, II and III. The figures for the KA were obtained in a single experiment carried out after the kidney removal, on the day shown in the second column. The experiment IV correspond to one serie of Sprague-Dawley rats, studied at different intervals (days) after the kidney extirpation.

The results shown in the Table provide the mean value and standard deviation of the KA per ml of urine of the different groups of animals. In the normal Wistar and Sprague-Dawley rats, the average of the KA was equivalent to 725 ng and 435 ng of bradykinin respectively. The reduction of the renal tissue or a figure-in-8-ligature in one kidney induce a decrease in the KA shortly after the operation. After one kidney removal KA diminishes by 65% (Wistar) and 45% (Sprague Dawley). The group c) of animals which had figure-of-8-ligature in one kidney but the other one was left untouched, showed similar diminution to that found in the uninephrectomized (350 ng). All the animals of the groups a), b) and c) exhibited normal blood pressure through the experimental period. The group d) of uninephrectomized rats with a figure-of-8-ligature in the remnant kidney which developed high levels of arterial blood pressure, showed an invariably striking fall in the KA which persisted until death ensued. The lowest KA, less than 50 to 10 ng bradykinin per ml, was found in those rats whose arterial blood pressure was constantly high, 155 Hg or higher (Table). The rats of this group which did not develop hypertension, had in their urine a significantly higher titer of KA as compared to the hypertensive ones. A few animals of group d) whose blood pressure remained stabilized at normal level had KA similar or somewhat less than that found in the uninephrectomized rat. When the animal showed a moderate or fluctuating blood pressure, the KA changed from one week to the other. In general, rats with moderate hypertension exhibited KA which was 20-30% below that found in the uninephrectomized but much above the low values constantly recorded in the severe hypertensive rats. In rats with a transient elevation in the blood pressure, low KA was

found during the hypertension period, whereas it increased very much, approaching the levels found in uninephrectomized rats, as soon as the blood pressure was spontaneously restored to normal.

The data support the concept that in general there is an inverse correlation between the blood pressure and the KA in the urine. The same differences in the KA found in the freshly voided urine of the different groups of rats were confirmed on testing the purified materials obtained from the corresponding pooled urine. On the other hand, parallel results using the blood pressure assay were gained either with urine or purified fractions. In order to purify the active substance, further dialysis, acetone precipitation, gel filtration on Sephadex G 100 and Sephadex G 200 were used.

Although the experiments do not provide evidence that KA in the urine is involved in the mechanism of renal hypertension, it is of paramount importance that this activity is inversely correlated with arterial blood pressure. It is possible to assume that KA in the urine reflects the kidney impairment which leads to the renal hypertension development.

Résumé. La ligature «en figure huit» d'un rein suivie de l'ablation de l'organ contralatéral, est accompagnée d'une remarquable amoindrissement de l'activité kallikreine urinaire pourvu que les animaux développent une pression artérielle permanente et élevée.

H. R. CROXATTO and M. SAN MARTÍN

Universidad Católica, Laboratorio de Fisiología,
Casilla 114-D, Santiago (Chile), 11 May 1970.

Action de différents mélanges gazeux sur l'artère mésentérique de l'embryon de poulet explantée in vitro¹

Au cours d'expériences précédentes nous avions cultivé l'artère mésentérique d'embryon de poulet avec la méthode de culture organo-typique selon WOLFF et HAF-FEN²⁻⁴. Avec cette méthode les explants manifestaient, déjà après 1 jour de culture, des signes manifestes de

souffrance: dégénérescence lipidique, dédifférenciation de la musculature, fibrose de la paroi. Nous avons pensé qu'à l'origine de ces phénomènes il pouvait y avoir un apport inadéquat d'oxygène, empêchant une bonne survie de la paroi artérielle.

Pour vérifier la validité de cette hypothèse on a apporté une légère modification à la technique de culture organotypique de WOLFF⁵. Les petites salières, contenant le milieu de culture et les explants, au lieu d'être fermées et scellées à la paraffine, sont déposées ouvertes dans un dessicateur en verre, sur le fond duquel il y a une couche d'ouate imbibée d'eau distillée, pour maintenir l'humidité. Le dessicateur est ensuite fermé et le bord du couvercle scellé à la paraffine. Par cette variante, augmentant considérablement le volume de l'atmosphère gazeuse avec laquelle les explants viennent en contact, les résultats obtenus ont été sensiblement meilleurs et les artères explantées survivent mieux *in vitro*.

