

of several hours, flattened on the tube wall if allowed to settle and retain contact. In the 'still' tube, cells flattened and grew as a monolayer (Figures 3A and B). If the liquid paraffin was replaced by tissue culture medium, the oscillations caused a rapid and controllable jet of medium distal to the orifice (Stoker¹¹).

Discussion. Cells in oscillating columns of culture medium could not settle. Cells at the centre of such columns moved more rapidly than those at the periphery, hence collisions occurred. Stable clustering at sites determined by oscillator frequency indicates an harmonic effect, and this with the gathering at the menisci show that factors other than collision and shearing apart were involved in these experiments. Control and test cultures were viable and of greatest importance, could be observed during formation without the interference of a static surface.

The method reduces the number of cells and medium volume considerably, compared with suspension techni-

ques previously described, and allows observation of form and size throughout experiments. It has been suggested that numerical assessment of aggregation is feasible.

Résumé. Description d'un appareil pour l'étude de la réaggrégation des cellules. Observation de la formation d'agrégats individuels ne comprenant que de très petits nombres de cellules. Les cellules individuelles et les agrégats sont maintenus en suspension dans une colonne liquide oscillante.

P.N. RIDDLE

*Cinematography Laboratory
Imperial Cancer Research Fund,
44 Lincoln's Inn Fields,
London WC2A 3PX (England), 27 August 1973.*

¹¹ M. G. P. STOKER, *Nature Lond.*, **246**, 200 (1973).

Freies Thyroxin im Serum durch Ultrafiltration

Während die quantitative Erfassung der Schilddrüsenhormone durch Radioimmunoassay (Trijodthyronin, T₃) und Proteinbindungsanalyse (Thyroxin, T₄) routinemässig durchgeführt werden kann, fehlen bisher rasch durchführbare Nachweismethoden für den nicht an Trägerproteine gebundenen Anteil (FT₄). Dieser tritt in Beziehung zu Rezeptoren der Zellmembran und vermittelt die biologische Wirkung des Hormons. Da die T₄-Affinität der Proteine variabel sein kann, ist die FT₄-Bestimmung für die Interpretation abnormaler T₄-Werte diagnostisch wertvoll.

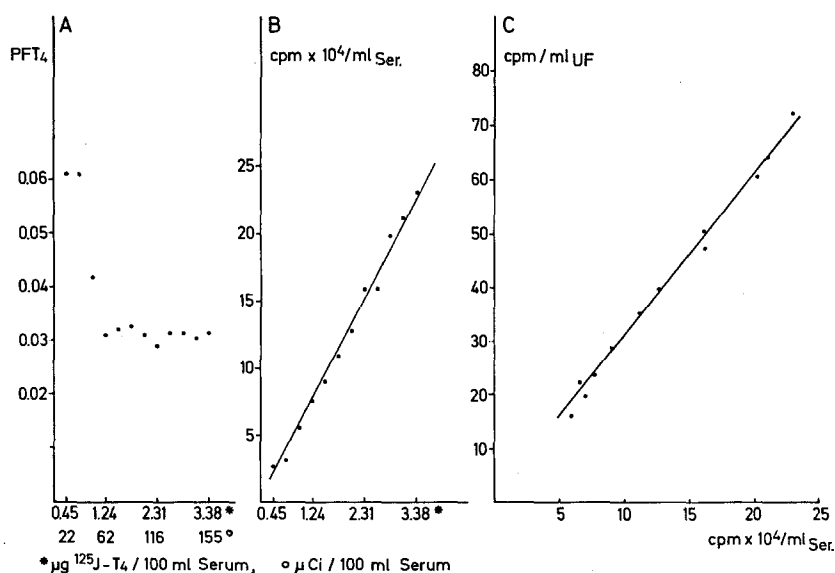
Methode. Blutentnahme (nüchtern) aus ungestauter Vorarmvene in 10-ml Vacutainer-Röhre (Schuco-International, Hamburg), Zentrifugieren und Übertragung von ca. 4.5 ml Serum in eine gleiche vorbeschriftete Röhre (pH-Protektion); nach Zusatz von 1–2 µCi/ml ¹²⁵J-Thyroxin (Amersham-Buchler, Braunschweig) kurz schütteln und 30 min stehen lassen (Raumtemperatur). Anschliessend Ultrafiltration während 2 h unter 3 atü N₂ in handelsüblichen Druckkammern (Millipore, Neu-Isenburg) über Cellulosenitrat-Membran (Ausschlussgrenze MG 10 000, Sartorius, Göttingen) nach dem von

