ACTA MORPHOLOGICA

ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE

ADIUVANTIBUS
. BALÓ, K. FARKAS, L. HARANGHY, B. KELLNER, J. SZENTÁGOTHAI

REDIGIT
I. TÖRÖ

TOMUS IX FASCICULUS 1

AKADÉMIAI KIADÓ BUDAPEST

1959

ACTA MORPHOLOGICA

A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA ORVOSTUDOMÁNYI KÖZLEMÉNYEI

SZERKESZTŐSÉG ÉS KIADÓHIVATAL: BUDAPEST V., ALKOTMÁNY UTCA 21.

Technikai szerkesztők:
Dr. Kiszely György és Dr. Somogyi Endre

Az Acta Morphologica német, angol, francia és orosz nyelven közöl értekezéseket a kísérletes orvostudomány tárgyköréből.

Az Acta Morphologica változó terjedelmű füzetekben jelenik meg. Több füzet alkot egy kötetet.

A közlésre szánt kéziratok a következő címre küldendők:

Acta Morphologica, Budapest IX., Tűzoltó u. 58.

Ugyanerre a címre küldendő minden szerkesztőségi és kiadóhivatali levelezés.

Az Acta Morphologica előfizetési ára kötetenként belföldre 80, külföldre 110 Ft. Megrendelhető a belföld számára az Akadémiai Kiadónál (Budapest V., Alkotmány utca 21. Bankszámla 05-915-111-44), a külföld számára pedig a »Kultúra« Könyv- és Hírlap Külkereskedelmi Vállalatnál (Budapest VI., Népköztársaság útja 21. Bankszámla: 43-790-057-181), vagy annak külföldi képviseleteinél és bizományosainál.

Die Acta Morphologica veröffentlichen Abhandlungen aus dem Bereiche der experimental-medizinischen Wissenschaften in deutscher, englischer, französischer und russischer Sprache.

Die Acta Morphologica erscheinen in Heften wechselnden Umfanges. Mehrere Hefte bilden einen Band.

Die zur Veröffentlichung bestimmten Manuskripte sind an die folgende Adresse zu senden:

Acta Morphologica, Budapest IX., Tűzoltó u. 58.

An die gleiche Anschrift ist auch jede für die Schriftleitung und den Verlag bestimmte Korrespondenz zu richten.

Abonnementspreis pro Band: 110 Forint. Bestellbar bei dem Buch- und Zeitungs-Außenhandels-Unternehmen »Kultura« (Budapest VI., Népköztársaság útja 21. Bankkonto Nr: 43-790-057-181) oder bei seinen Auslandsvertretungen und Kommissionären.

ACTA MORPHOLOGICA

ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE

ADIUVANTIBUS
J. BALÓ, K. FARKAS, L. HARANGHY, B. KELLNER, J. SZENTÁGOTHAI

REDIGIT
I. TÖRŐ

TOMUS IX

AKADÉMIAI KIADÓ
BUDAPEST

1959

ACTA MORPH. HUNG.

INDEX

Tomus IX

Rivenzon, A.—Condoiu, M.: **Contributions à l'étude de la spermatogenèse. L'état plasmodial (multinucléé) des cellules séminales.** — *Ривензон, А., Кондойу, М.:* О созревании спермы. Плазмодиальное (многоядерное) состояние семенных клеток 1

Velican, C.—Velican, D.: **Genesis of Elements Having the Appearance of Tissular Mast Cells.** — *Великан, Ц., Великан, Д.:* Генез тканевых тучных клеток... 11

Horváth, L.: **Some Data Concerning the Submicroscopic Morphology of Mast Cells. I.** — *Хорват, Л.:* Данные к субмикроскопической морфологии тучных клеток 35

Oláh, É.—Hadházy, Cs.—Kostenszky, K.: **Untersuchungen über die Knorpelbildung. III. Hämoglobin- und Milchsäuregehalt regenerierenden Gelenkfläche in verschiedenen Regenerationsstadien.**—*Олах, Э., Хадхази, Ч., Коштенски, К.:* Исследования образования хрящей. III. Содержание гемоглобина и молочной кислоты в восстанавливающейся поверхности сустава в различных стадиях регенерации... 45

Adler, P.—Adler-Hradecky, C.: **Normal Variability of the Changing Dentition.**— *Адлер, П., Адлер-Хрaдецки, Ц.:* Нормальные вариации смены зубов 63

Dévényi, I.—Megyeri, L.: **Functional Reactivity of Homotransplanted Rat Thyroid.** — *Девеньи, И., Медьери, Л.:* Исследование функциональной способности к реакции гомотрансплантатов щитовидной железы крыс 73

E. Szabó, L.—Tompa, G.—Bakó, G.: **Experimental Intrathoracic Oesophagoplasty with Skin Tube.** — *Сабо, Э., Томпа, Г., Бако, Г.:* Экспериментальная внутригрудная замена пищевода кожной трубкой..... 81

Sándor, I.: **On the Role of the Reactivity of the Infected Organism in the Development of Tuberculosis.** — *Шандор, И.:* О проблеме реактивности зараженного организма в развитии туберкулеза..... 89

Beregi, E.—Haranghy, L.—Földes, I.: **Wirkung von Adrenalin auf die Kaninchenniere.** — *Береги, Э. Харанги, Л., фелдеш, Л.:* Исследование действия адреналина на почки кроликов..... 105

Graffi, A.: **Ein Virus als Ursache myeloischer Leukämien bei der Maus und der Ratte.** — *Граффи, А.:* Вирус, как причина миэлоидной лейкемии у мышей и крыс 115

Smirnova, S. N.: **Changes of the Nerve Cells in the Human Fascicular, Gasserian and Spinal Cervical Ganglia in the Extrauterine Life, Related to Age.** — *Смирнова, С. Н.:* Возрастные изменения нервных клеток пучковидного, Гассерова и шейных спинномозговых узлов у человека после рождения..... 133

Bogdanow, K. P.: **Der Ductus thyreoglossus und seine Derivate in der postnatalen Periode (Anatomie und Syntopie).** — *Богданов, К. П.:* **Ductus thyreoglossus** и его дериваты в постнатальном периоде (Анатомия и синтопия) 143

Hámori, J.: **Gewebsreaktionen und Funktionsänderungen des Hypophysenmittellappens der Albinoratte nach Hypothalamus- und Hypophysenstielläsion.** — *Хамори, Й.:* Тканевые реакции и изменения функции средней доли гипофиза у белых крыс после повреждения гипоталамуса и ножки гипофиза 155

Mindubajew, J. Ch.: Morphologie des Nervus vagus und seiner Verzweigungen bei Wiederkäuern. — *Миндубаев, Ю. Х.:* Морфология блуждающих нервов и их разветвлений у жвачных 161

Horváth, L.: Some Data Concerning the Submicroscopic Morphology of Mast Cells. II. — *Хорват, Л.:* Данные к субмикроскопической морфологии тучных клеток. II. 179

Csaba, Gy.—Törő, I.—Ács, T.—Kiss, F. I.: The Behaviour of the Thymus in Conditions Associated with Tissue Proliferation. — *Чаба, Дь.—Тёрё, И.—Ач, Т.—Киш, ф:* Поведение зобной железы в состояниях, сопровожденных разрастанием ткани 187

Csaba, Gy.—Törő, I.—Kapa, E.: Provoked Tissue Reaction of the Thymus in Tissue Culture. — *Чаба, Дь.—Тёрё, К.—Капа, Э.:* Искусственно вызванная тканевая реакция зобной железы в тканевых культурах 197

Gáspárdy, G.—Nemeskéri, J.: Paleopathological Studies on Copper Age Skeletons Found at Alsónémedi. — *Гашпарди, Г.—Немешкери, Я.:* Результаты палеопатологических исследований скелетов из медного века, обнаруженных при раскопках в Алшонемеди (Пецельская культура) 203

Szodoray, L.—Daróczy, P.: Correlations between Scleroderma and Dermatitis atrophicans. — *Содораи, Л.—Дароци, П:* Склеродермия и частичная атрофия эластической ткани кожи (dermatitis atrophicans) 221

Lázár, L.—Maros, T.: Altérations des nerfs périphériques déterminées par des lésions mécaniques. — *Лазар, Л.—Марош, Т.:* Изменения периферических нервов. вызванные механическими повреждениями 233

Rosenberg, A.—Schächter, I.—Daghie, V.: Experimentelle Beiträge zum Problem der alkalischen Leberphosphatase. — *Розенберг, А.—Шэхтер, И.—Даги, В.:* Экспериментальные данные о щелочной фосфатазе печени 245

Halász, B.—Szentágothai, J.: Control of Adrenocorticotrophic Function by Direct Influence of Pituitary Substance on the Hypothalamus. — *Халас, Б.—Сентаготаи, Й.:* Непосредственное обратное действие производимого передней долей гипофиза вещества на гипоталамус и производство адренокортикотропного гормона 251

Nagy, M.: Über einige Fragen des Alterns der menschlichen Plazenta. — *Надь, М.:* Проблемь старения человеческой плаценты 263

Csaba, Gy.: The Human Thymus Gland: The Problem of the Thymus-Mast-Cells. — *Чаба, Дь.:* Исследование человеческой зобной железы с точки зрения тучных клеток зобной железы 285

Csaba, Gy.—Törő, I.—Kapa, E.: New Contributions to the Heparin-Affinity of the Thymus. I. — *Чаба, Дь.—Тёрё, И.—Капа, Э.:* О сродстве зобной железы к гепарину. I 291

Csaba, Gy.—Törő, I.—Vatai, M.: New Contributions to the Heparin-Affinity of the Thymus. II. — *Чаба, Дь.—Тёрё, И.—Ватаи, М.:* О сродстве зобной железы к гепарину. II 297

Donáth, T.—Orbán, Gy.—Gimes, R.: New Data Regarding the Fluorescence Microscopic Picture of Vaginal Epithelium. —*Донат, Т.—Орбан, Дь.—Гимеш, Р.:* Новые данные к картине эпителиальных клеток влагалища при флуоресцентной микроскопии 301

Pósalaky, Z.—Tóth, G.—Müller, M.—Csáky, L.: The Determination by Differential Extraction of the Distribution of P^{32} Label in Sections and Smears. — *Пошалаки, З.—Тот, Г.—Миллер, М.—Чаки, Л.:* Определение распределения P^{32} в срезах и мазжах путем дифференциальной экстракции 309

Szendi, B.—Heim, V.: Genital Tuberculosis in the Female: The Mechanism of its Generalization. — *Сенди, Б.—Хейм, В.:* Данные к механизму генерализации туберкулеза женских половых органов 315

Haranghy, M.: Modifications de la structure nucléaire dans les éléments mobiles de l'écorce cérébrale humaine, lors de phénomènes de neuronophagie, chez des individus atteints de maladies mentales. — *Харанги, М.:* Изменения ядерной структуры подвижных элементов человеческой коры головного мозга в ходе явлений невронофагии у душевнобольных 327

Haraszti, A.—Endes, P.: **Hepatic Lesions in Secondary Shock and Acute Cardiac Failure.** — *Харасти, А.—Эндеш, П.:* Изменения печени в связи с вторичным шоком и острой недостаточностью сердца 343

Liebner, E.—Temesváry, Gy.—Lengyel, J.—Angyal, J.: **The Agar Binding Reaction in Skin Diseases.** — *Либнер, З.—Темешвари, Дь.—Лендьел, Ю.—Андьял, Й.:* Исследования реакции связывания агара при кожных болезнях 357

Krompecher, St.—Berencsi, Gy.: **Mucopolysaccharides in the Histochemistry of Cancer. Production of Neutral Mucopolysaccharides and Their Drainage through Dilated Lymphatics in Mouse Cancer C_3H.** — *Кромпехер, И.—Беренчи, Дь.:* Мукополисахариды в гистохимии раковой ткани 375

Endes, P.—Dévényi, I.—Halász, B.—Gomba, Sz.: **The Granulated Cells of the Juxtaglomerular Apparatus in Experimental Lesions of the Hypophyseal Stalk and of the Hypothalamus** 385

INDEX AUTORUM

A

Adler, P.—Adler-Hradecky, C. 63
Adler-Hradecky, C. vide Adler, P. 63
Angyal, J. vide Liebner, E. 357
Ács, T. vide Csaba, Gy. 187

B

Bakó, G. vide E. Szabó, L. 81
Beregi, E.—Haranghy, L.—Földes, I. 105
Berencsy, Gy. vide Krompecher, St. 375
Bogdanow, K. P. 143

C

Condoiu, M. vide Rivenzon, A. 1
Csaba, Gy.—Törő, I.—Ács, T.—Kiss, F. I. 187
Csaba, Gy.—Törő, I.—Kapa, E. 197
Csaba, Gy. 285
Csaba, Gy.—Törő, I.—Kapa, E. 291
Csaba, Gy.—Törő, I.—Vatai, M. 297
Csáky, L. vide Pósalaky, Z. 309

D

Daghie, V. vide Rosenberg, A. 245
Daróczy, P. vide Szodoray, L. 221
Dévényi, I.—Megyeri, L. 73
Dévényi, I. vide Endes, P. 385
Donáth, T.—Orbán, Gy.—Gimes, R. 301

E

Endes, P. vide Haraszti, A. 343
Endes, P.—Dévényi, I.—Halász, B.—Gomba, Sz. 385
E. Szabó, L. vide sub signo Sz

F

Földes, I. vide Beregi, E. 105

G

Gáspárdy, G.—Nemeskéri, J. 203
Gimes, R. vide Donáth T. 301
Gomba, Sz. vide Endes, P. 385
Graffi, A. 115

H

Hadházy, Cs. vide Oláh, É. 45
Halász, B.—Szentágothai, J. 251
Halász, B. vide Endes, P. 385
Haranghy, L. vide Beregi, E. 105
Haranghy, M. 327
Haraszty, A.—Endes, P. 343
Hámori, J. 155
Heim, V. vide Szendi B. 315
Horváth, L. 35, 179

K

Kapa, E. vide Csaba, Gy. 197, 291
Kiss, F. I. vide Csaba, Gy. 187
Kostenszky, K. vide Oláh, É. 45
Krompecher, St.—Berencsy, Gy. 375

L

Lázár, L.—Maros, T. 233
Lengyel, J. vide Liebner, E. 357
Liebner, E.—Temesváry, Gy.—Lengyel, J.—Angyal, J. 357

M

Maros, T. vide Lázár, L. 233
Megyeri, L. vide Dévényi, I. 73
Mindubaiew, J. Ch. 161
Müller, M. vide Pósalaky, Z. 309

N

Nagy, M. 263
Nemeskéri, J. vide Gáspárdy, G. 203

O

Oláh, É.—Hadházy, Cs.—Kostenszky, K. 45
Orbán, Gy. vide Donáth, T. 301

P

Pósalaky, Z.—Tóth, G.—Müller, M.—Csáky. L. 309

R

Rivenzon, A.—Condoiu, M. 1
Rosenberg, A.—Schächter, I.—Daghie, V. 245

S

Sándor, I. 89
Schächter, I. vide Rosenberg, A. 245
Smirnowa, S. N. 133

Sz

E. Szabó, L.—Tompa, G.—Bakó, G. 81
Szendi, B.—Heim, V. 315
Szentágothai, J. vide Halász, B. 251
Szodoray, L.—Daróczy, P. 221

T

Temesváry, Gy. vide Liebner, E. 357
Tompa, G. vide E. Szabó, L. 81
Tóth, G. vide Pósalaky, Z. 309
Törő, I. vide Csaba, Gy. 187, 197, 291, 297

V

Vatai, M. vide Csaba, Gy. 297
Velican, C.—Velican, D. 11
Velican, D. vide Velican, C. 11

Laboratoire d'Anatomie Pathologique de l'Institut d'Oncologie, București, R. P. Romînă

CONTRIBUTIONS À L'ÉTUDE DE LA SPERMATOGENÈSE

L'ÉTAT PLASMODIAL (MULTINUCLÉÉ) DES CELLULES SÉMINALES

A. Rivenzon et M. Condoïu

(Reçu le 19. août 1958)

Introduction

Dans une publication antérieure [6] nous avons étudié la spermatogenèse à l'aide de frottis et d'empreintes de testicule. L'aspect des cellules séminales, des cellules interstitielles et des cellules de Sertoli a été décrit, en precisant les éléments cytologiques nécessaires pour leur diagnostic différentiel.

En étudiant les frottis testiculaires nous avons remarqué l'existence des cellules séminales multinucléés. Le présence de ces formes dans le testicule normal et pathologique — nous a incité de les étudier minutieusement, en cherchant à établir si leur existence est constante. Nous avons aussi étudié leur mode de formation, leur évolution ultérieure et le rapport quantitatif des formes mono- et multinucléés.

Aperçu bibliographique

Parmi les travaux consultés, nous citerons les travaux de Regaud [3, 4, 5] qui étudie à l'aide de coupes histologiques la spermatogenèse chez différents animaux, en constatant l'existence des formes multinucléés parmi les cellules séminales. Quoiqu'il trouve des cellules multinucléés non seulement chez les animaux malades mais aussi chez les animaux sains, il les considère comme des cellules séminales dégénérées, et les appelle *tératocytes.* Le nom de tératocyte, désigne donc (selon Regaud) toute cellule séminale d'aspect anormal (géante, petite, ou multinucléé).

L'auteur ne précise pas s'il a trouvé chez les animaux sains parmi les tératocytes des formes cellulaires géantes et petites, ou si ces tératocytes sont représentées uniquement par des cellules séminales multinucléés.

Quant à la genèse de ces formes multinucléés, Regaud croît qu'elles apparaîssent par division mitotique du noyau (karyodiérèse) non suivie de cytodiérèse, ayant comme conséquence l'apparition de plusieurs noyaux dans le même cytoplasme.

STROGANOVA [8] a étudié le testicule du cobaye, de la souris et du rat à l'aide des coupes et sur des frottis. Elle arrive à la conclusion que l'on peut toujours trouver des cellules multinucléés dans le testicule de l'animal sain, où elles représentent 5 à 22 p. 100 des cellules séminales. STROGANOVA fait remarquer que, vu leurs caractères techniques, les coupes histologiques ne permettent pas, dans la plupart des cas, l'observation des formes multinucléés ; la présence où l'absence de ces formes ne peut être constatée d'une manière certaine que seulement sur des frottis. Elle suppose également que ces formes plasmodiales résultent de la division directe du noyau. Chez l'homme c'est STIEVE [7], JOËL [1], LANE-ROBERTS [2] etc. qui étudient les spermatoides polynucléairs.

Matérial et technique

Nous avons étudié les testicules de 500 rats, 150 souris, 5 chiens, 2 cobayes et 3 hommes (castrés chirurgicalement pour cancer prostatique).