Vue l'action favorable d'une atmosphère plus riche en oxygène⁵ par rapport à celle de notre technique initiale, il nous a paru intéressant de poursuivre ces expériences pour vérifier l'action de différents mélanges gazeux sur les artères cultivées (artère mésentérique d'embryons de poulet de 15 jours d'incubation).

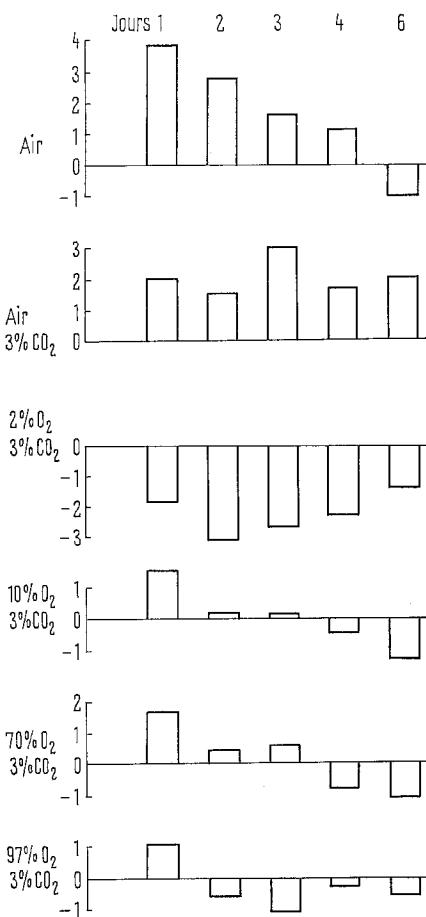
Le mélange gazeux voulu est introduit dans le dessicateur à travers un bouchon en caoutchouc avec 2 canules en verre: l'une d'entrée, l'autre de sortie.

Un problème technique qui s'est présenté au départ a été le suivant: on voulait maintenir, dans tous les mélanges gazeux expérimentés, toujours le pourcentage de CO₂ existant dans l'air normal (0,03%). Mais avec le dispositif très simple dont nous disposions, et tenant compte aussi de la petite quantité de gaz que nous introduisions dans le dessicateur, il ne nous a pas été possible d'arriver à doser exactement le faible pourcentage de CO₂ désiré. Pour parer à cet inconvénient, on a procédé de la manière suivante: on a testé d'abord, sur les artères explantées, l'action d'atmosphères gazeuses formées par l'air atmosphérique avec différentes concentrations de CO₂. Les résultats obtenus nous ont révélé que le 3% de CO₂ représentait la quantité la plus adéquate pour une bonne survie de la paroi artérielle. Par conséquent, au cours des expériences ultérieures, dans tous nos mélanges gazeux il y avait toujours cette concentration fixe de CO₂: le 3%. Les mélanges gazeux de la chambre de culture sont différents: on a cultivé avec de l'air normal (concentration en oxygène environ 20–21%, et en CO₂ environ 0,03%); air normal avec l'adjonction du 3% de CO₂; en hypoxie plus ou moins poussée: 2–10% d'O₂; jusqu'à des atmosphères fortement hyperoxiques 70–97% d'O₂, toujours avec une concentration de 3% de CO₂. Le volume restant du gaz pour arriver à 100% était représenté par l'N₂.

Les explants sont prélevés après 1, 2, 3, 4 et 6 jours de culture. Chaque dessicateur contient 14 salières, disposées sur 2 étages. Lors de l'ouverture du dessicateur, pour prélever les explants déposés dans une salière, on opère stérilement et le mélange gazeux est renouvelé chaque fois. Les artères sont fixées au Carnoy, incluses à la paraffine, et les coupes sont colorées avec les méthodes de colorations histologiques habituelles: HE, Azan, Ladewig et résorcine-fuchsine pour la mise en évidence du matériel élastique.

Au moment de l'explantation, l'artère mésentérique de l'embryon de 15 jours d'incubation montre deux couches de musculature bien distinctes, l'une interne circulaire, l'autre externe longitudinale. La morphologie des cellules de la couche interne circulaire n'a pas encore atteint le caractère musculaire définitif et les cellules présentent parfois un certain aspect mésenchimatisque. Les fibres élastiques sont peu abondantes, l'on distingue à peine le plexus elasticus externus et la membrane élastique interne; au sein de la media, quelques fibres minces extrêmement rares sont distribuées sans ordre un peu partout.