PUTMAN¹ angegebenen Verfahren, das sich für Serienbestimmungen eignet. Bei Einsatz von 4 ml Serum beträgt die durchschnittliche Ausbeute an Ultrafiltrat 1.4–1.7 ml, die Mehrfachbestimmungen zu je 0.4 ml gestattet. Präzipitation und Waschen erfolgen nach STERLING und BRENNER² mit MgCl₂-Lösung (10%) in Tris-NaCl, pH 9.3 unter gleichzeitigem Zusatz von Kaliumphosphat-Puffer (0.15 M, pH 7.4) und Thyroxin (1 mg L-Thyroxin/ml 0.033 N NaOH). Berechnung:

$$PFT_4 = \frac{\text{cpm/ml Ultrafiltrat}}{\text{cpm/ml Serum}} \times 100.$$

Die in Tabelle I angegebenen Werte für «absolut freies Thyroxin» (AFT₄) errechnen sich aus dem zeitgleich bestimmten T₄ (modifiziert nach MURPHY und JACHAN³).

Die Assoziationsbindung zwischen Hormon und Trägerprotein ist stark pH-abhängig. Mit der beschriebenen Technik ist der CO₂-Verlust gering und die Aktivitätsausbeute im Ultrafiltrat proportional der dem Serum zugesetzten Menge (Figur C). Die Reproduzierbarkeit für PFT₄ ist entsprechend konstant (Figur A), wenn nicht



Freies Thyroxin (PFT₄) Qualitätsprüfung. A) Variationskoeffizient in der Serie 3.95 (gleiche Probe, $n = 9$), Mindestzugabe 62 µCi/100 ml. B) Kontrolle des tracerbeschrifteten Serums. C) lineare Wiederfindung im Ultrafiltrat ($r = 0.997$).

weniger als $0.8 \mu\text{Ci/ml}$ $^{125}\text{J-T}_4$ inkubiert wurden (VK3.8%). Eine Beziehung der Ergebnisse zu Filtrationsdauer oder -druck findet sich nicht (Tabelle I). Durch Verwendung heparinisierter Vakutainer-Röhren lässt sich der gelegentlich auftretende Konzentrations-Polarisationseffekt

Tabelle I. Freies Thyroxin (PFT₄) im Serum in Abhängigkeit von der Dauer der Ultrafiltration

Patient	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0
K., U.	0.018 ^a	0.019 ^a	0.019 ^a	0.020 ^a			
N., P.				0.0325 ^b	0.0345 ^b	0.0310 ^b	0.0305 ^b

(Stunden, ^a) oder N₂-Druck (atü, ^b). Mittelwerte aus je 3–4 Einzelbestimmungen.

Tabelle II. Gesamtes, prozentual freies und absolut freies Thyroxin im Serum von Gesunden (P) und Patienten unter T₄/T₃-Substitution nach Strumektomie (S)

	T ₄ ($\mu\text{g}/100 \text{ ml}$)	PFT ₄	AFT ₄ ($\text{ng}/100 \text{ ml}$)
P (18)	7.06 1.63	0.030 0.010	2.17 0.79
S (12)	8.95 1.91	0.022 0.001	2.0 0.80

Mittelwerte ± 1 SD. (): Zahl der Fälle.

und geringere Filtrationsleistung umgehen. Unsere an klinisch gesunden Versuchspersonen gefundenen Werte (Tabelle II) stehen in guter Übereinstimmung mit jenen anderer Autoren⁴.

Während die Vorteile der PFT₄-Bestimmung mittels Gleichgewichtsdialyse gegen pH-stabile Pufferlösungen in der geringen Menge benötigten Probenmaterials zu suchen sind, lassen sich mittels Ultrafiltration mühelos 30–40 Proben/Tag gewinnen und am folgenden aufarbeiten.