Nous procédons de la manière suivante: avec la surface de section du testicule nous faisons des frottis et des empreintes. Les préparations ainsi obtenues sont fixées et puis colorées au May—Grünwald—Giemsa (tout comme les frottis de sang). Les cellules séminales ainsi colorées ont une polychromasie aussi riche que belle.

Nous avons examiné plus de 2000 frottis.

Vingt testicules (dont 10 normaux et 10 pathologiques) ont été étudiés non seulement sur des frottis, mais aussi sur des coupes histologiques après inclusion à la paraffine, pour établir si on peut constater aussi sur les coupes l'éxistence des cellules multinucléés qui ont toujours été observées auparavant sur les frottis faits avec les mêmes testicules.

Observations personnelles

I

Les cellules séminales plasmodiales normales et pathologiques

En examinant les frottis, nous avons constaté chez *tous* les animaux étudiés (dont deux tiers étaient normaux) des cellules séminales multinucléés contenant de 2 à 30 noyaux.

La comparaison des frottis avec les coupes histologiques du même testicule démontre sur les coupes de testicule *normal*, la présence des cellules multinucléés est difficile (si non impossible) à observer, parce que l'agglomération des cellules, leur superposition et la séparation des noyaux par les divers plans de séction conduisent à l'impossibilité pratique d'apprécier la localisation de deux ou plusieurs noyaux dans le même cytoplasme.

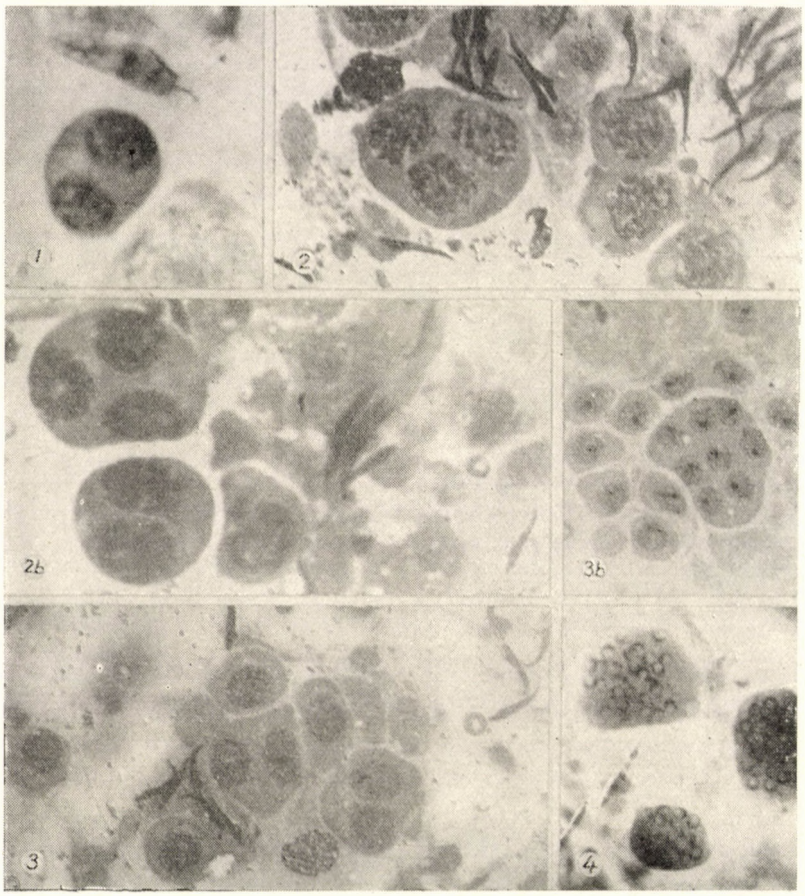


Fig. 1. Frottis de testicule (souris normale). Spermatogonie avec deux noyaux
Fig. 2. Frottis de testicule (rat normal). Spermatocyte avec trois noyaux (à comparer avec les spermatocytes mononucléés voisins)
Fig. 2. bis: Frottis de testicule (rat normal). Spermatocytes avec un, deux ou trois noyaux.
Fig. 3. Frottis de testicule (rat normal). Spermatides avec un et deux noyaux
Fig. 3. bis. Frottis de testicule (souris normale). Spermatide contenant huit noyaux, entourée de spermatides mononucléés. Toutes sont d'aspect normal
Fig. 4. Frottis de testicule (rat). Cellules seminales pathologiques à plusieurs noyaux vacuolysés. Animal porteur d'une greffe intratesticulaire de sarcome IOB 9

Ces défauts sont évités grâce aux frottis, qui nous offrent la possibilité d'étudier des cellules séparées, intactes et disposées sur le même plan.

Quant au testicule malade, nous avons constaté la présence de cellules multinucléés sur les frottis aussi bien que sur les coupes (Fig. 4, 5, 5 bis).

En ce qui concerne la formation des cellules multinucléés chez l'animal normal, nous sommes d'accord avec REGAUD. Nous avons observé des karyokinèses plasmodiales avec 2—4—6—8 groupes chromosomiaux (Fig. 6, 7, 16) ;

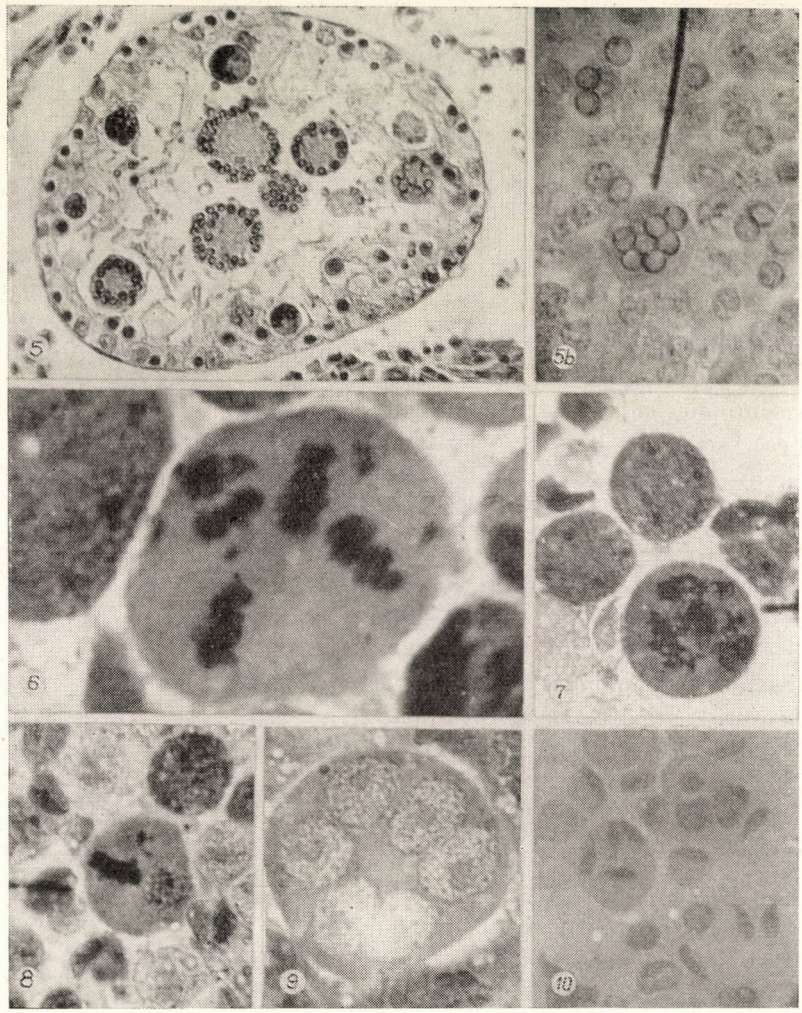


Fig. 5 et *5 bis* : Coupe histologique (testicule de rat greffé avec le sarcome IOB 9). Parmi les cellules seminales trés raréfiées et dégénérées il y a des cellules avec plusieurs noyaux vacuolysés. Coloration : hématoxyline-eosine

Fig. 6. Frottis de testicule (souris normale). Mitose multipolaire (métaphases)

Fig. 7. Frottis de testicule (souris normale). Mitose multipolaire (prophases)

Fig. 8. Frottis de testicule (souris normale). Spermatide binucléé ; un noyau est en repos, l'autre en mitose (plaque équatoriale)

Fig. 9. Frottis de testicule (souris normale). Spermatide normale avec six noyaux

Fig. 10. Frottis de testicule (souris normale). Plusieurs cytoplasmes de spermatide contenant 1—4 têtes de spermatozoïdes d'aspect normal

d'habitude tous ces groupes chromosomiaux se trouvent dans la même phase de karyokinèse.

Une fois seulement nous avons vu sur un frottis de testicule normal une image dans laquelle un noyau était au repos, l'autre en karyokinèse (Fig. 8). Chez l'animal normal, la division du noyau (karyodiérèse) non suivie de division cytoplasmique (cytodiérèse) donne naissance à la cellule multinucléé.

Discussion

L'analyse de nos résultats (obtenus par la méthode des frottis) aboutit à la conclusion selon laquelle les affirmations sur la nature dégénérative des cellules séminales multinucléés des animaux sains, sont discutables.

Il est vrai que si le testicule devient le siège d'un processus pathologique on observe sur les frottis et sur les coupes des soi-disant tératocytes (c'est à dire des cellules séminales degénérées : géantes, petites, multinucléés).

Or, de la déscription de REGAUD, il résulte (sans être expressément précisé) que la seule forme de tératocyte qu'on puisse trouver chez l'animal sain, est la forme multinucléé.

Les cellules multinucléés seraient, donc des éléments „dégénérés" communs au testicule normal et pathologique ; mais la comparaison des cellules multinucléés du testicule pathologique à celles de testicule normal, permet la révélation de nombreux caractères distinctifs. Les différences sont analogues à celles qui existent entre les cellules séminales mononucléés normales et pathologiques (fig. no. 4, 5). Les modifications pathologiques (c'est à dire vacuolyse, pyknose et inégalité nucléaire) sont les mêmes pour les cellules mononucléés et multinucléés du testicule malade, les deux types cellulaires étant au même degré atteints par l'agent pathogène (Fig. 4, 5).

Au contraire, l'examen minutieux des cellules séminales multinucléés du testicule normal, ne permet pas de signaler le moindre aspect dégénératif ; ces cellules sont parfaitement semblables aux cellules mononucléés du même testicule, à l'exception du nombre des noyaux.

Il résulte que les cellules séminales multinucléés ont des caractères dégénératifs seulement lorsque les cellules mononucléés environnantes ont les mêmes caractères (testicule malade) ; dans le testicule sain les cellules mononucléés normales coéxistent avec des cellules multinucléés d'aspect normal.

L'ancienne erreur de REGAUD a donc pour cause l'insuffisance technique de la méthode utilisée (étude exclusive des coupes) car, comme nous l'avons fait remarquer plus haut, il est difficile de distinguer les cellules séminales multinucléés, sur les coupes de testicule normal, quoiqu'elles existent constamment sur les frottis. Par contre sur les coupes de testicule malade, la raréfaction cellulaire rend l'observation plus facile, mais les cellules ont alors

un aspect pathologique, ce qui a determiné à tort, l'extension du terme „pathologique" à toutes les cellules séminales multinucléés.

Une autre preuve de l'état „sain" des cellules multinucléés du testicule normal est fournie par l'analyse de l'évolution d'une cellule spermatocytique multinucléé. Celle-ci se transforme en spermatide multinucléé, qui pendant sa maturation se divise en plusieurs spermatides mononucléés, ou bien en

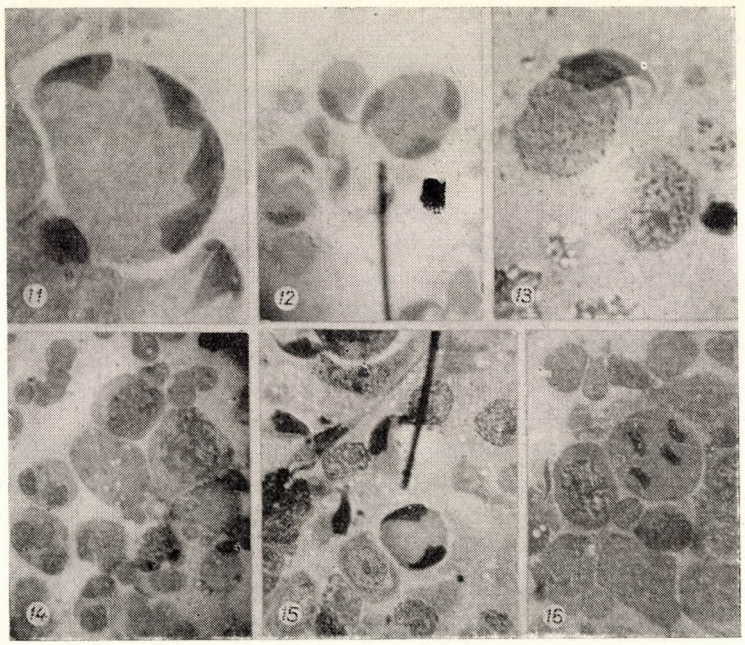


Fig. 11. Frottis de testicule (souris normale). Cytoplasme de spermatide avec quatre têtes de spermatozoïde
Fig. 12. Frottis de testicule (souris normale). Cytoplasme de spermatide contenant trois têtes de spermatozoïdes dont l'une commence à quitter le cytoplasme
Fig. 13. Frottis de testicule (souris normale). Cytoplasme de spermatide avec deux têtes de spermatozoïde quittant ensemble le cytoplasme
Fig. 14. Frottis de testicule d'homme, castré pour cancer prostatique. Il y a des cellules séminales avec un ou plusieurs noyaux
Fig. 15. Frottis de testicule (souris normale). Cytoplasme de spermatide contenant deux têtes de spermatozoïde
Fig. 16. Frottis de testicule (rat normal). Mitose multipolaire (deux anaphases)

continuant à évoluer comme plasmode, elle donnera pourtant naissance à des spermatozoides normaux. La métamorphose des noyaux spermatidiques peut être aisément observée ; parfois on voit des cytoplasmes spermatidiques contenant 2—3—4 têtes de spermatozoïde, formées par la transformation des noyaux respectifs (fig. no. 10, 11, 15). Aucune de ces têtes de spermatozoïde ne diffère du point de vue morphologique ou tinctorial d'une tête de spermatozoïde provenant d'une cellule mononucléé. On peut voir la sortie et la sépa-

ration des spermatozoïdes du cytoplasme d'origine et leur passage vers une existence individualisée (Fig. 12, 13).

Par conséquent, les cellules multinucléés normales évoluent tout comme les cellules nomonucléés corréspondantes, en donnant naissance à des spermatozoïdes d'aspect normal. Souvent, les spermatozoïdes quittent le cytoplasme individuellement (Fig. 12). Il y a des cas (beaucoup plus rares) où les spermatozoïdes quittent le cytoplasme leurs têtes réunis (Fig. 13) ; c'est peut-être la manière de formation des spermatozoïdes bicéphaliques qui ont été décrites dans le liquide spermatique des individus sains.

Conclusions

1. — Il y a deux sortes de cellules séminales multinucléés : normales (chez les animaux sains) et pathologiques (chez les animaux dont le testicule est atteint par un processus pathologique).

2. — Excepté le nombre des noyaux, une cellule multinucléé normale est caractérisée par l'identité morphologique et tinctoriale avec la cellule mononucléé correspondante (spermatogonie, spermatocyte, spermatide) ; les deux formes évoluent d'une manière semblable.

3. — Une cellule multinucléé pathologique est parfaitement comparable aux cellules mononucléés pathologiques qui l'entourent, par la pyknose et la vacuolyse nucléaire, l'altération de la colorabilité cytoplasmique, etc. En outre, les noyaux inégaux des cellules multinucléés pathologiques sont irrégulièrement localisées dans le cytoplasme.

II

La „formule séminale" et sa variation normale

L'existence constante des cellules séminales multinucléés dans le testicule normal et pathologique, permet l'étude quantitative de ces formes, par rapport aux formes mononucléés.

La variation quantitative des multinucléés a été déjà remarquée par Regaud, mais la technique employée n'a pas permis d'établir une relation objective (exprimée par chiffres) et il a du se limiter aux appréciations subjectives, comme „fréquentes, rares", etc.

En employant les frottis, Stroganova a pu déterminer un pourcentage global.

Nous avons compté les cellules séminales sur des frottis de testicule de souris et de rat blanc, adulte et sain. Les animaux utilisés avaient à-peu-près le même poids et étaient depuis longtemps soumis au même régime alimentaire.

On a compté les cellules multinucléés séparément pour chaque type cellulaire (spermatocyte, spermatide) en comptant chaque fois 200 cellules, et établissant ainsi une sorte de „formule séminale".

Les résultats sont présentés dans les tableaux suivants :

Souris adultes — Testicule droit

Nr. de l'animal	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	Valeur moyenne	Limites
Plasmodes spermatidiques %	6	8	15	8	10	11	16	16	8	10,5	6—16
Plasmodes spermatocytiques %	3	7	14	9	11	14	10	11	15	10,4	3—15

Testicule gauche

Nr. de l'animal	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	Valeur moyenne	Limites
Plasmodes spermatidiques %	10	19	9	8	8	5	9	10	13	9,4	5—13
Plasmodes spermatocytiques %	11	11	11	7	8	7	8	9	7	8,7	7—11

II.

Rats adults — Testicule gauche

Nr. de l'animal	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	Valeur moyenne	Limites
Plasmodes spermatidiques %	9	5	7	4	4	7	7	5	7	7	6,2	4—9
Plasmodes spermatocytiques %	13	6	7	6	8	7	7	6	11	10	7,5	6—13

L'analyse des résultats montre que le pourcentage des spermatocytes multinucléés est à peu près égal au pourcentage des spermatides multinucléés.

Chez le même animal, les pourcentages sont à peu près égaux pour les deux testicules, ce qui pourrait indiquer que ces chiffres expriment un certain état fonctionnel.

Nous continuerons nos recherches en essayant d'établir si le pourcentage des cellules multinucléés est en rélation avec les fonctions normales ou pathologiques du testicule ; cette relation permettra peut-être l'appréciation cytologique de l'état fonctionnel du testicule.

Résumé

L'application de la technique des frottis à l'étude cytologique de la spermatogenèse nous a permis d'aboutir aux conclusions suivantes :

1. — Dans les tubes séminifères des mammifères étudiés se trouvent des cellules séminales avec deux ou plusieurs noyaux. Excepté le nombre des noyaux, ces cellules sont parfaitement semblables du point de vue morphologique et tinctorial aux cellules séminales mononucléaires environnantes.

2. — La cellule séminale multinucléé se rencontre dans chaque testicule normal ou pathologique.

3. — Chez les animaux adultes, sains, la proportion des cellules multinucléés est de 6—8 p. 100 (rats) et de 8—11 p. 100 (souris).