Si nous explantons en culture cette artère et la cultivons en présence d'air normal pendant 24 heures, la musculature poursuit son développement, on n'observe pas de signes de souffrance et le matériel élastique se développe aussi. En poursuivant la période de culture, toujours dans l'air normal, des rares vacuoles commencent à apparaître au sein de l'adventice après trois jours; le vaisseau devient un peu hypotrophié, mais les fibres élastiques sont toujours abondantes. Ce n'est qu'après 6 jours de culture que la paroi artérielle est presque totalement transformée en tissu conjonctif. Les vacuoles lipidiques au sein de la musculature longitudinale, qui entre-temps a à peu près totalement disparu, sont plus nombreuses; seules quelques cellules de la couche musculaire interne circulaire persistent autour de



Résumé de 6 groupes d'expériences. Les colonnes de chaque série représentent la moyenne des valeurs que l'on a attribuées aux explants, en se basant sur la morphologie et l'état de conservation de la paroi artérielle.

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

2 G. CONTI et B. CAPPELLI, *Experientia* 24, 1050 (1968).

3 G. CONTI et B. CAPPELLI, *Bull. Ass. Anat.* 141, 728 (1968).

4 B. CAPPELLI, G. CONTI, L. LASZT et B. MANDI, *Angiologica* 5, 28 (1968).

5 B. CAPPELLI-GOTZOS, V. GOTZOS et G. CONTI, *Experientia* 26, 158 (1970).

la lumière vasculaire, mais elles sont mal conservées. La paroi du vaisseau est fortement hypotrophique, et son diamètre transversal représente environ le tiers par rapport à celui que l'artère montrait au moment de l'explantation.

Si nous ajoutons à l'air atmosphérique le 3% de CO₂, les résultats obtenus sont les suivants: après 1 jour de culture, l'artère est en bon état de conservation, malgré que sa musculature paraisse hypotrophiée et que des vacuoles lipidiques soient visibles dans l'adventice. Même après 6 jours de culture, une certaine quantité de musculature persiste, et l'aspect du vaisseau est nettement et constamment meilleur par rapport à l'artère cultivée pendant 6 jours dans de l'air normal. Le matériel élastique se maintient toujours abondant pendant toute la période de culture.

Les résultats que l'on obtient changent notablement si nous cultivons nos artères dans une atmosphère d'hypoxie. Avec le 2% d'oxygène, déjà après 1 seul jour de culture, la structure normale de la paroi artérielle est entièrement bouleversée, la musculature a totalement disparu et les vacuoles lipidiques sont très nombreuses. Après 6 jours de culture, la paroi artérielle montre moins de vacuoles, mais la fibrose l'emporte nettement. Il est toutefois intéressant de souligner que dans la paroi des artères, cultivées dans cette atmosphère hypoxique se révèlent hautement toxiques pour les cellules musculaires, le matériel élastique poursuit sa croissance et ne semble pas ressentir des conditions gazeuses très défavorables.

En augmentant la quantité d'oxygène à 10%, taux qui est toujours nettement inférieur par rapport à la quantité d'O₂ présente dans l'air normal, on observe à peu près les mêmes phénomènes de dégénérescence qu'avec la concentration de 2%. Toutefois les signes de souffrance sont moins accusés, surtout pendant les 3 premiers jours de culture. Une donnée nous a frappés au cours de cette expérience: le matériel élastique diminue en quantité dans la paroi des artères explantées.

Lorsque nous cultivons nos artères dans des conditions opposées, c'est-à-dire en hyperoxie, les résultats sont les suivants: avec le 70% d'oxygène les artères vivent moins bien que dans l'air normal. Les images que l'on observe dans ce cas sont à peu près superposables à celles que l'on voit en hypoxie avec le 10% d'oxygène. Seul le matériel élastique poursuit sa croissance *in vitro*.