Summary. A rapid determination of free thyroxine in human serum using ^{125}J -thyroxine and pressure ultrafiltration is presented. Assaying per cent free thyroxine (PFT₄) more than 30 specimen/day can easily be established. The mean value of healthy controls is 0.030 ± 0.010 (1 SD). Interference of results with height of pressure applied and duration of ultrafiltration resp. could not be detected. Both precision and sensitivity of this method allow further research and routine clinical employment.

P. O. SCHWILLE, G. KOCH und U. KOCH

Hormon- und Mineralstofflabor, Chirurgische Universitätsklinik, Krankenhausstrasse, 12, D-852 Erlangen (Germany), 3. August 1973.

¹ J. M. PUTMAN, Clin. chim. Acta 37, 33 (1972).

² K. STERLING and A. M. BRENNER, J. clin. Invest. 45, 153 (1966).

³ B. E. P. MURPHY and C. JACHAN, J. Lab. clin. Med. 66, 161 (1965).

⁴ G. HENNEMANN, R. DOCTER and A. DOLMAN, J. clin. Endocr. 33, 63 (1971).

A Method and its Pharmacological Application to Determine the Duration of Arousal Pattern Based on Amplitude Changes of EEG Signals in Rats

After the first attempt at clinical use of potentials generated by the brain, it was very soon recognized that there exists a specific low voltage and high frequency EEG pattern now known as desynchronisation¹, activation pattern² or arousal reaction³. The arousal reaction is used as parameter for studying the mode of action of many centrally acting drugs. In this respect, the following aspects of the arousal phenomenon can be measured: arousal threshold, amplitude and frequency of EEG signals during arousal, and duration of the arousal action. The first 3 parameters using the existing methods can be expressed in an exact and objective way. However, with the duration of arousal many authors^{4–6} still analyse this parameter exclusively by the visual inspection of the EEG records. This method is subjective, and difficulty is often encountered in determining the end of arousal, since transition of arousal and control pre-arousal state is not sharp. Moreover, the oscillation of the amplitude during the arousal period may very often reach the pre-arousal amplitude value, confusing the observer as to whether arousal is really terminated or not.

Our preliminary analysis of the frequency and amplitude of the activation pattern indicated that the amplitude of EEG signals is a better parameter for quantification of the duration of the arousal than the frequency spectrum. This led us to the use of the integrative method⁷ for amplitude analysis of the electroencephalogram in pre-arousal and arousal period, with the aim of developing a simple and objective way for determination of the duration of arousal.

Materials and methods. Adult albino male rats (200–250 g) of the Wistar strain (TNO animals farm Delft) were used. Electrodes for the EEG recording were essentially similar to those described earlier⁸ and were slightly modified (H. VAN RIEZEN, personal communication). Implantation was carried out under Hypnorm® (10 mg Fluanison and 0,2 mg Fentanyl in 1 ml) anaestheticum in doses of 1 ml/kg i.p. Following surgery the wound of the rats was treated with penicillin powder. Before the experiment the rats were allowed at least a week for recovery during which period they were caged individually.

The EEG was recorded while the animals were in a sound proof cabin with dimmed light. The animals were left overnight in the cabin before the experiment started. During the experimental session the rats had freedom of movement, twisting of the wires being prevented by the use of a swivel.

¹ E. D. ADRIAN and B. H. C. MATTHEWS, J. Physiol., Lond. 87, 440 (1934).

² M. B. RHEINBERGER and H. H. JASPER, Am. J. Physiol. 119, 186 (1937).

³ G. MORUZZI and H. W. MAGOUN, Clin. Neurophysiol. 7, 455 (1949).

⁴ A. B. ROTHBALLER, Clin. Neurophysiol. 8, 603 (1956).

⁵ M. BONVALLET and V. BLOCH, Science 133, 1133 (1961).

⁶ A. SHIMIZU, K. BOST and H. E. HIMWICH, Pharmacopsychiatry 7, 134 (1968).

⁷ Z. DROHOCKI, Rev. Neurol. 107, 257 (1962).

⁸ C. J. DE VOS and I. L. BONTA, Archs int. Pharmacodyn. Thér. 147, 280 (1964).