BIBLIOGRAPHIE

1. Joël, N. : (1942) Studien am menschlichen Sperma. Basel. — 2. Lane-Roberts, W.: (1948) Sterility and impaired fertility, London. — 3. Regaud, C.: (1900) Evolution tératologique des cellules séminales. Les spermatides à noyaux multiples chez les mammifères. Bibliographie anatomique *8*, 24. — 4. Regaud, C. : (1900) Evolution tératologique des cellules séminales chez les mammifères. Cellules géantes, naines et à noyaux multiples. C. R. Soc. Biol. Paris. *52*, 293. — 5. Regaud, C. : (1900) Dégénérescence des cellules séminales chez les mammifères en absence de tout état pathologiques. C. R. Soc. Biol. Paris. *52*, 268. — 6. Rivenzon, A. : (1954) Contribution à l'étude de la spermatogenèse. Bull. Acad. section med. R. P. R., *6*, no. 4. 1043. — 7. Stieve, H.: (1930) Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. Springer, Berlin. — 8. Строганова, Н. С.: (1952) Амитоз в ходе сперматогенеза. Докл. Акад. Наук *4*. 326.

О СОЗРЕВАНИИ СПЕРМЫ. ПЛАЗМОДИАЛЬНОЕ (МНОГОЯДЕРНОЕ) СОСТОЯНИЕ СЕМЕННЫХ КЛЕТОК

А. РИВЕНЗОН и М. КОНДОИУ

Авторы проводили на мазках цитологические исследования созревания спермы и установили следующее :

1. В семенных канальцах исследованных млекопитающих имеются двуядерные или многоядерные семенные клетки. С морфологической точки зрения, как и в отношении окрашивания, эти клетки, за исключением многоядерности, не отличаются от окружающих одноядерных семенных клеток.

2. Многоядерные семенные клетки встречаются во всех нормальных и патологических яичках.

3. У здоровых взрослых животных число этих клеток у крыс 6—8%, а у мышей 8—11%.

BEITRÄGE ZUR SPERMATOGENESE. PLASMODIALER (MULTINUKLEÄRER) ZUSTAND DER SAMENZELLEN

A. RIVENZON und M. CONDOIU

Bei der zytologischen Untersuchung der Spermatogenese wurde festgestellt:

1. In den Hodenkanälchen der untersuchten Säugetiere sind zwei- oder vielkernige Samenzellen vorhanden. Hinsichtlich der Morphologie und der Färbung — abgesehen von der Vielkernigkeit — unterscheiden sie sich von den umgebenden mononuklearen Samenzellen nicht.

2. Vielkernige Samenzellen kommen in allen normalen und pathologischen Hoden vor.

3. In gesunden erwachsenen Tieren beträgt die Zahl dieser Zellen bei Ratten 6—8%, bei Mäusen 8—11%.

Dr. A. Rivenzon
Dr. M. Condoïu
București, Bul. 1. Mai, No 11. Rep. Pop. Romînă

Morphological Laboratory of the Institute for Therapeutics of the Rumanian People's Republic, Academy București, R. P. Romînă (Director : N. Gh. Lupu)

GENESIS OF ELEMENTS HAVING THE APPEARANCE OF TISSULAR MAST CELLS

C. Velican and Doina Velican

(Received Sept. 2, 1958)

Introduction

The advances achieved during the past two decades in the knowledge of the bio- and histochemistry of the metachromatic substance contained in mast cells have still not clarified the genesis of these cells. A survey of the pertaining literature reveals that the histiocytic origin, suggested by Maximov in 1904 is the most commonly accepted concept, which has recently been reinforced by the embryological investigations carried out by Rijih [15] and by the reticular-histioblastic evolutional aspects reported by Bessis [2]. On the other hand, the fibroblastic origin is maintained in a number of works such as those published by Hissard et al. [7, 8] and by Fawcett [5]. The hypothesis of Zavarzin and Elisseev on a multiple origin has been resumed in a recent work by Danilova [3], who maintains that mast cells arise from various cells belonging to connective tissue. Other investigators, such as Dégos and Cottenott [4] suggest an autonomous origin, on the basis of amitosis patterns and other observations made in tissue cultures.

The administration of polysaccharides with a view to enhancing the genesis of mast cells by experimental means has hitherto brought no particular clarification. Consequent upon the intraperitoneal injection of heparin, Frick [6] noted a neoformation of mast cells as a result of the injected substance being phagocyted by the non-differentiated adventitial cells of the peritoneum which display a histiocytic appearance. This author found no transformation of fibroblasts into mast cells. After injecting heparin and tissues containing a large amount of hyaluronic acid Hissard et al. [7] noticed a direct and progressive transformation of fibroblasts into mast cells, without any transition through the histiocytic form.

This brief presentation leads to the conclusion that the genesis of tissular mast cells from mesenchymal cells is nowadays admitted. The transformation of the latter elements into mast cells is supposed to take place in varied evolutional stages corresponding to particular microscopic patterns designated

as non-differentiated adventitial cell, polyblast, clasmatocyte, reticular cell, histioblasts, histiocyte, fibroblast, etc. The process of the conversion of mesenchymal cells into tissular mast cells in the adult period has hardly been studied. There is no available information as to the nature of the factors which determine the accumulation of polysaccharides within the cell and we are far from knowing the details of the onset and evolution of this accumulation.

Methods

Our own observations in sections and prints of lymph nodes, lung, skin, spleen, uterus, collected both from human subjects and from laboratory animals, enabled us to find microscopic patterns which might be interpreted as processes related to the genesis of tissular mast cells. They seem to be extremely frequent in adult age under certain experimental and morbid circumstances, when the presence is noted of many cells with a more or less important polysaccharide content.

Our experimental material revealed that the most frequent patterns that might be interpreted as processes of mast cell genesis are to be met with in the lungs in which biological determinations disclose the presence of an increased amount of histamine. This has made us to suggest the hypothesis of the existence of a mast cell genesis induced by histamine and to carry out a systematic study on this subject.

Our necropsy material revealed that the most frequent patterns that could be interpreted as processes of mast cell genesis were to be found in lungs and tracheobronchial lymph nodes affected by anthracosis. This has made us to suggest the hypothesis of the existence of a mast cell genesis determined by anthracosis.

Finally, in order to set up a comparative experimental model permitting a follow-up in the same pulmonary cells of the stages of polysaccharide accumulation and the possible participation of reticulo-endothelial cells in the intracellular metabolism of these substances, we performed intratracheal instillations of heparin and noted the onset and evolution of mast cell genesis induced by heparin.

We shall now proceed to a successive presentation of our observations on the experimental model of heparin-induced mast cell genesis, on histamin-induced mast cell genesis and. finally, on mast cell genesis determined by anthracosis.

Personal observations

The prints and sections of normal lungs, both human and collected from laboratory animals, display, after toluidine blue staining, three types of cells exhibiting a metachromatic reaction.

Firstly, there are the mucus-secreting cells in the epithelium of the air passages and appending glands. In sections they display a particular arrangement. In prints they can be easily identified by their elongated shape, the triangular and tachychromatic appearance of the nucleus and the absence of phagocyted particles ; all these peculiarities prevent their presence from being a misleading factor in the interpretation of the process of intrapulmonary mast cell genesis.

Secondly, there are the mast cells. In human subjects, they mostly assume the appearance of tissular cells and less frequently that of basophile granulocytes. In the guinea-pig, which was the animal used in our experimental investigations, all the cells bearing the appearance of mast cells observed in the normal lung were basophile polymorphonuclear cells. In pneumograms

they are present in a proportion of 0,2 per cent. In some of these cells the excessive amount of stored metachromatic substance covering even the nucleus, makes the cell appear compact to resemble a human tissular mast cell. After the polysaccharides have been removed from prints by means of hydrolysis at 60° C in normal hydrochloric acid and re-staining with May Grünwald—Giemsa stain, the polymorphous nucleus of the basophile granulocyte becomes clearly apparent, but of 50 elements photographed successively before and after acid hydrolysis, none was noticed to display the overlacy or round shaped nucleus of the tissular mast cell. This is why basophile polymorphonuclear cells are very often liable to be considered as mast cells whenever the above-mentioned technique is not adequately applied in view of the accurate identification of the nature of the cell containing metachromatic material. In sections, the difference is even more difficult to establish than in prints.

Thirdly, there are the reticulohistiocytic cells consisting mainly of pulmonary macrophages whose nucleus or protoplasm contains diffuse or granular metachromatic substances of alpha, beta or gamma intensity, according to PEARSE's classification [14] and which appear in pneumograms in a proportion of 0,5—2 per cent. We considered their quantitative variations to be an indication concerning the existence of a more or less extensive process of tissular mast cell genesis. We could not interpret these metachromatic substances as resulting from the phagocytosis of cells in mastocytoclasia, as we noticed no such processes in the neighbourhood of macrophages containing metachromatic particles. The considerably increased percentage of such macrophages under certain experimental and morbid conditions was an important argument showing that this was no process of phagocytosis.

Proceeding from the above findings, we made the following observations in prints and paraffin sections stained according to the techniques that will be mentioned for each particular investigation.

Heparinic mast cell genesis

Working method. Intratracheal drip-instillations of 0,5 ml of an aqueous solution of heparin (Heparin "RICHTER", Budapest) were performed in 60 adult guinea-pigs under chloral hydrate anaesthesia. Each instillation lasted 15—30 minutes. In the 0,5 ml solution each animal in the first group of guinea-pigs received 625 I. U. heparin : in the second group the animals received 1250 I. U. and in the third group 2500 I. U. The animals were sacrificed after an interval ranging from 1 hour to 9 days. No evident local change was noticed on gross examination after the penetration of heparin into the air passages, nor were any evident alterations observed to occur as regards blood co-agulability.

Evolutional features. After staining of the prints for 1—3 minutes with a 0,5 per cent aqueous solution of toluidine blue, our findings were as follows.

1. The penetration of heparin into the cells was the more rapid, the less units were contained in the 0,5 ml solution and the lower was its viscosity. This penetration is evident and diffuse 24 hours after the instillation.

2. At the end of 1—3 days, practically all the cells in the respiratory parenchyma are loaded with heparin and thus become metachromatic (Fig. 1*a*). However, the intensity of metachromasia varies with each individual cell,

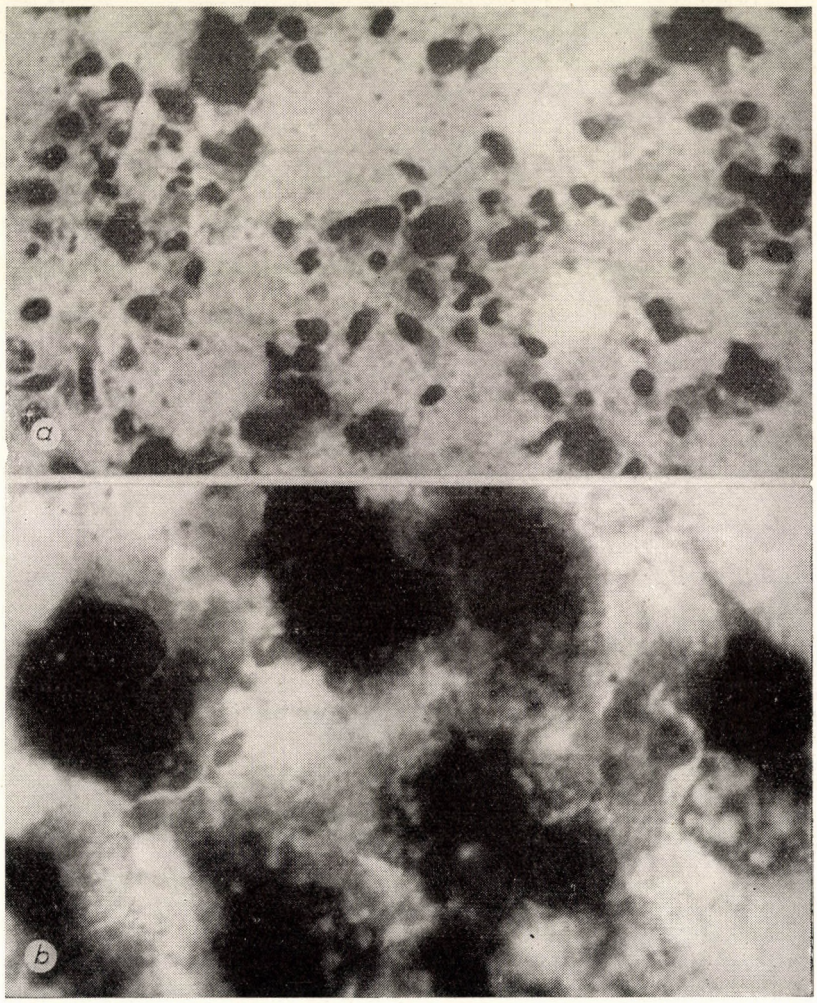


Fig. 1. Heparinic mast cell genesis. (Lung prints from guinea-pigs subjected to instillations of heparin.) *a)* 48 hours after instillation. Practically all the cells in the respiratory parenchyma have accumulated heparin and became metachromatic. (Toluidine blue staining, ×520.) *b)* The same preparation at a greater enlargement shows the various degrees of loading in each cell. Diffuse intracellular heparin storage is dominant. (Toluidine blue staining, ×1500.)

according to the spread of intracellular penetration, to the amount of accumulated substance and to the metabolic capacity of the cell (Fig. 1*b*).

3. Heparin is stored in the first place in pulmonary macrophages, apparently irrespective of the number of existing protoplasmic inclusions.

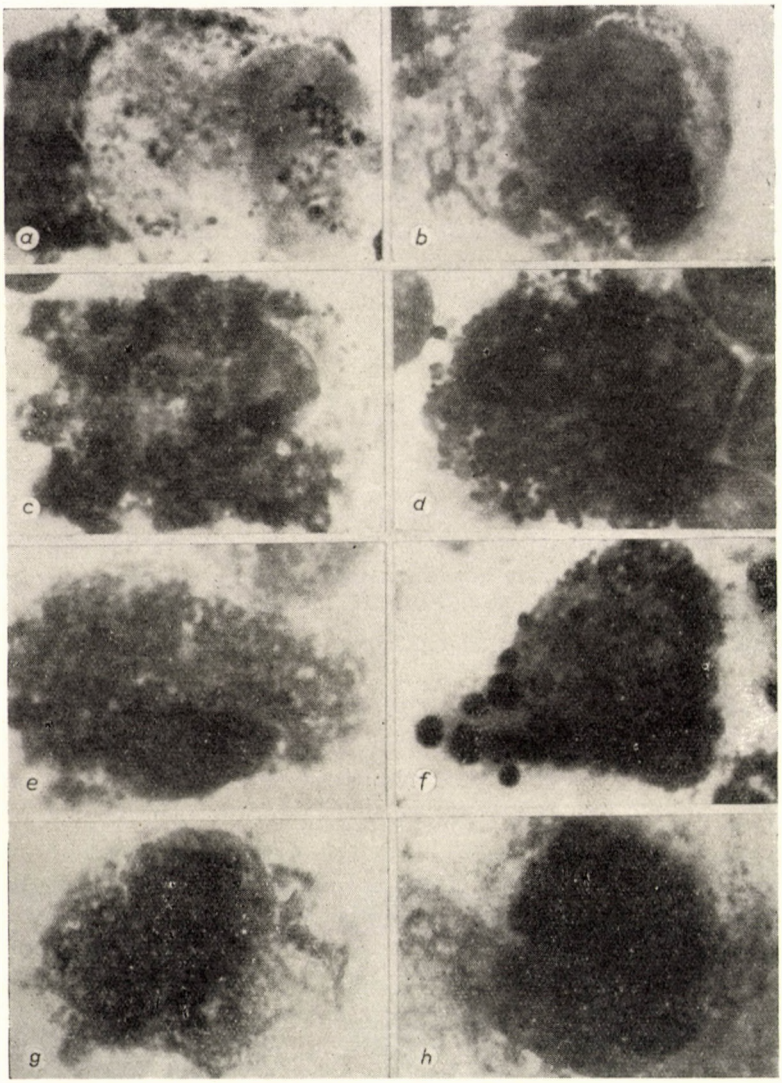


Fig. 2. Heparinic mast cell genesis. (Lung prints from guinea-pigs subjected to instillations of heparin.) *a)* Obvious tendency towards intranuclear accumulation of more diluted solutions, in the shape of small granules. These granules are situated in vacuoles. Compact agglomeration of heparin at the periphery of the cell (toluidine blue staining, × 2200). *b)* Obvious tendency towards intranuclear accumulation of more concentrated solutions in the shape of vesicles (toluidine blue staining, × 2200). *c)* Prevalent heparin concentration at the periphery of the protoplasm of macrophages in the shape of large sized particles (toluidine blue staining, × 2200). *d)* Prevalent heparin concentration around the perinuclear area of the cytoplasm, in the shape of granules of the mast cell type (toluidine blue staining, × 2200). *e)* Diffuse intracytoplasmic spreading of granules of the mast cell type. The nucleus is seen to be intensely metachromatic (toluidine blue staining, × 2000). *f)* Intracytoplasmic conversion of accumulated heparin in the shape of spherical granules of variable size (toluidine blue staining, × 2000). *g)* Intracytoplasmic and intranuclear agglutination of the granules (toluidine blue staining, × 2000). *h)* Intracellular concentration of heparin in the shape of intensely metachromatic, diffuse nucleocytoplasmic masses (toluidine blue staining, × 2200)

It also appears to be present in the cells forming reticular syncytia, in histiocytes, monocytes, endothelial cells, neutrophile granulocytes as well as in elements having a lymphoreticular appearance. None of the cells in the upper and lower air passages displayed the appearance of heparin acculumation.

4. A particularly striking fact is the considerable speed heparin accumulation in the cell nuclei, in varied shapes, ranging from small isolate metachromatic granules (Fig. 2*a*) to large compact vesicles (Fig. 2*b*). This peculiarity will be more extensively discussed below.

5. The intracytoplasmic accumulations are successively dominated by a tendency towards concentration at the periphery of the cell (Fig. 2*c*) and then, by a tendency towards perinuclear concentration (Fig. 2*d*). The protoplasm of cells in the pulmonary connective interstices and especially that of macrophages seems to possess the capacity of concentrating dilute solutions of heparin and of splitting the large vesicles from solutions of high concentrations. This process results in the appearance of cells resembling human tissular mast cells, which are evident especially between the 3rd and 5th day after the instillation. Their protoplasm contains small granules of about the same size (Fig. 2*e*), or of variable size (Fig. 2*f*), agglutinated granules forming large corpuscles (Fig. 2*g*) or homogeneous compact metachromatic material (Fig. 2*h*). Transition stages between all these patterns may be seen to exist and some of the microscopic fields display a certain prevailing type in the distribution of the instilled substance (Fig. 1*b*).