Mais si l'on monte encore avec le niveau d'hyperoxie (97% d'oxygène), on obtient des résultats qui sont sensiblement différents après 1 jour de culture et dans les périodes plus prolongées de l'explantation. Après 24 h l'artère montre des signes de souffrance, sa morphologie n'est pas comparable à celle de l'artère cultivée dans l'air normal mais elle est nettement meilleure que celle de l'artère cultivée en hypoxie très poussée (2% d'O₂). La période de culture se prolongeant, les phénomènes d'hypotrophie, de sclérose et de dégénérescence lipidique deviennent très marqués; mais le matériel élastique reste toujours bien présent même dans ces conditions.

Le tableau que nous publions dans ce texte résume les 6 groupes d'expériences, et les données que l'on vient de décrire. Les colonnes de chaque série représentent la moyenne des valeurs que l'on a attribuées aux explants, en nous basant sur la morphologie et l'état de conservation de la paroi artérielle. Ces valeurs sont naturellement arbitraires, et sont soumises inévitablement aux erreurs possibles, liées à une appréciation microscopique subjective. Les valeurs sont établies selon le système des + et des -, en partant d'une valeur de +++ donnée aux artères les mieux conservées, telle par exemple que l'artère de contrôle non cultivée. Lorsque les artères ont été examinées au microscope, nous ignorions le genre

d'expérience exécutée et aussi la durée de la culture. De plus, on a répété plusieurs fois le même examen, par des observateurs différents, et les données obtenues coïncidaient toujours. Nous pensons par conséquent que, malgré la méthode subjective d'appréciation, les données rapportées dans le tableau ont une valeur objective acceptable.

La colonne la plus haute correspond aux artères les mieux conservées, la ligne horizontale de chaque groupe correspond à la valeur arbitraire 0; les colonnes se trouvant au dessous de la ligne horizontale correspondent à des valeurs de 1 ou plusieurs moins, c'est-à-dire elles nous montrent des artères mal, ou très mal conservées et dégénérées.

Les 2 premières séries d'en haut, nous montrent le comportement des artères cultivées pendant des périodes allant de 1 à 6 jours, dans un milieu gazeux constitué par l'air atmosphérique normal et l'air avec adjonction du 3% de CO₂. Dans ce dernier cas les artères semblent vivre mieux, et cela s'apprécie particulièrement après 3, 4 et 6 jours de culture. Nous pensons que cette quantité de CO₂ développe une action favorable à la survie des explants. Mais il reste alors à nous demander pourquoi pendant les 2 premiers jours de culture le phénomène va légèrement dans le sens opposé, c'est-à-dire que les artères vivent mieux dans l'air normal. Ce comportement particulier pourrait être l'indice d'une acidification du milieu de culture par le CO₂, que les artères supportent moins bien dans la première phase de l'explantation, lorsqu'elles passent de leur milieu naturel *in vivo* au milieu artificiel *in vitro*.

L'effet toxique le plus marqué est provoqué par la concentration de 2% d'oxygène qui, déjà après un seul jour de culture, produit une forte dégénérescence de la paroi artérielle.

Avec le 10% d'oxygène la dégénérescence et la dédifférenciation de la paroi artérielle sont beaucoup plus rapides et plus marquées que dans les cultures où les mélanges gazeux étaient constitués par l'air (~20% d'oxygène). Les mêmes phénomènes observés avec le 10% d'oxygène se manifestent dans l'ensemble avec les concentrations de 70% et de 97% d'O₂; c'est avec cette dernière concentration que les signes de souffrance sont les plus évidents.

Les résultats de nos expériences montrent, comme d'ailleurs il fallait s'y attendre, que les artères vivent le mieux dans l'air atmosphérique; que les conditions les pires sont représentées par l'hypoxie très marquée (2% d'O₂); que les conditions d'hyperoxie sont également toxiques pour les artères, mais à un degré moins important par rapport à l'état d'hypoxie.

Summary. The effect of various gas mixtures on the mesenteric artery of chicken embryo explanted *in vitro* has been studied. The explants were cultivated in normal air, with addition of 3% of CO₂, and in hypo- and hyperoxic atmosphere. The best survival of explanted arteries is obtained with atmospheric air. The hypoxic gas mixture (2% O₂) has the most toxic effect on the explants. The hyperoxic conditions show also a toxic effect, but in a lesser degree than hypoxic conditions.

B. CAPPELLI-GOTZOS,
G. CONTI et V. GOTZOS

*Institut d'Histologie et d'Embryologie générale
de l'Université, CH-1700 Fribourg (Suisse),
le 13 mai 1970.*