Pneumograms reveal that, 24 hours after the instillation, more than 50 per cent of the pulmonary macrophages contain accumulated metachromatic material : at the end of 48 hours this proportion attains 82 per cent. 20 per cent of these cells display the typical appearance of a mast cell and they can no longer be differentiated by toluidine blue and May Grünwald—Giemsa staining from the genuine mast cells of the lung. This great variety of patterns of intracellular penetration of heparin is followed at the end of 5—9 days after the instillations, by equally varied aspects, betraying the elimination of the instilled substance from the cell. At the end of the experimental period, we found that 10 per cent of the macrophages maintained the typical appearance of a mast cell for a period which we have as yet been unable to ascertain.

6. Consequent upon the penetration of heparin into the cells of the respiratory parenchyma, the appearance is noticed of structures suggestive of tissular mast cells, due to the reticular cells, macrophages, histiocytes and monocytes being loaded with metachromatic substance. The appearance is likewise noticed of structures suggestive of vascular mast cells determined by heparin accumulation within endothelial cells and of basophile granulocytes, resulting from the penetration of metachromatic substances into neutrophile polymorphonuclear cells. All these cells display dynamic patterns of assimilation, loading, accumulation, conversion and elimination of heparin

permitting the identification of clear successive stages of experimental mast cells genesis, from the appearance of the earliest metachromatic granules and up to their maximal intracellular accumulation.

Morphofunctional peculiarities. The foremost place among these peculiarities is held by the intranuclear accumulation of the instilled substance which was quite obvious and constant in all the cells under investigation. It is followed by some histochemical changes, among which we will mention the following.

1. Gradual insolubilization of the heparin which has penetrated into the nucleus. This process is quite obvious, beginning with the 3rd and 5th day after instillation, provided the same group of cells is followed up in a print first stained with toluidine blue, then discoloured by prolonged washing with water and restained with the same solution. As the experiment progresses in time, the number of nuclei from which heparin as no longer dissolved upon washing and which re-display intense metachromatic staining, gradually increases (Fig. 3*a* and *a'*).

2. The accumulation of desoxyribonucleic acid in areas displaying a maximum concentration of heparin. This process can be rendered evident by following up in prints the same cells stained with May Grünwald—Giemsa stain, subjected to normal hydrochloric acid hydrolysis at 60°C, and restained by the same technique (Fig. 3*b* and *b'*). The same intranuclear accumulations, which can be restained after removal of the instilled metachromatic substance and of ribonucleic acid, stain reddish-violet upon restaining according to the Feulgen-method, and green upon methyl green-pyronine staining. At the same time, as has been pointed out in a former study [19], ribonucleic acid is eliminated from the nucleus into the cytoplasm and accumulates in the areas in which a maximum concentration of heparin has been attained.

3. Some of the intranuclear heparin gradually becomes orthochromatic, another portion is converted in a faintly metachromatic substance which diffuses into the protoplasm amongst the intensely metachromatic granules of apparently unmodified heparin. This intergranular substance which in prints fixed in absolute alcohol is quite evident 5 days after instillation, does not disappear on washing, but it does so after treatment with testicular hyaluronidase (Luronase "BAYER"). Inactivated hyaluronidase leaves it unchanged. It probably results from the conversion of heparin into muccopolysaccharides of the type of hyaluronic acid or chondroitin sulphuric acids (Fig. 3).

These experimental observations demonstrate that the cells of the respiratory parenchyma, which display the microscopic appearance of mast cells' genesis consequent upon the gradual accumulation of heparin, are at the same time altering this substance. It becomes more stable by being bound to the acid protein structures in the nucleus and protoplasm. It is then probably subjected to desulphatation and depolymerization processes and converted

into other polysaccharides which are extracted by hyaluronidase. The process of experimental mast cell genesis determined by heparin has therefore the value of an obvious proof of the capacity of pulmonary reticulo-endothelial cells to take an active part in the metabolism of polysaccharides.

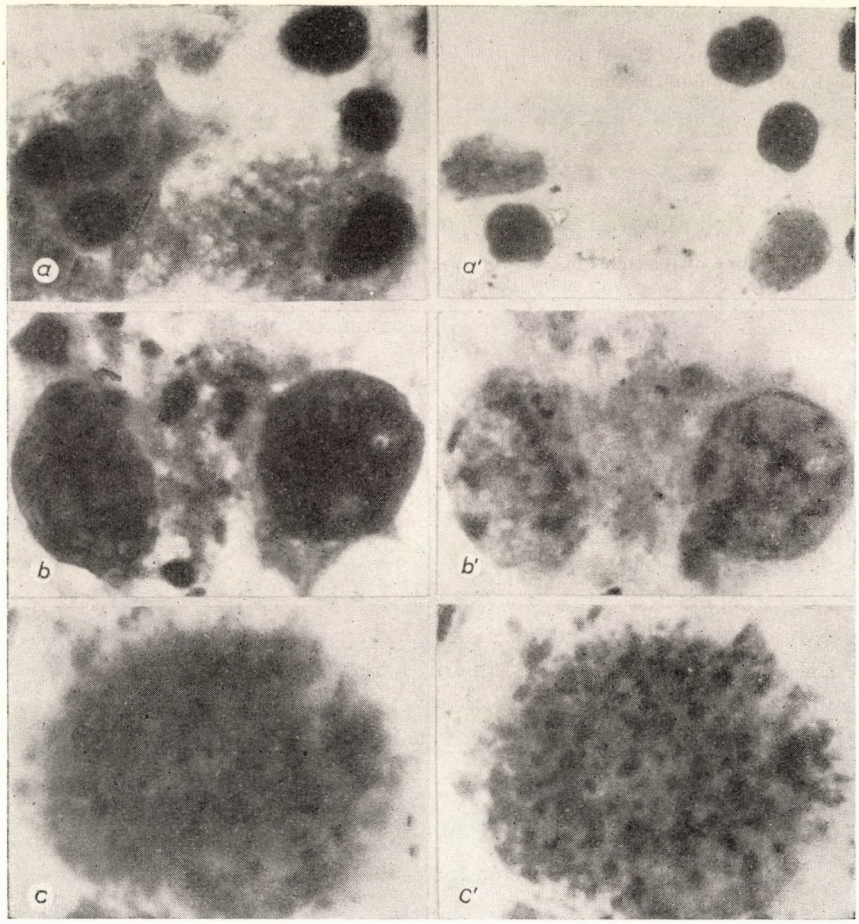


Fig. 3. Heparinic mast cell genesis. (Lung prints from guinea-pigs subjected to instillations of heparin.) *a* and *a'* : Same group of cells stained with toluidine blue *(a)*, discoloured with distilled water and restained with toluidine blue *(a')*, showing total disappearance of metachromasia in the protoplasm and in two nuclei only. In the remaining three nuclei, heparin had become insoluble and was not swept off upon clearing, the nuclei recovering their metachromasia (× 2000). *b* and *b'* : Same two cells stained with May Grünwald—Giemsa stain *(b)*, discoloured with hydrochloric alcohol, subjected to 60° hydrolysis in normal hydrochloric acid and restained with May Grünwald—Giemsa stain *(b')*. After removal of heparin and ribonucleic acids, a more intensely stained material appears, consisting of desoxyribonucleic acids and accumulating in the areas with the highest concentration of heparin (× 2000). *c* and *c'* : Same cell afterfixation in absolute alcohol, stained with toluidine blue *(c)*, discoloured with hydrochloric alcohol, subjected to hyaluronidase extraction and restained with toluidine blue *(c')*. The action of hyaluronidase results in the disappearance of the intergranular metachromatic substance (× 3000)

Histaminic mast cell genesis

Working method. These investigations were based on the previous observation that an increased amount of metachromatic substances appeared in pulmonary macrophages under the influence of certain pneumokoniotic factors which determine a simultaneous intrapulmonary increase of histamine [13]. Four hundred guinea-pigs were used in the following experiments.

1. Inhalations of tobacco smoke by the application on the animals' muzzle of a rubber tube provided with a lighted cigarette which was kept burning by the very act of respiration. After the daily smoking of 1/2 cigarette by each animal, the biological determinations of histamine by its action on the terminal intestine of the guinea-pig, performed by C. RACOVEANU, yielded the following figures :

— in normal animals : 30 μg per 1 g of fresh lung tissue ;
— after 30 inhalations : 48 . 40 μg per 1 g of fresh lung tissue ;
— after 60 inhalations : 66 . 40 μg per 1 g of fresh lung tissue ;
— after 90 inhalations : 104 . 48 μg per 1 g of fresh lung tissue ;

These figures express mean values obtained in groups of 5—10 guinea-pigs.

2. Inhalations of pure silicium dioxide in a concentration of 15 mg per 1 ml in 24 hours with a prevalent size of particles of 1—3 μ. According to USPENSKI (16) as well as to our own investigations, such inhalations are followed by an increase in the pulmonary histamine content, resembling that obtained under the influence of tobacco smoke.

3. Intratracheal instillations of exogenous histamine (Histamine hydrochloride "CIF" Bucharest). Ten μg of the drug were applied three times at 4 days' intervals. As has been pointed out in other studies by USPENSKI [17] as well as by our own biological determinations [10], this method causes a considerable and progressive increase of pulmonary histamine content, similar to the one obtained with inhalations.

4. Electrical stimulation of the cervical vagus nerve for 3 minutes with an induction current of 52/sec. frequency and 5 volts in the primary circuit of the bobbin. This technique, which has been devised by one of us [20], causes an intrapulmonary accumulation of endogeneous histaminic substances, attaining values of 70—90 μg during the first 5 days after stimulation of the vagus nerve.

5. Parallel investigations were carried out in groups of animals which received an intraperitoneal injection of 0,001 mg of promethazine, a synthetic antihistaminic drug (Phenergan "SPECIA" Paris), 30 minutes before the inhalation of tobacco smoke and before the instillation of histamine. Biological determinations revealed that these injections maintain the amount of pulmonary histamine at subnormal levels (between 13.80 and 19.20 μg per g of fresh lung tissue) [11].

Evolutional features. After counting 500 elements in the pneumograms of normal guinea-pigs, we found 0,5 to 2 per cent of the macrophages to contain metachromatic particles. After the first 3 days of the experiment, their number increased, attaining

— 18 per cent after inhalations of tobacco smoke
— 10 per cent after inhalations of silicium dioxide
— 7 per cent after instillations of histamine
— 8 per cent after stimulation of the vagus nerve.

In animals treated with injections of the antihistaminic drug, the percentage of macrophages containing metachromatic material was within normal limits.

After the first 5 days of the experiment, the increase continued, attaining

— 19—20 per cent after inhalations of tobacco smoke
— 14 per cent after inhalations of silicium dioxide
— 12 per cent after instillations of histamine
— 9 per cent after stimulation of the vagus nerve.

In animals receiving injections of antihistaminic drugs the percentage of macrophages containing metachromatic material was still kept within normal limits.

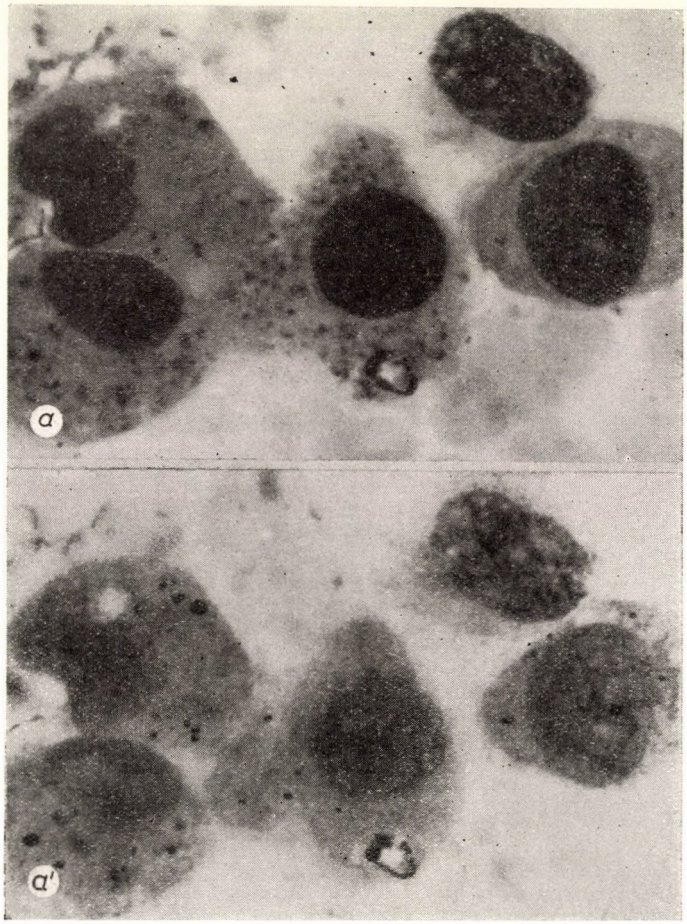


Fig. 4. Histaminic mast cell genesis. (Lung prints from guinea-pigs subjected to instillations of histamine.) *a* and *a'*: A group of macrophages 5 days after intratracheal instillation of histamine. Toluidine blue staining reveals metachromatic nuclei, while in the protoplasm the appearance is noticed of a variable number of granules of different metachromatic intensities *(a)*. After discolouring in hydrochloric alcohol and restaining of the same cells with haemalum-eosin, the metachromatic material no longer appears. Only mineral particles are visible *(a')* (× 2000)

While the experiment is continued, the progressive increase in the number of cells containing metachromatic material is gradually replaced by a tendency towards a progressive intracellular accumulation of these substances.

As regards the peculiarities of the microscopic appearance of the intrapulmonary accumulations of metachromatic material, they may be summed up in the following points.

1. The appearance of groups of macrophages in which, along with the mineral cell inclusions, toluidine blue staining begins to reveal the first polysaccharide granules displaying a metachromatic reaction, varying in intensity between alpha and beta, according to the classification of PEARSE [14]. Hydrochloric alcohol discolouring of the prints and restaining with haemalum-eosin allows of a comparative determination to be made, in the same groups of cells, of the amount of intracellular space occupied by polysaccharides (Figs. 4*a* and *a'*).

2. Some of the macrophages initially exhibit more obvious accumulations of metachromatic substance within their nuclei. The material appears in the shape of compact blocks disposed on the chromatin network. It is not pyroninophile, nor is it more intensely stained than the remainder of the nucleus with the Feulgen-method (Fig. 5*a*). It generally shows a higher metachromatic intensity than the granules in the protoplasm. For this matter, in some of the macrophages, the concentration of polysaccharides seems to take place at first only inside the nucleus. In other cells, the intensity of nuclear metachromasia increases from beta towards gamma. Consequently, the intranuclear polysaccharide accumulations are far better outlined and show a tendency to become arranged around the nucleoli and nuclear vacuoles (Fig. 5*b*). Some of the macrophages exhibit a considerable increase of polysaccharide particles both in the nucleus and in the protoplasm. The intranuclear ones maintain the characteristic perivacuolar arrangement, whereas the protoplasmic ones accumulate in groups without any apparent agglutination (Fig. 5*c*).

Consequent upon their continuous accumulation, the metachromatic substance undergoes a quantitative increase both in the nucleus and in the protoplasm along with the appearance of coalescent granular patterns and metachromasia of variable intensity (between alpha and gamma) (Fig. 5*d*). The macrophages having stored an even greater amount of polysaccharides, begin to resemble in appearance the tissular mast cell; their protoplasm is full of granules of a smaller (Fig. 5*e*) or larger (Fig. 5*f*) size, similar to the structures developing in the same pulmonary macrophages 3—5 days after the intratracheal instillation of heparin (see Figs. 2*d*, 2*e* and 2*f*). Along with the gradual accumulation of granules, apart from their tendency towards agglutination, metachromatic reactions of a lower intensity may be observed in the intergranular protoplasm as well (Fig. 5*g*). At the final stage of this evolutional process, the intergranular substance and the granules form an intensely metachromatic compact mass wherein no structure can any longer be distinguished and the cells display the typical appearance of tissular mast

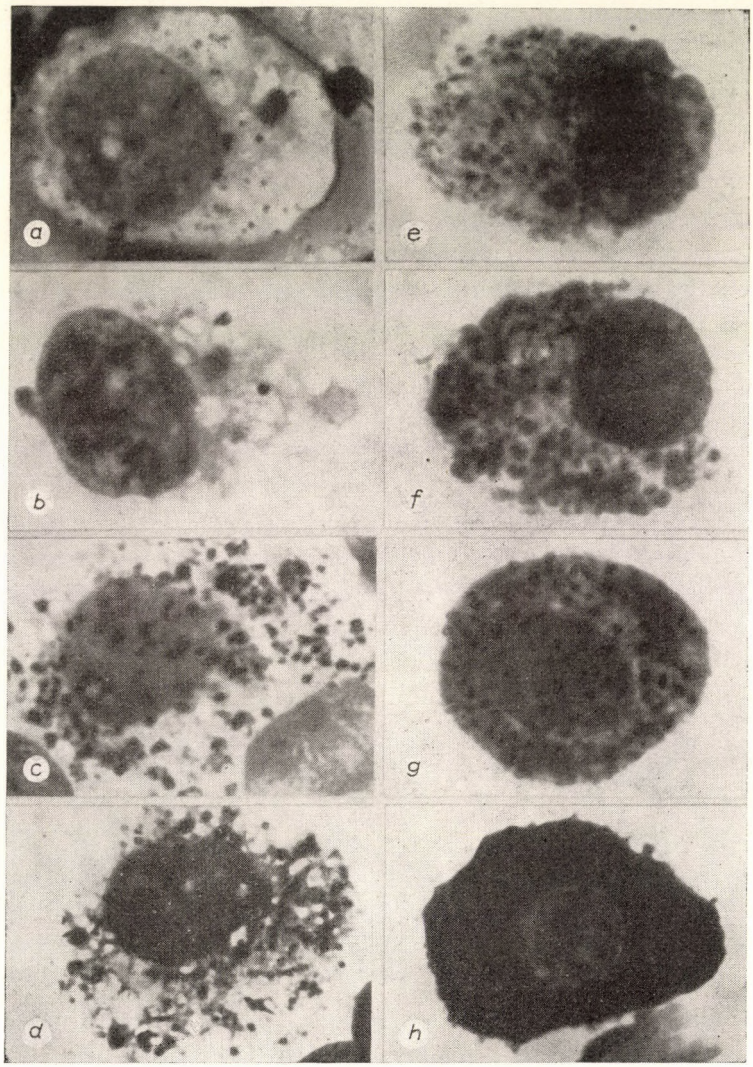


Fig. 5. Histaminic mast cell genesis (Lung prints from guinea-pigs subjected to inhalations of tobacco smoke.) Evolutional aspects of intracellular polysaccharide accumulation. *a)* Appearance of intranuclear metachromatic masses and of slightly metachromatic granules in protoplasm (toluidine blue staining, × 2200). *b)* Increased amount and intensity of the metachromasia of intranuclear polysaccharide masses (toluidine blue staining, × 2200). *c)* Increased number of metachromatic granules in the nuclei and protoplasm. The nuclear granules are located around vacuoles (toluidine blue staining, × 2200). *d)* Granular coalescence in the nucleus and protoplasm, with intense metachromasia (toluidine blue staining, × 2200). *e)* Massive accumulation of small-sized granules (toluidine blue staining, × 2200). *f)* Massive accumulation of large-sized granules (toluidine blue staining, × 2200). *g)* Intergranular metachromatic reaction of the protoplasm (toluidine blue staining, × 2200). *h)* Typical appearance of a tissular mast cell (toluidine blue staining, × 2200)

cells (Fig. 5*h*). We observed a similar appearance after intratracheal instillations of heparin (see Figs. 1*b* and 2*h*).

3. This evolutional process takes place during the first 2 months of the experiment and results in the conversion of some of the pulmonary macrophages into cells of the appearance of a tissular mast cell, owing to a progressive intracellular accumulation of polysaccharides. It may be assumed that not all the cells which eventually develop metachromatic substances complete the entire evolution and attain the appearance of a mast cell and that many of them do not go beyond certain transitional stages such as those featured in Figs. 4 and 5. In the group of animals treated with antihistaminic drug, we did not observe the occurrence of this process of mast cell genesis attaining the appearance of tissular mast cells, but only a few macrophages loaded with metachromatic granules resembling the cells featured in Fig. 4*a*.

Topographically, the cells containing metachromatic material are septal macrophages or mobilized macrophages in the alveolar lumen. Their distribution within the respiratory parenchyma is not uniform. Besides macrophages identified on the basis of the inclusions which they contain, we observed the presence of metachromatic particles in reticular cells, histiocytes and monocytes.

4. Consequent upon the intraprotoplasmatic accumulation of metachromatic material, the appearance is noticed of pericellular haloes due to the passage of these substances from the cells into the connective interstice of the lung. The passage of polysaccharides from macrophages into the interstice is particularly obvious towards the end of the second month of the experiment, when it gives rise to an accumulation of polysaccharides within the alveolar walls. These accumulations are supposed to play a definite part in the subsequent development of the process of sclerosis [12].

Morphofunctional peculiarities. Among these peculiarities we will mention the following.

1. Histochemically, the metachromatic substances that accumulate within pulmonary macrophages are intensely PAS positive upon Hotchkiss—McManus staining (Figs. 6*a* and *a'*). Preliminary acetylation of the sections prevents this reaction, and treatment with dilute potassium hydroxide determines its reappearance. Best's carmine staining, as well as the Millon test were negative. The metachromatic granules are not more evident than the remainder of the protoplasm or of the nucleus when stained by methyl green-pyronine or by the Feulgen-technique.

2. Testicular hyaluronidase extraction (Luronase "BAYER") yielded no obvious results except in the second month of the experiment and only in the cells having the appearance of a tissular mast cell, *i. e.* those in which considerable polysaccharide accumulation had taken place. In some of these cells, the pericellular metachromatic halo disappears after extraction, whereas

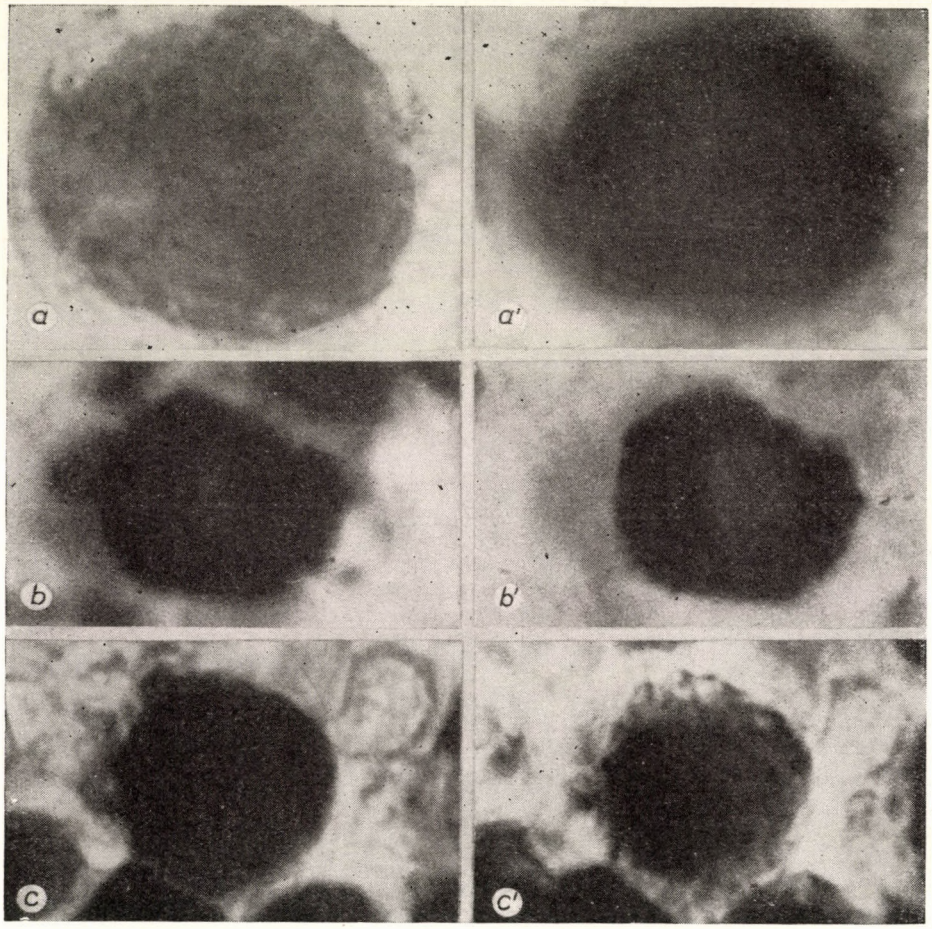


Fig. 6. Histaminic mast cell genesis (Lung prints from guinea-pigs subjected to inhalations of tobacco smoke.) *(a* and *a'):* Upon toluidine blue staining, the nucleus appears to be diffusely and intensely metachromatic, while the protoplasm displays a less marked metachromasia *(a)*. After discolouring in hydrochloric alcohol and restaining according to the Hotchkiss—McManus technique, the same cell is shown to be intensely PAS positive in its entirety *(a')* (× 3000). *(b* and *b') :* A polysaccharide-loaded cell, displaying upon toluidine blue staining a less metachromatic diffuse pericellular halo *(b)*. After discolouring in hydrochloric alcohol, hyaluronidase extraction and restaining with toluidine blue, the pericellular halo disappears, while the protoplasm and the nucleus maintain the same intensity of the metachromatic reaction *(b')* (× 2000). *(c* and *c'):* A polysaccharide-loaded cell, displaying, after fixation in absolute alcohol, an intense and diffuse metachromatic reaction upon toluidine blue staining *(c)*. The same cell, after discolouring in hydrochloric alcohol, hyaluronidase extraction and toluidine blue staining, displays partial disappearance of protoplasmic polysaccharides, particularly of intergranular ones, while the nucleus recovers its intense metachromasia *(c')* (× 2000)

the protoplasm and the nucleus remain unchanged (Figs. 6*a* and *b'*). In other cells the enzymatic action is followed by the partial disappearance of the metachromatic contents of the protoplasm and particularly of the intergranular substance (Figs. 6*c* and *c'*). These results are similar to those obtained after hyaluronidase extraction in animals sacrified 5 days after the instillation of heparin, in which the intergranular metachromatic substance in the protoplasm was also noticed to disappear (see Figs. 3*c* and *c'*).

3. After removal of the metachromatic material and of ribonucleic acid by means of acid hydrolysis in normal hydrochloric acid at 60° C, the Feulgen test sometimes results in a reddish-violet staining which is more intense than in the remainder of the nucleus, located in the perinuclear areas and in the proximity of the nuclear membrane, *i. e.* the former sites of polysaccharide accumulation. These patterns resemble those obtained after the intratracheal instillation of heparin, when we found an increased amount of desoxyribonucleic acid in the areas in which heparin attained the highest concentration (see Figs. 3*b* and *b'*). Another consequence of hydrolysis is the disappearance, upon May Grünwald—Giemsa restaining, of the azurophile material concentrated in the same regions of the protoplasm as the polysaccharide particles.

Anthracosic mast cell genesis

Working method. The investigations were carried out in the lungs and tracheobronchial lymph nodes of 50 subjects, displaying a certain degree of anthracosis. Specimens exhibiting tuberculous lesions or other considerable changes determined by prolonged toxic or infectious onditions were discarded.

Evolutional features. Intermediate stages between the macrophage and the tissular mast cell resembling those obtained in mast cell genesis determined by heparin and histamine, are mainly encountered in the tracheobronchial lymph nodes. A single microscopic field may contain 2—3 cells displaying either similar or very different degrees of polysaccharide accumulation, ranging from a few granules to a maximum loading (Fig. 7*a* and *b*).

A follow-up of this evolutional process in prints and photographs of the same cells successively stained with toluidine blue and haemalum-eosin revealed the following facts.

1. In some of the macrophages loaded with small coal particles, the appearance of small amounts of metachromatic material within the nucleus and the protoplasm is noticed. They are mainly deposited on the mineral inclusions, but they also appear as isolated granules (Figs. 8*a* and *a'*). As they are accumulating in larger amounts, they partly dissimulate the mineral

inclusions and gradually come to prevail within the cell (Fig. 8*b* and *b'*). At a later stage, they undergo fusion resulting in larger corpuscles (Figs. 8*c* and *c'*) or multiplication as isolated granules which fill up the whole cytoplasm, thereby causing the macrophage to assume the appearance of a tissular mast cell

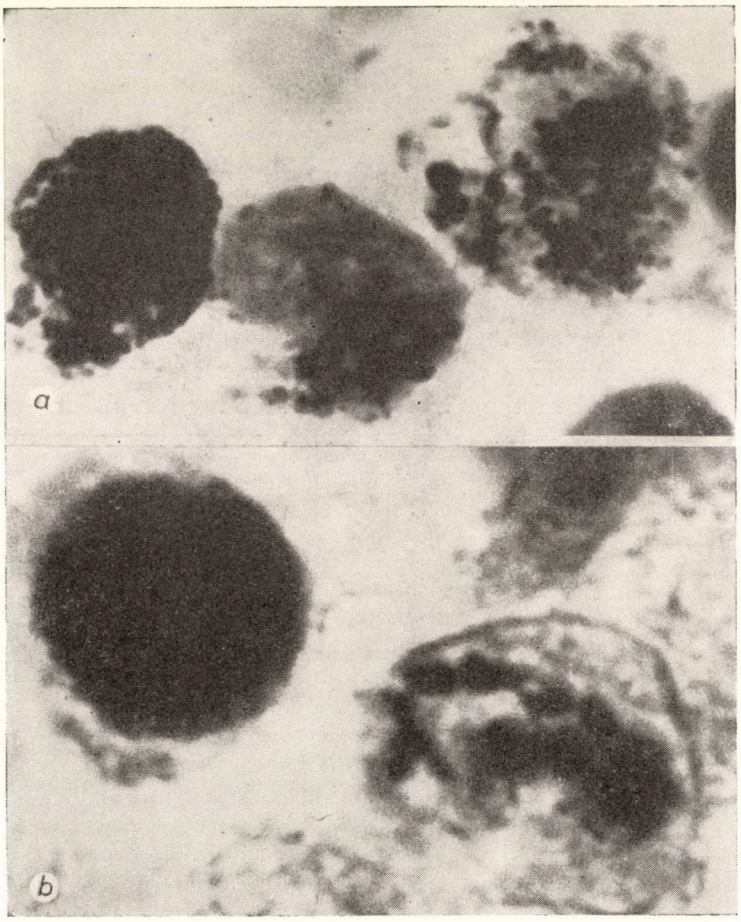


Fig. 7. Anthracosic mast cell genesis (sections of human tracheobronchial lymph nodes). *a)* Varied aspects of polysaccharide loading in 3 cells (toluidine blue staining, × 2000). *b)* A cell displaying diffuse polysaccharide loading next to a cell which displays but a few granulations (toluidine blue staining, × 3000)

(Figs. 6*d* and *d'*) similar to that obtained 3—5 days after the instillation of heparin (see Figs. 2*c*, *d*, *e* and *f*) and at the end of the first month's gradual increase of histamine in the lung (see Figs. 5*e*, *f* and *g*). The above-mentioned patterns are noticed both in the lung and in the tracheobronchial lymph nodes.

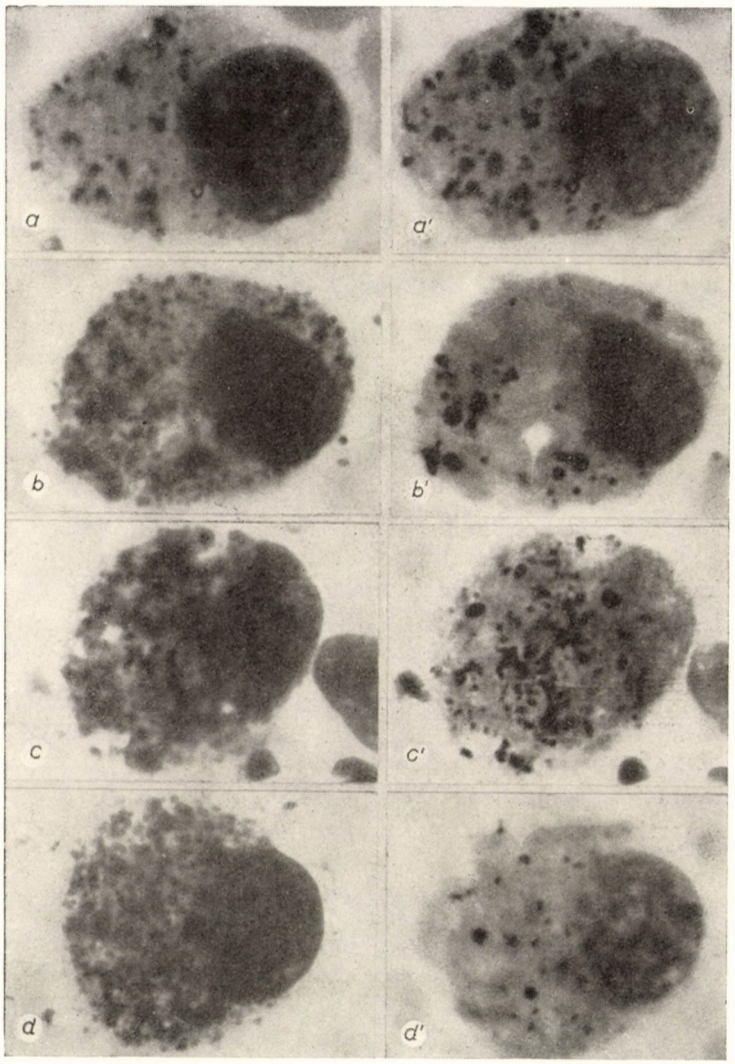


Fig. 8. Anthracosic mast cell genesis (prints of human lung). Evolutional aspects of intracellular polysaccharide accumulation. *(a* and *a') :* Upon toluidine blue staining, the mineral inclusions are less clearly visible, as they display a slightly metachromatic halo *(a)*. After discolouring in hydrochloric alcohol and restaining by haemalum-eosin, the same macrophages exhibit sharply outlined patterns of cell inclusions *(a')* (× 2200). *b* and *b' :* While polysaccharides are gradually accumulated, toluidine blue staining shows them partly covering the mineral inclusions and being deposited in the spaces between these inclusions *(b)*. After discolouring in hydrochloric alcohol and restaining with haemalum-eosin, the same macrophage no longer exhibits granules amongst the coal particles *(b')*. (× 2200). *(c* and *c'):* A tendency towards agglutination of accumulated metachromatic particles causing the cell to assume the appearance of a mast cell upon toluidine blue staining *(c)*. After discolouring in hydrochloric alcohol and restaining with haemalum-eosin, the same macrophage appears to be deprived of metachromatic substance, but it contains a large amount of mineral inclusions *(c')*. (× 2200). *(d* and *d'):* Massive agglomeration of metachromatic material, causing the cell to assume the appearance of a mast cell upon toluidine blue staining *(d)*. Discolouring in hydrochloric alcohol and restaining with haemalum-eosin shows that the major part of the protoplasm was covered by metachromatic material *(d')*. (× 2200)

The human lung affected by anthracosis displays areas wherein 35—82 per cent of the pulmonary macrophages contain mucopolysaccharide substances. Of these cells, $^1/_3$ has the appearance of a tissular mast cell and contains mineral inclusions. In some of the lymph nodes, there are areas wherein photographs of 100 cells displaying the typical appearance of mast cells revealed that 72 of them contained mineral inclusions grouped around the nucleus, scattered throughout the cell, placed at the periphery of the protoplasm. Some of these inclusions were stained dark blue with Prussian blue, the test used for the detection of iron.

Morphofunctional peculiarities. Among the morphofunctional peculiarities of these cells, let us mention the following.

1. In those cells which contain polysaccharide films around the mineral inclusions, enzymatic extraction generally failed to modify these aspects.

2. In some of the mast cells, originating from the cells which contained no mineral inclusions, after May Grünwald—Giemsa staining of the prints, their discolouring with hydrochloric alcohol and restaining with toluidine blue, the metachromatic material was swept off at discoloration, whereas the granules which were present on the nuclear surface, reappeared with intense metachromasia (Figs. 9*a* and *a'*). This might prove that human mast cells also contain intranuclear metachromatic substances and the above-mentioned figure features patterns which might be interpreted as stages in the transition of these granules from the nucleus towards the protoplasm.

3. Extraction by means of testicular hyaluronidase is followed in some cells by the partial disappearance of the protoplasmic metachromatic material, whereas the intranuclear and perinuclear polysaccharides do not seem to have undergone any change as they restain with the same intensity with toluidine blue (Figs. 9*b* and *b'*). In other cells, hyaluronidase extracts the whole protoplasmic content, leaving only the intranuclear polysaccharides unchanged, while in others, the metachromatic content of the whole cell is apt to disappear (Figs. 9*c* and *c'*). These patterns are another argument in favour of the intranuclear presence of metachromatic substances in human mast cells. They are comparable to some of the results obtained in processes of experimental cell genesis. In a special study carried out on this subject [18] by the examination of 200 mast cells in human tracheobronchial lymph nodes, photographed successively before and after hyaluronidase extraction, we found that about 10 per cent are totally and 15 per cent partly deprived of their metachromasia under the influence of hyaluronidase. When hyaluronidase extraction is preceded by pepsin digestion, the proportion of elements which are totally deprived of their metachromasia is increased to 20 per cent, while partial depletion occurs in 50 per cent. In so far as such changes did not occur after inactivated hyaluronidase treatment, we considered them to be a direct consequence of the enzymatic action.

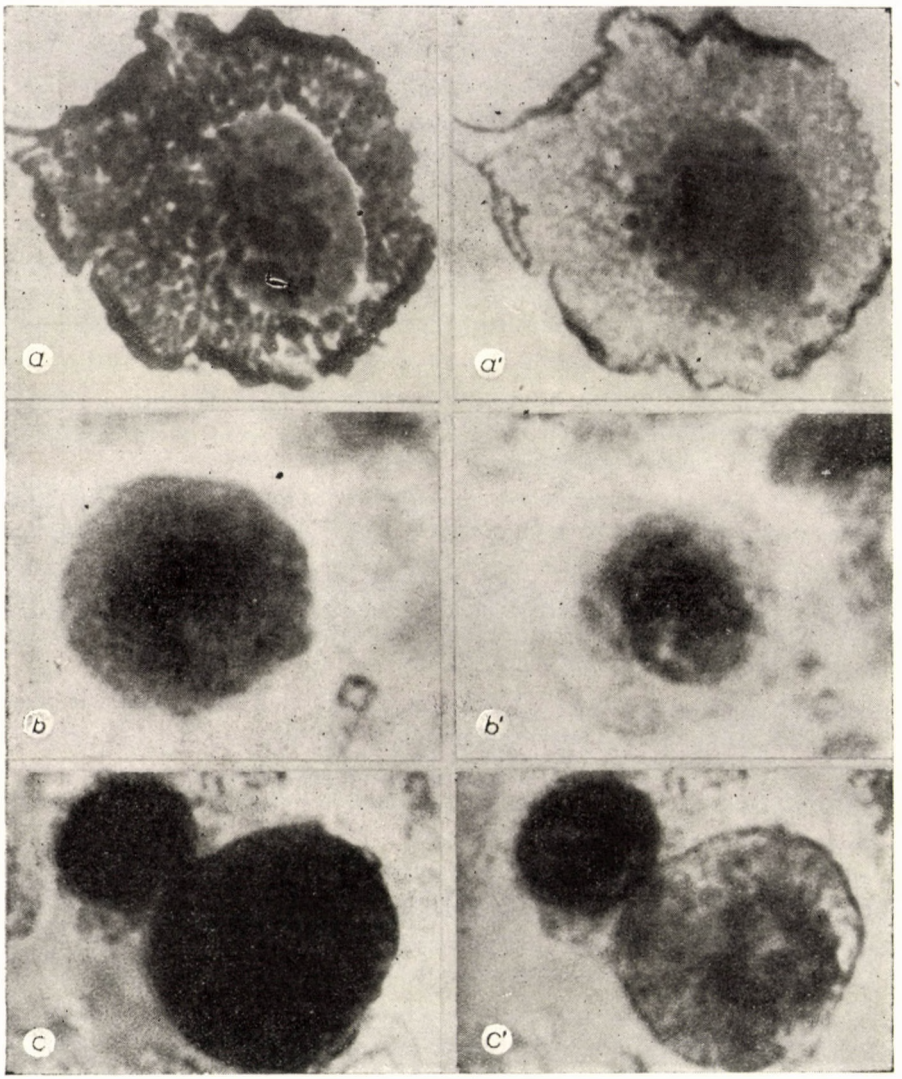


Fig. 9. Anthracosic mast cell genesis (prints and sections of human tracheobronchial lymph node). *(a* and *a') :* A cell which contains no mineral inclusions, displaying the appearance of a mast cell, in a print according to May Grünwald—Giemsa stained *(a)*. Discolouring in hydrochloric alcohol and restaining with toluidine blue is followed by the disappearance of the whole amount of metachromatic material from the protoplasm, while the polysaccharide granules in the nuclei again become metachromatic *(a')* (× 2200). *b* and *b' :* A cell which contains no mineral inclusions, displaying the appearance of a mast cell, in a section subjected to formalin fixation and toluidine blue staining *(b)*. Discolouring in hydrochloric alcohol, hyaluronidase extraction and restaining with toluidine blue determine the disappearance of the metachromatic material from the protoplasm, except in the perinuclear area. The polysaccharides within the nucleus recover intense metachromasia *(b')* (× 2000). *(c* and *c'):* A cell which contains no mineral inclusions, displaying the appearance of a mast cell in a section subjected to formalin fixation and toluidine blue staining *(c)*. Discolouring in hydrochloric alcohol, hyaluronidase extraction and restaining with toluidine blue determine the disappearance of the metachromatic material both from the nucleus and from the protoplasm *(c')* (× 2000)

Discussion

Our observations on experimental and necropsy specimens show that the intratracheal instillation of heparin, as well as the progressive increase of polysaccharide accumulation within the pulmonary reticulohistiocytic cells, consequent upon an increase of intrapulmonary histamine and the irritative action of certain phagocyted particles, results in the appearance of many similar microscopic patterns, indicating the transformation of certain cells of the respiratory parenchyma and tracheobronchial lymph nodes into cells belonging to the type of tissular mast cells. In necropsy specimens the progress of these transformations had a course to be reconstructed. However, this reconstruction was based on a comparison with the evolutional features induced by the intracellular penetration of heparin and by the gradual numerical increase under the influence of histamine of the elements which store increasing amounts of polysaccharides. We therefore consider that certain analogies may be established between these three aspects. Consequently, a more general concept of the genesis of cells displaying the appearance of a tissular mast cell may be justified.

We must begin by stating that it is as yet impossible to ascertain whether the metachromatic substances, whose gradual accumulation is quite apparent, are the result of a cell secretion or of the uptake of endogeneous polysaccharides from interstitial fluids. We insisted upon the tendency towards intranuclear accumulation of heparin, upon the appearance of metachromatic material within the nuclei of pulmonary macrophages under the influence of histamine, as well as upon the presence of metachromatic substances in the nuclei of human mast cells. However, none of these observations have enabled us to prove that the substances in question result from nuclear secretion. In the available literature, LEUCHTENBERGER and SCHRADER [8] are the only authors who observed that polysaccharides are synthetised in the salivary glands from substances resulting from the metabolism of desoxyribonucleic acid. Could there be established a similarity with the changes observed after intratracheal instillations of heparin, particularly in animals that received the least concentrated solution, we should rather maintain that intranuclear accumulation of endogenous polysaccharides is a result of the progressive concentration at this level of substances which invade the protoplasm in amounts that cannot be demonstrated by means of the present histochemical methods.

Whereas in the matter of the origin of the intranuclear metachromatic material, these assumptions remain to be verified in the future, the participation of the nucleus in the metabolism of this material has been clearly demonstrated by the investigations presented in this study. Exogenous heparin is gradually rendered insoluble in water, then partly transformed into ortho-

chromatic material and partly into desulphated polysaccharides, presumably of the type of hyaluronic and chondroitin sulphuric acids, which are extracted by testicular hyaluronidase. These experimental results verify ASBOE—HANSEN's hypothesis [1], according to which heparin might be considered as a precursor of hyaluronic acid. The intranuclear metabolism of exogenous heparin is associated with quantitative and topographic changes in nucleic acids. In the process of mast cell genesis, determined by histamine, hyaluronidase extractions likewise demonstrate the existence of intranuclear polysaccharides resisting the action of the enzyme, whereas the polysaccharides contained in the protoplasm disappear after hyaluronidase extraction. In these cases it might likewise be maintained that some of the cells displaying the appearance of a tissular mast cell contain polysaccharides of the heparin type in their nucleus and of the hyaluronic and chondroitin sulphuric acid type in their protoplasm. Similar observations were made in human specimens which show this process to be of more general nature. We encountered many patterns wherein the nuclear concentration of metachromatic substances was far more evident than the protoplasmic one and which displayed patterns that might be interpreted as a passage of granules from the nucleus towards the protoplasm.

All these observations raise new problems related to the morphofunctional structure of mast cells. The metachromatic material is probably first accumulated and metabolized within the nucleus, being subsequently eliminated into the protoplasm. This point of view has to be substantiated by further investigations, the more so as it is opposed to current hypothesis maintaining that phagocytosis and engulfing of polysaccharides from the extracellular spaces occurs exclusively at the level of the cytoplasm. We presented the process of mast cell genesis under the influence of histamine and anthracotic particles, owing to the obvious appearance of transitional forms from pulmonary macrophages towards the tissular mast cell. This process may also be encountered in non-anthracotic lungs, which are affected by certain inflammatory processes, as well as in other organs such as the skin, myocardium, spleen, uterus and particularly the lymph nodes. The determining factors seem therefore to be very numerous and, in a more general level, this process might be looked upon as one of the adaptation reactions of reticulo-histiocytic cells to the irritative action of certain harmful factors. According to their physicochemical and biological properties, to the reactivity of the body in general and to the reactivity of cells of the macrophage type in particular, these factors determine the appearance of what we suggest should be called "states of polysaccharide loading".

This is a metabolic process rather than an actual cell genesis and it might be analogically compared to the lipoid loading of the same cells. Not all of the cells which develop fat particles evolue to the adipocytic stage. According

to the degree of their loading and to their enzymatic equipment, the remainder stop at various reversible intermediate stages.

At present there is no longer any doubt as regards the origin of basophile granulocytes from the myeloid series, whence they go through a series of well-known stages consisting of cells with definite morphofunctional peculiarities. The cells displaying the appearance of tissular mast cells seem to result from an intracellular accumulation of polysaccharides which is liable to take place in various mesenchymal cells. This is no process of genesis in the usual meaning of the word, but rather a particular metabolic activity. Thus considered, the differences between the basophile granulocyte and the cell displaying the appearance of a tissular mast cell, become even more evident as only the former is an autonomous cell. From the same point of view, certain notions related to the pathology of mast cells should perhaps also be taken into account. Certain benign mastocytomes might be considered as equivalent, as regards carbohydrate metabolism, to lipomata in lipoid metabolism, while certain forms of mastocytosis might be interpreted as accumulative reticuloses, namely polysaccharide thesaurismoses, rather than as leukaemic conditions.

Summary

The conversion of mesenchymal cells into cells displaying the appearance of tissular mast cells has been investigated by studying mast cell genesis caused by heparin, histamine and anthracosis, respectively. It has been found that the cells displaying the appearance of mast cells result from an excessive accumulation of polysaccharides under the influence of irritating factors in various reticulohistiocytic cells and particularly in those which are to become macrophages. The suggestion is made that the reversible stages of this accumulation be called "states of polysaccharide loading".

The nucleus of macrophages takes an active part in the process of intracellular accumulation and transformation of metachromatic substances, displaying varied nuclear and protoplasmic metabolic patterns. In discussing the results of this study, the cells displaying the appearance of tissular mast cells are not considered autonomous. They are supposed to represent the morphological expression of special activities in the carbohydrate metabolism of various mesenchymal cells.

REFERENCES

1. Asboe-Hansen, G.: (1953) Autoradiography of mast cell in experimental skin tumors of mice injected with radioactive sulfur (S^{35}). Cancer Res. *13*, 587. — 2. Bessis, M.: (1954) Traité de cytologie sanguine. Masson, Paris. — 3. Данилова, М. К.: (1958). Спорные вопросы происхождения и функционального значения тучных клеток. Арх. Патол. *22*, 3. — 4. Degos, R. et T. Cottenot: (1953) Physiologie du mastocyte tissulaire. Bull. Soc. franç. Dermat. Syphil. *63*, 228. — 5. Fawcett, D. W.: (1955) An experimental study of mast cell degranulation and regeneration. Anat. Rec. *121*, 29. — 6. Frick, R.: (1950) Zur Physiopathologie der Mastzellen. Acta Haematol. (Basel), *4*, 97. — 7. Hissard, R., L. Moncourier et J. Jacquet: (1951) Sur la formation des mastocytes et l'origine de l'héparine. Bull. Acad. nat. med. Paris, *135*, 408. — 8. Hissard, R., L. Monocourier et J. Jacquet: (1952) Sur les différentes fibres conjonctives et sur la formation des basocytes. C. R. Acad. Sci. (Paris), *235*, 822. — 9. Leuchtenberger, C. and F. Schrader: (1952) Variations in the amounts of desoxyribose nucleic acid (DNA) in cells of the same tissue and its correlations with secretory function. Proc. Nat. Acad. Sci. (Washington), *38*, 95. — 10. Lupu, Gh. N. şi C. Velican: (1955) Pneumoconiozele neprofesionale. Ed. Academiei RPR, Bucureşti. — 11. Lupu, Gh. N. et C. Velican: (1957) La sclérose pulmonaire tabagique. Presse Méd., *94*, 2184. — 12. Lupu, Gh. N., C. Velican, M. Gociu, C. Racoveanu: (1958) Cercetări asupra formării procesului de scleroză pulmonară hista-

minică. Morfologia normală şi patologică (Bucureşti) *1*, 11. — 13. Lupu, Gh. N., C. Velican, D. Velican, V. Mihai : (1958) Acţiunea unor factori pneumoconiotici asupra conţinutului in mucopolisacharide acide ale macrofagelor alveolare. Probleme de terapeutică (Bucureşti), *12*, 4. — 14. Pearse, E. : (1954) Histochemistry. Churchill, London. — 15. Рыжих, Г. Н. : (1952) К вопросу о происхождении тучных клеток. Докл. Акад. Наук. *84*, 591. — 16. Успенски, В. И. : (1950) Динамика изменении гистамина и гистаминазы в легких и крови у крыс на ранних стадиях экспериментального силикоза. Архив. Патол. *12*, 26. — 17. Успенски, В. И. : (1952) Экспериментальной гистаминовый пневмосклероз. Архив Патол. *14*, 46. — 18. Velican, C. and D. Velican: (1959) Histochemical investigations on the presence of hyaluronic acid in mast cell. Acta Haematol. (Basel) *21*, 109. — 19. Velican, C. et D. Velican: (1958) Le mastocyte expérimental. Presse Méd., *75*, 1689. — 20. Velican, C., C. Iota, E., Sighetea, R. Olinescu : (1958) Creşterea unor substanţe de tip histaminic în plămân după excitaţia electrică a vagului cervical. Probleme de terapeutică (Bucureşti), *11*, 3.

ГЕНЕЗ ТКАНЕВЫХ ТУЧНЫХ КЛЕТОК

Ц. ВЕЛИКАН и Д. ВЕЛИКАН

Авторы исследовали преобразование клеток мезенхимы в тканевые тучные клетки и изучали вызванный гепарином или же гистамином и антракозом генез тучных клеток. Они установили, что те клетки, из которых можно отводить генез тучных клеток, возникают путем повышенного накопления полисахаридов на действие возбуждающих факторов из различных ретикулогистоцитов, особенно таких, из которых образуются макрофаги. Авторы предлагают называть обратимое состояние этой аккумуляции «состоянием полисахаридной насыщенности».

Ядра макрофагов принимают активное участие в аккумуляции и преобразовании метахроматических веществ, на основе различного метаболизма ядра и плазы. При обсуждении полученных результатов авторы не рассматривают появления тканевых тучных клеток, как автономное появление, а предполагают, что тучные клетки представляют из себя морфологическое выражение специальной активности, проявляющейся в углеводном обмене веществ различных клеток мезенхимы.

GENESE DER GEWEBSMASTZELLEN

C. VELICAN und D. VELICAN

Es wurde die Umwandlung der Mesenchymzellen zu Gewebsmastzellen, ferner die durch Heparin, bzw. durch Histamin und Anthrakose verursachte Genese der Mastzellen untersucht und festgestellt, dass die Zellen, denen die Mastzellen entstammen, im Wege einer Akkumulation von Polysacchariden auf Wirkung von Reizfaktoren aus verschiedenen Retikulo-Histocyten entstehen, besonders aus Zellen aus welchen die Makrophagen hervorgehen. Verfasser schlagen vor, dass der reversible Zustand dieser Akkumulation "Zustand der Polysaccharidensättigung" genannt werde.

Die Kerne der Makrophagen beteiligen sich aktiv an der Akkumulation und Transformation von intrazellulären metachromatischen Stoffen, und zwar auf Grund der metabolischen Verschiedenheit von Kern und Plasma. Das Erscheinen der Gewebsmastzellen wird nicht als ein autonomer Prozess aufgefasst. Es wird angenommen, dass die in dem Kohlenhydratstoffwechsel der verschiedenen mesenchymalen Zellen erscheinende spezielle Aktivität ihren morphologischen Ausdruck in den Mastzellen findet.

Dr. C. Velican
Dr. D. Velican } Bucureşti, 36 Str. Columb N° 4., Romînia.

Department of Physiology (Chief: L. HORVÁTH),
College for Special Pedagogy (Rector: G. BÁRCZI) Budapest

SOME DATA CONCERNING THE SUBMICROSCOPIC MORPHOLOGY OF MAST CELLS. I.

L. HORVÁTH

(Received September 12, 1958)

> Speculating thus, a hundred years after the birth of EHRLICH, we come back to his original view of the mast cell as a "well-fed cell" of the connective tissue. But the riddle is not yet solved . . . J. F. RILEY

The mast cell has been in the focus of scientific interest for the last 80 years. This is borne out by the fact that more than a hundred valuable contributions to the subject appear every year. And yet, wide as our present knowledge concerning mast cells is, neither their morphological nor their physiological aspects can be said to have been elucidated with finality.

An accurate knowledge of the mast cells' cytophysiology has become particularly important in view of the frequently occurring injuries in connection with nuclear tests.

In connection with studies concerning mast cells it has to be borne in mind that the chemical structure of their granules and their intergranular substance respond very readily to neurohormonal changes and that they vary from species to species.

Rats and mice have been used in most of the experiments, considering that these animals have the highest number of mast cells and the cells can be easily isolated without being seriously damaged (GLICK, BONTING, DEN BOER [13]; PADAWER, GORDON [29]).

As regards their origin, the opinions differ. MAXIMOW [24] derived them from histiocytes, DANTSCHAKOVA [6] thinks they are of lymphatic origin, while according to HOLMGREN [16] they are direct mesenchymal derivatives. LEHNER [22] suggests that mast cells are cells *sui generis* which divide by both mitosis and amitosis (homeoplasty), whereas MAXIMOW, as well as MICHELS and HERZOG [25] are of the opinion that adventitial cells, lymphoid cells and other polyblasts are capable of changing into mast cells (heteroplasty).

The mast cells of connective tissue have a variable size (8 to 20 μ) and are filled with basophilic granules averaging 1 μ in diameter. Mast cells show metachromasia upon staining with thiazine dyes, a phenomenon attributed by LISON [23] to the presence of polysulphuric acid esters. These latter have been identified with heparin by JORPES, HOLMGREN and WILANDER [16] and hence the name heparinocyte, a term sometimes given to mast cells.

The present author [17] had succeeded in demonstrating heparin in the granules by histochemical and histophysiological methods, while HIRT [15] proved the same by means of luminescent-microscopic analysis; ZOLLINGER [36], under the dark-field microscope; JULÉN, SNELLMAN, SYLVEN [19], under the electron microscope.

POLLAK [31], JOHNSON and MCMINN [18] regard mast cells as migrating cells stimulated chemotactically by plasmatic impregnation. According to this theory, it is the invasion of plasma into the vessel wall, induced by colloid disaggregation, that draws mast cells to areas where lipoproteins are deposited. The latter become disintegrated by the heparin contained in the mast cells, so that the cells under consideration are significant elements in the genesis of arteriosclerosis.

Mast cells seem to carry out a multitude of functions.

Apart from producing heparin — a function confirmed by LEHNER [22] and HILL [14] — mast cells are credited by ASBOE—HANSEN [1] with the production of the ground substance of connective tissue, while, according to CARTER, HIGGINBOTHAM and DOUGERTHY [5], they are involved also in antigen-antibody reactions. A degranulation of mast cells has been observed to follow the re-injection of antigens. As RILEY [32] and KELLER [21] were able to demonstrate the presence of histamine and 5-hydroxytryptamine (serotonin) in the mast cells of rats, these cells have probably the additional function of supplying histamine to the organism. It has been claimed by BENDITT [3] that they contain chymotrypsin as well. Mast cells play further a significant role in sulphur metabolism: parenterally introduced labeled sulphur (S^{35}) was shown by ASBOE—HANSEN et al. [2] to have mostly accumulated in the mast cells. Their granules contain sulphonated polysaccharide and it seems obvious that the sulphur deposited in the cells is required for the production of the sulphuric-acid radical of the polysaccharide. SYLVEN [35], by means of centrifugation, demonstrated the presence of lipoproteins in the cells: their exact position and role are still awaiting final elucidation.

As to the role played by mast cells in pathological processes, the following should be mentioned:

DERINGER and DUNN [7, 8], further MISKOLCZY—FODOR [27] observed great numbers of mast cells in chronic inflammatory and allergic processes; SABRACES and BERGONZONI [34], in cases of tuberculosis and lymphatic congestion; MICHELS and DOUNEY [26], in toxic and allergic skin diseases; TODORO [36], in gingivitis; DOUNEY [9], DERINGER et al. [7], around neoplastic growth. Since heparin was pointed out by FISCHER [12] as an antimitotic substance, mast cells surrounding tumorous tissues may be regarded as a barrier protecting the connective tissue from cancerous invasion, a defence mechanism termed "Abwehrreaktion" by the said author. In cases of chronic polyarthritis, considerable mast cell accumulations were found in

the articular capsules by BURKL and SONNENSCHEIN [4]. Urticaria pigmentosa seems to be a disease induced by the proliferation of mast cells (NÉKÁM, [28]). The precancerous increase in the number of mast cells in the connective tissue is regarded by DUNN and MONTGOMERY [10] as a diagnostic sign. Fatal mastocytosis, suggestive of leukaemia, has been reported by EFRATI [11]. X-ray irradiation was observed by KELÉNYI [20] to induce a clumping of the mast-cell granules and to retard the coagulation of blood : he attributed these phenomena to the action of heparin set free from mast cells and concluded that mast cells contain also alkaline phosphatase and peroxydase.

According to the above, mast cells contain the following substances

1. sulphonated polysaccharide (heparin) ;
2. acetylated polysaccharide (hyaluronic acid?) ;
3. histamine ;
4. 5-hydroxytryptamine (serotonin) ;
5. chymotrypsin ;
6. lipoprotein ;
7. alkaline phosphatase ;
8. peroxydase,

and carry out the following functions

1. inhibit blood-clotting ;
2. constitute an active factor of fibrinolysis ;
3. decompose lipoprotein structures ;
4. bind and release histamine and serotonin ;
5. exert a cytotoxic action ;
6. produce the ground substance of connective tissue ;
7. exert an antitrypsin effect ;
8. promote sulphur metabolism.

It is not superfluous to bear all this in mind because the analysis of mast cells reveals an intergranular protoplasmic area the structure of which is not quite clear. Our first problem was to make this area accessible to analysis ; the second, to ascertain how the manifold functions of the cell are related to this more or less unknown structure.

In order to be able to clear up the details of any given structure and to follow its fate, it is necessary to increase its microanisotropy (ROMHÁNYI [33]). Accordingly, we had to find those stains which show affinity to mast-cell granules and at the same time make the cell substance anisotropic.

Connective tissue of rats, and sections prepared from their paraffin-embedded mesentery were used in the present experiments. Using a dissecting needle, we so stretched the connective tissue on a slide : it was then fixed by heat, chloroform-methylalcohol mixture and basic lead acetate, and then

stained. Part of these preparations was not fixed but simply dried at room temperature and so stained. No difference in respect to anisotropy seemed to exist between mast cells observed in the fixed and the unfixed preparations, nor was there a difference between the cells in the connective tissue films and those in the mesenteric preparations.

Pyronine G, toluidine blue and neutral red (Grübler) produced pronounced anisotropy, provided the last-named two stains were dissolved in an acid medium (N/10 HCl) (Fig. 1). Anisotropy was further obtained by the

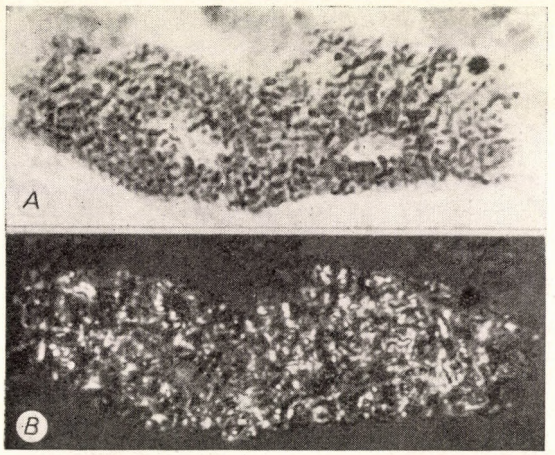


Fig. 1. Mast cell from connective tissue of rat. Unfixed. *A :* Stained with 0,1 per cent neutral red dissolved in N/10 HCl *B :* Same in polarized light ; × 1000

use of brilliant cresyl blue and thionine (likewise in acid medium). Pyronine G was the only stain to make the substance of mast cells anisotropic in a neutral medium.

At first sight it seemed as if the granules of the cells had become anisotropic ; however, a more thorough examination revealed the fact that not the granular but the intergranular substance had developed such a birefringence as could not be stopped by imbibition (Fig. 2). What this phenomenon means is that, in acid media, the intergranular substance arranges itself into paracrystals and the said semicolloidal dyes become so dissociated (change of molecular number in the semicolloid phase) as to increase the polarization effect (ROMHÁNYI [33]).

We thought that the substance, capable of adsorbing the dyes to its suitably structured surface in a way as to impart birefringence to the dye-substrate complex, might be ribonucleic acid, sulphonated polysaccharide in the stage of synthesis, or possibly a simple protein or lipid.

In order to gain insight into the structure of the intergranular area, two

methods were used. 1. Digestion (ribonuclease, elastase, hyaluronidase, trypsin, pepsin). 2. Extraction (KEILIG's method : hot chloroform—methylalcohol āā which dissolves fats of all kinds within 30 minutes (PEARS [30]).

Digestion by any of the said substances had no effect on the development of anisotropy. However, while neutral red dissolved in a neutral medium produced no anisotropy in the intergranular substance of unextracted mast cells, it gave rise to a clearly discernible birefringence in cells that had been

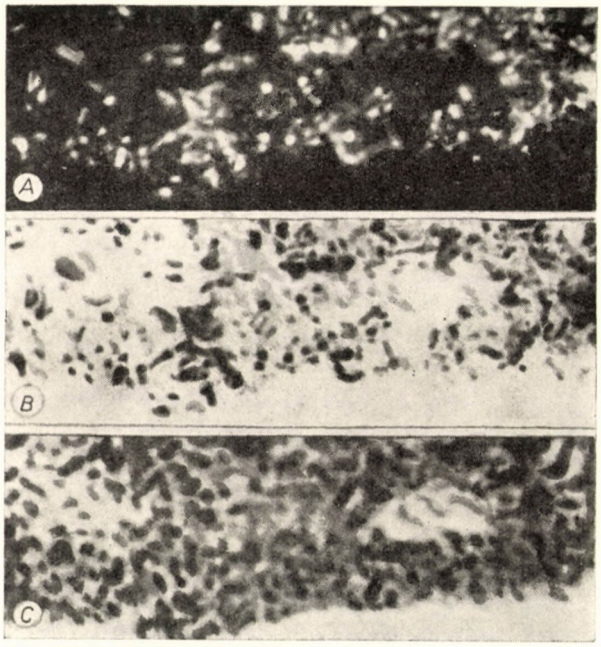


Fig. 2. Detail from cell in Fig. 1. *A :* In polarized light. *B :* Contact copy of the negative photograph of *A*. *C :* In normal light. It can be seen that *B* differs from *C*, *i.e.*, the anisotropic substance is not identical with the granules; × 3000

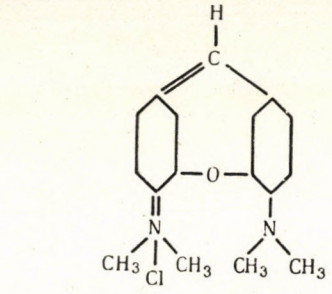
subjected to KEILIG's extraction. By adding N/10 HCl to the anisotropic intergranular substance we were able to induce its rearrangement with a consequent intensive birefringence.

This phenomenon might be explained by assuming that the intergranular substance is surrounded by a lipid layer which prevents the diffusion of enzymes. To settle this problem we subjected the connective tissue preparations to KEILIG's fat extraction, but it failed to produce any difference.

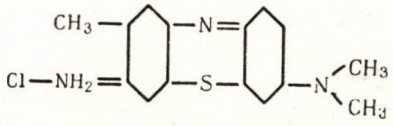
If mast cells are treated with saturated aqueous carbamide solution, or 1 per cent protamine sulphate, they will lose their faculty of binding any of the said dyes in such a manner as to produce birefringence in acid media.

The question arose whether the development of anisotropy may be associated with the semicolloidal properties of the dyes. With a view to solving this problem, we resorted to alcoholic dye solutions as stains and HCl-alcohol as acidifying agent (the said dyes give true solutions in alcohol). Anisotropy resulted.

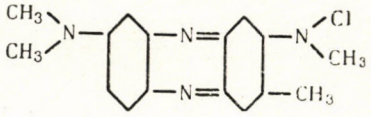
Considering that the dyes under consideration contain alkyl radicals, the idea arose that they might be adsorbed to structural lipids by the so-called van der Waals-forces (thermolabile homeopolar cohesive forces). We



Pyronin G



Toluidin-blue



Neutral red

Fig. 3. Pyronine G. Toluidine blue. Neutral red

stained and acidified the cells at a temperature of 80° C: anisotropy still resulted.

To be able to interpret the birefringence brought about in the above manner, it is indispensable to discuss the chemical structure of the dyes (Fig. 3).

Pyronine G (Grübler) is a phenylmetane derivative of the xanthone group with a molecular weight of 312.795. Mildly basic. It is divisible into 3 fractions by paper chromatography. The granules of the mast cell react with both the alcoholic (full) and the aqueous (semicolloidal) solution in neutral and acid medium alike (metachromasia). The residue after the evaporation of both the aqueous and the alcoholic solutions displays an identical birefringent crystalline structure. Crystals from the aqueous solution become

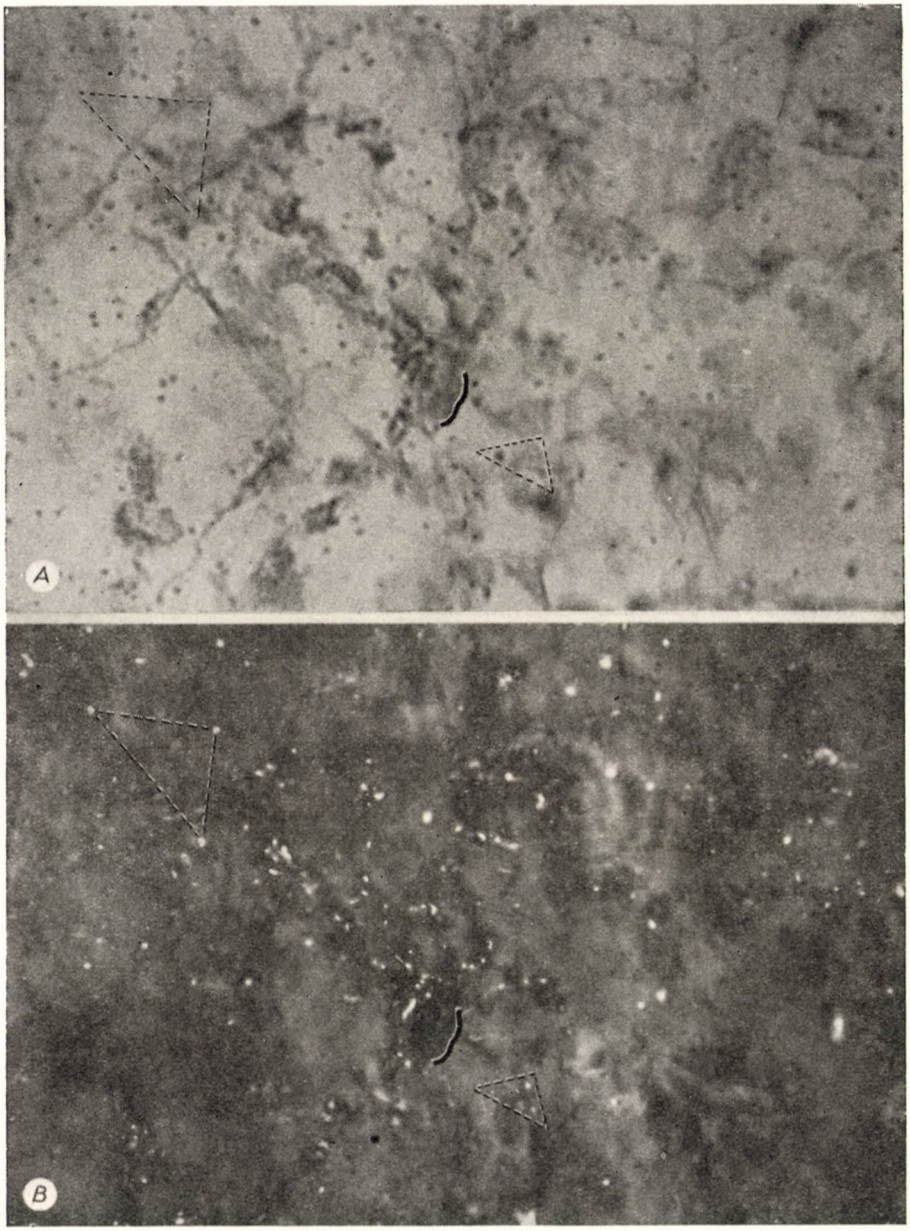


Fig. 4. Mast cell disintegrated by histamine. *A:* In normal light, *B:* The same area in polarized light. The granules at the points of the larger triangle are different from those in the smaller triangle. × 2500

isotropic when treated with heparin although no precipitation could be observed when the respective aqueous solution of the dye and heparin were brought together.

Toluidine blue (Grübler) is a basic chinone-imide dye of the thiazine group with a molecular weight of 203.819, and an absorption maximum at 620 to 622 mμ. It gives only one fraction at paper chromatography. The mast-cell granules take readily both the alcoholic and the aqueous solution in basic and acid medium alike (metachromasia). The residue after the evaporation of both the aqueous and alcoholic solutions displays an anisotropic crystalline structure which does not become isotropic on treatment with heparin. Heparin and toluidine blue give a precipitate insoluble in water.

Neutral red (Grübler) is a mildly basic chinone-imide dye of the azine group with a molecular weight of 288.775, and an absorption maximum between 540 and 542 mμ. It is divided into 2 fractions by paper chromatography. It is only in an acid medium that its alcoholic and aqueous solutions stain the mast-cell granules (orthochromasia). Crystals from both its alcoholic and aqueous solutions are anisotropic and remain so even if treated with heparin. Heparin and neutral red give a precipitate insoluble in water.

It is obvious from their structural formulas that all these dyes have two different poles (haptophore group). One pole is lipophile ($-CH_3$), the other salt-forming ($-N-Cl$). This leads to the conclusion that the intergranular substance of mast cells contains a complex lipoprotein which has partly acid and partly alkyl side chains and that both types of side chains are oriented. The salt-forming group plays the principal role in the development of anisotropy.

We followed the fate of the granules and the intergranular substance liberated from disintegrated mast cells. Disintegration was brought about by the subcutaneous administration of histamine (100 μg). The granules originating from disintegrated mast cells fall into two categories. Granules of the first category — consisting of pure intergranular substance — are doubly refractive in polarized but invisible in normal light, while those of the second category display anisotropy in polarized light but are well visible in normal light. The latter granules consist of polysaccharides to which anisotropic intergranular material is bound (Fig. 4.). Both types of granule seem to be dissolved by the ground substance of connective tissue.

Summary

After a brief survey of the chemistry and physiology of mast cells and their relations to pathologic processes, it has been demonstrated that on treatment with pyronine G, toluidine blue or neutral red, the intergranular substance of mast cells becomes anisotropic in acid media. The anisotropic substance consists of a lipoprotein which is dissolved by the ground substance of connective tissue when the cells disintegrate.

REFERENCES

1. Asboe-Hansen, G. : (1950) Survey of the normal and pathological occurrence of mucinous substance and mast cell in the dermal connective tissue. Acta Dermatoven. *4*, 338. — 2. Asboe-Hansen, G., Levi, H., Wegelius, O. : (1957) Mast cells and intracellular mucopolysaccharides in Rous Fowl sarcoma I. Cancer Res. *17*, 792. — 3. Benditt, E. P. : cit. Carter, P. B. — 4. Burkl, W. : (1952) Über Mastzellen und ihre Aufgaben Wien. klin. Wschr. *23*, 411. — 5. Carter, P. B., Higginbotham, R. D., Dougerthy, T. F. : (1957) The local response of tissue mast cells to antigen in sensitized mice. J. Immunol. *79*, 259. — 6. Dantschakowa, V. M. : cit. Maximov, A. A. — 7. Deringer, N., Dunn, D. : cit. Burkl, W. — 8. Deringer, N. : cit. Burkl, W. — 9. Douney, J. : cit. Burkl, W. — 10. Dunn, M. R., Montgomery, P. : (1957) A study of the relationship of mast cells to carcinoma in situ of the uterine cervix. Labor. Investig. *6*, 542. — 11. Efrati, P., Klaiman, A., Spitz, H. : (1957) Mast cell Leukaemia. Blood *12*, 869. — 12. Fischer, I. : (1942) Grundriss der Gewebezüchtung G. Fischer Jena. — 13. Glick, D., Bonting, S. L., Den Boer, D. : (1956) Isolation of mast cells. Proc. Soc. exp. Biol (N. Y.) *92*, 357. — 14. Hill, M. : (1957) Secretion of Heparin by Mast Cells. Nature *180*, 654. — 15. Hirt, A. : (1939) Luminiscens-mikroskopische Untersuchungen an den Mastzellen der lebenden Maus. Anat. Anz. *87*, 97. — 16. Holmgren, H. (1937) Beitrag zur Kenntnis der Chemie und Function der Ehrlich'schen Mastzellen. Z. f. mikr. anat. Forsch. *42*, 242. — 17. Horváth, L. : (1952) A l'histologie normale des mastocytes. Acta Morph. Hung. 2. 35. — 18. Johnson, F. R., McMinn, R. M. H. : (1957) Mast cells in the epithelium of the oesophagus. Nature *180*, 615. — 19. Julen, Ch., Snellman, O., Sylven, B. : (1950) Electronmicroscopy of the mast cells. Acta physiol. scand. *19*, 289. — 20. Kelényi, G. : (1953) Changes in the mast cells following X-ray irradiation. Acta Morph. Hung. *3*, 377. — 21. Keller, R. : (1957) Histamine und 5-hydroxytryptamin in den Gewebemastzellen der Albinoratte. Helv. physiol. Acta *15*, 371. — 22. Lehner, L. : cit. Burkl, W. — 23. Lison : (1938) Sur la détermination du pH intracellulaire par les colorants vitaux indicateurs. Protoplasma *24*. 453. — 24. Maximow, A. A.: (1906) Über die Zellformen des lockeren Biegdnewebes. Arch. mikr. Anat. *37*, 680. — 25. Maximow, A. A., Michels, Herzog : cit. Burkl, W. — 26. Michels, Douny : cit. Burkl, W. — 27. Miskolczy—Fodor, F. : cit. Kelényi, G. — 28. Antalóczy, Z., Nékám, L., Komáromy, J.: (1950) Heparinfelszabadulás és gátlás urticaria pigmentosában. Orvosi Hetilap *91*, 1134. — 29. Padawer, J., Gordon, A. S.: (1955) Effect of cholchicine on mast cells of the rat. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) *29*, 522. — 30. Pears, E. : (1954) Histochemistry Churchill, London. — 31. Pollak, O. J. : (1957) Mast cells in the circulatory system of man. Circulation *16*, 1084. — 32. Riley, J. F. : (1955) Pharmacology and function of the mast cells. Pharmacol. Rev. *7*, 267. — 33. Romhányi, Gy. : (1958) Personal communication. — 34. Sabrazes, J. : cit. Burkl, W. — 35. Sylvén, B. : (1951) Cytoplasmatical constituents of normal tissue mast cells. Exper. Cell. Res. *2*, 252. — 36. Todoro : cit. Burkl, W. — 37. Zollinger, H. U. : (1950) Gewebsmastzellen und Heparin Experientia *6*, 384.

ДАННЫЕ К СУБМИКРОСКОПИЧЕСКОЙ МОРФОЛОГИИ ТУЧНЫХ КЛЕТОК

Л. ХОРВАТ

После приведения самых существенных литературных данных, автор переходит к изложению поляризационно-микроскопического исследования субмикроскопической структуры тучных клеток.

Нейтральный красный, толуидиновая синька, пиронин Г делают в кислой среде тучные клетки анизотропными. Анизотропия относится не к зернистой, а к межзернистой субстанции. На основе экспериментов, проведенных различными пищеварительными и экстракционными методами, авторы предполагают, что внутриклеточное анизотропное вещество представляет из себя липопротеин, хорошо прослежимый при дезинтеграции клетки в основном субстрате клетчатки, в которой он растворяется.

BEITRÄGE ZUR SUBMIKROSKOPISCHEN MORPHOLOGIE DER MASTZELLEN

L. HORVÁTH

Nach einer Durchsicht der wesentlichsten literarischen Angaben wird über die Polarisationsuntersuchung der submikroskopischen Struktur von Mastzellen berichtet.

Neutralrot, Toluidinblau und Pyronin G bedingen im sauren Substrat eine Anisotropie der Mastzellen. Die Anisotropie bezieht sich nicht auf die körnige, sondern auf die Zwischenkornsubstanz. Auf Grund verschiedener mit Verdauungs- und Extraktionsmethoden durchgeführten Untersuchungen wird angenommen, daß die intrazelluläre anisotrope Substanz ein Lipoprotein sei, das bei der Desintegration der Zellen in der Grundsubstanz des Bindegewebes, in welcher es sich löst, deutlich verfolgt werden kann.

Dr. László HORVÁTH, Budapest, VII. Bethlen G. tér 2., Hungary.

Institut für Anatomie, Histologie und Embryologie der Medizinischen Universität in Debrecen
(Vorstand: St. Krompecher)

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE KNORPELBILDUNG III. HÄMOGLOBIN- UND MILCHSÄUREGEHALT DER REGENERIERENDEN GELENKFLÄCHE IN VERSCHIEDENEN REGENERATIONSSTADIEN

Éva Oláh, Cs. Hadházy und Katalin Kostenszky

(Eingegangen am 18. September 1958)

Einleitung

Bürger [9] bezeichnete eine Gewebsgruppe »*bradytrophe Gewebe*«. Nach seiner Definition rechnen zu dieser Gruppe alle Gewebsformen, die überhaupt keine oder nur sehr wenige Kapillaren enthalten (Knorpel, Augenlinse, Hornhaut, einzelne Wandschichten größerer Gefäße usw.). Bei diesen Geweben erfolge daher die Zufuhr der Nährstoffe und der Abtransport der Schlackenstoffe durch Diffusion. Infolgedessen sei der »Optimalzustand«, den die ausreichende Vaskularisation bzw. Blutversorgung darstellt, bei den bradytrophen Geweben nicht vorhanden. Die »zufriedenstellende Blutversorgung« gewährleistet bekanntlich mehrere augenfällige Gegebenheiten: die entsprechende Sauerstoff- und Nährstoffversorgung, die ungestörte Abfuhr der Schlackenstoffe, die Sicherung des konstanten inneren Milieus und den Transport einzelner Wirkstoffe (Went, [50]). Nach Bürger bedeutet demnach die Bradytrophie den Mangel all dieser Funktionen in mehr oder minder großem Ausmaß. Auf diese Weise wird die Tatsache verständlich und plausibel, daß die bradytrophen Gewebe im allgemeinen (Dickens und Weil—Malherbe [15]) — und so auch der Knorpel (Bywaters [12]; Dickens und Weil—Malherbe [14]; Hills [25]; Cartier [13] — über anaeroben glykolytischen Stoffwechsel verfügen. Bei anaerober Glykolyse besteht ganz allgemein Sauerstoffmangel, infolgedessen wird das aus der Glykogenspaltung entstehende Pyruvat nicht im Zitratkreis verarbeitet, sondern wandelt sich zu Milchsäure um. Sehr wahrscheinlich verfügen daher die die Gefäße entbehrenden bradytrophen Gewebe nicht über die für die biologischen Oxydationen erforderliche Sauerstoffmenge, während anderseits der Sauerstoffmangel in diesem Fall weder als eine pathologische noch als anomale Erscheinung betrachtet werden kann.

Strughold [45] hat im Zusammenhang mit den allgemeinen Fragen des Sauerstoffmangels festgestellt, daß im Mittelpunkt dieses Problems die intrazelluläre biologische Oxydation stehe; diese sei der gemeinsame Nenner, der jeden Sauerstoffmangel und seine Folgen erkläre. Becker [7] brachte

eine sehr gründliche und ausführliche Übersicht der durch biologische Oxydationen verursachten Schädigungsmöglichkeiten. Nach seiner Gruppierung kann eine Störung infolge Sauerstoffmangel, Nährstoffmangel und »Wirkstoffdefekten« entstehen. Eine Art des Zustandekommens des Sauerstoffmangels kann eine allgemeine oder lokale Kreislaufinsuffizienz sein, die sich neben lokalen Manifestationen in einer ischämischen Hypoxidose äußert. (Im Rahmen vorliegender Mitteilung kann es nicht unsere Aufgabe sein, das hauptsächlich von der BÜCHNERschen und REINschen Schule gelieferte umfangreiche Literaturmaterial über die Hypoxidose als ätiologischen Faktor aufzuarbeiten, sondern wir beschäftigen uns nur mit den uns unmittelbar interessierenden Fragen.)

Aus den Angaben von BÜCHNER [8], GROSSE—BROCKHOFF [22], HOLLE, BURKHARDT, ARNDT und BLÖDORN [27] sowie anderen wissen wir, daß die Hypoxie die einzelnen Gewebselemente um so mehr berührt, je stärker sie differenziert sind. Am empfindlichsten sind die Nervenzellen, Herzmuskel-, Leber- und Nierenzellen. HOLLE, BURKHARDT, ARNDT und BLÖDORN [27] legen in ihrer auch zahlreiche Literaturangaben über die ischämische Hypoxidose der Nierenepithelzellen enthaltenden Mitteilung dar, daß die Erscheinungen bei der ischämischen Veränderung mit der Behinderung sämtlicher Blutfunktionen zusammenhängen und man neben der Wirkung des Sauerstoffmangels auch mit der Ionenveränderung (Milieu), einer Schädigung der Durchspülungsfunktion, mit Nährstoffmangel und darüber hinaus noch mit dem Problem der anomalen Gefäßwandpermeabilität rechnen müsse. Sie betrachten als erste Manifestation der Kreislaufschädigung die Beeinflussung des Reaktionsmilieus, welche die Grundlage der späteren Autolyse legt. FRUNDER [20] bemerkt, ein Gewebsreiz könne Azidose herbeiführen, im geschädigten Gewebe komme es zu geschädigter Atmung, die anaerobe Glykolyse zustande bringt, die wiederum zunehmende Gewebssäuerung herbeiführt, welche die Aktivierung einzelner proteolytischer Fermente bewirken kann. Auf diese Weise schreitet der Prozeß bei hochdifferenzierten Geweben zur Nekrobiose bzw. Nekrose fort. Die Differenzierung der bindegewebigen Elemente ist bekanntermaßen geringer, und der vorgenannten Veränderung gegenüber führt der Sauerstoffmangel bei diesen — wie auch die infolge Stauung auftretende Induration zeigt — eher zur Fasernvermehrung. Von den Granulationsgewebszellen wissen wir, daß sie pluripotent, d. h. verhältnismäßig wenig differenziert sind. Es kann angenommen werden, daß eine Hypoxie, die an Epithelgeweben bereits irreversible Veränderungen zustande bringt, ihre Vitalität überhaupt nicht berührt, aber durch die auf biologische Oxydationen ausgeübte Wirkung deren Lebensweise modifiziert.

Um die Prozesse untersuchen zu können, welche der im erwachsenen Organismus vor sich gehenden Knorpelbildung vorangehen und sie begleiten, haben wir in früheren Untersuchungen ein »morphologisches und chemisches

Modell« gesucht und im »KROMPECHER—PUKYschen Halbgelenk« gefunden (KROMPECHER [30, 31]; HADHÁZY und OLÁH [23]). Dessen Wahl ergab sich schon deshalb von selbst, weil KROMPECHERS Hypothese über die regenerative Knorpelbildung anläßlich des Studiums dieses Modells entstanden war. Diese Hypothese (KROMPECHER [31, 32, 33]) schreibt der druckbedingten Verengerung bzw. Obliteration der Gefäße und der aus diesem Grunde eintretenden »Anoxie« und »Bradytrophie« bei der Knorpelbildung kausale Bedeutung zu. Bei der Untersuchung der Vaskularisationsverhältnisse unseres Modells mit verschiedenen Methoden vermochten wir (HADHÁZY, KOSTENSZKY und OLÁH [24]) gleichfalls einen Zusammenhang zwischen der Verringerung der Vaskularisation und der Knorpelbildung zu beobachten. Es lag daher auf der Hand, die Untersuchung der Folgen dieser Gefäßpauperisation in Angriff zu nehmen. Am auffallendsten unter diesem Folgen war die Beeinträchtigung der Hämoglobin- bzw. Sauerstoffversorgung, weshalb wir in erster Linie das Zustandekommen des eventuellen Sauerstoffmangels teils mit Hilfe der Hämoglobinbestimmung, teils durch Bestimmung der als indirekten Indikator des Sauerstoffmangels betrachteten Milchsäurewerte untersuchten.

Methoden

Für diese Untersuchungen wurden insgesamt 55 Hunde verwendet, bei denen wir, wie in einer früheren Mitteilung [23] ausführlich beschrieben, die Halbgelenkbildung nach dem Verfahren von KROMPECHER und PUKY vornahmen, die im wesentlichen darin besteht, daß die die distale Gelenkfläche des Femurs bedeckende und die unmittelbar darunter befindliche Spongiosa entfernt wird. Operation und Nachbehandlung erfolgten genau wie in der erwähnten Mitteilung beschrieben. Die Hunde wurden 7, 20, 26, 33 und 70 Tage nach der Operation getötet, das operierte Gelenk sofort herausgenommen und geöffnet. Wir isolierten das die regenerierende Gelenkfläche bildende Granulationsgewebe (III. Schicht), das also in der anläßlich der Gelenkbildung angelegten Knochenwunde anwesend war. Ebenso isolierten wir das an der Vorderwand der Gelenkkapsel — der neu entstandenen Gelenkfläche gegenüber — haftende Granulationsgewebe (I. Schicht). In diesen beiden Materialien führten wir Hämoglobin- und Milchsäurebestimmungen durch. Abb. 1 zeigt die topographische Anordnung der Untersuchungsstoffe in situ.

Für die *Hämoglobinbestimmungen* benutzten wir 15 Hunde, die wir in 5 Gruppen zu je 3 Hunden einteilten. Die Untersuchungen an den einzelnen Gruppen geschahen zu den bereits erwähnten postoperativen Zeitpunkten. Die I. und III. Schichten wurden abgelöst, gesondert auf der analytischen Waage gewogen, mit der Schere zerstückelt und 3 Tage lang mit der 5fachen Menge dest. Wasser extrahiert. Nach dem Zentrifugieren bestimmten wir das Hämoglobin im Supernatans nach der von BÁLINT [4] mitgeteilten WONGschen Methode. Wir trennten das Eisen vom Hämoglobinmolekül (durch Behandlung mit konz. Schwefelsäure und Kaliumpersulfat) und bestimmten die Ferri-Ionen in dem nach Eiweißfällung gewonnenen Filtrat. Die Ergebnisse teilen wir im Ferri-Ionenwert mit und bemerken, daß auch die Hämoglobinmenge in mg% errechnet werden kann, wenn man diese Werte mit 0,294 multipliziert.

Die *Milchsäurebestimmungen* wurden bei 40 Hunden vorgenommen, die wir in 5 Gruppen zu je 8 Hunden einteilten, welche zu den erwähnten Zeitpunkten getötet wurden. Nach möglichst schneller Isolierung wurde das Gewicht der III. und I. Schicht in vorher abgewogenen Gefäßen festgestellt. Wir zerstückelten die Stoffe mit der Schere und nahmen die Extraktion mit der 20fachen Menge 3%iger Trichloressigsäure während 48stündiger Aufbewahrung im Eisschrank und mehrmaligem Schütteln vor. Der Extrakt wurde filtriert und die im trichloressigsauren Medium bereits eiweißfreie Lösung nach VAN SLYKE [44] mit Kupfersulfatkalziumhydroxydlösung behandelt, um die störenden Kohlenhydrate zu entfernen. Nach dem Zentrifugieren bestimmten wir die Milchsäure in der gereinigten Lösung entweder nach der Methode von FRIEDEMANN—COTONIO—SCHAFFER [19] oder nach der von BARKER—SUMMERSON [5]. In einigen Fällen wurden die Bestimmungen nach beiden Methoden ausgeführt.

Das *Friedemann—Cotonio—Schaffer*sche Verfahren gelangte etwas modifiziert (TANKÓ, 49) zur Anwendung. Die Oxydation der Milchsäure zu Azetaldehyd erfolgte in schwach saurem Phosphorsäuremedium in Anwesenheit von Mangansulfat, wozu wir tropfenweise n/100 Kaliumpermanganat bis zur konstanten Rosafärbung gaben. Der Destillierkolben wurde mit einem Mikrobrenner erwärmt, aber vorher mit einem mit Tropfenfänger versehenen langen Kondensor verbunden, damit die Substanzen mit höherem Siedepunkt, die die Bestimmung eventuell stören, während der Destillation in den Kolben zurücktropfen. Das durchdestillierende Azetaldehyd fingen wir in 1,3%iger Kaliummetabisulfitlösung auf, banden das überschüssige Bisulfit erst mit n/5, dann mit n/200 Jodlösung, spalteten das Aldehydbisulfit mit Natriumhydrocarbonat und titrierten das nunmehr freiwerdende Bisulfit mit n/200 Jodlösung.

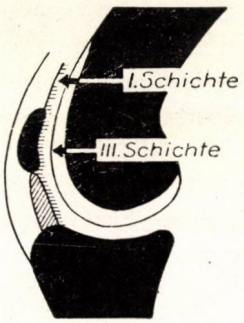


Abb. 1

Die BARKER—SUMMERSONsche Methode kam ohne Modifikation zur Anwendung; als Standard benutzten wir Lithiumlaktat (2 mg%ige Lösung).

Zur Ergänzung der Milchsäurebestimmungen nahmen wir auch Trockensubstanzbestimmungen vor und untersuchten den Milchsäuregehalt des Blutes und normalen Gelenkknorpels.

Ergebnisse

Der *Hämoglobinnachweis* erfolgte mit Hilfe von Eisenbestimmungen. Die Resultate sind in der Tabelle »*a*« und in den Diagrammen »*b*« und »*c*« der Abb. 2 angegeben. Die Tabelle zeigt in μg Ferriionen/g Granulationsgewebe die individuellen Ergebnisse und den Durchschnitt der I. und III. Schichten der 7, 20, 26, 33 und 70 Tage nach der Operation getöteten Tiere. Das Diagramm »*b*« gibt die zeitlichen Veränderungen dieser Durchschnittswerte, das Diagramm »*c*« die Differenz zwischen der I. und III. Schicht wieder. In diesem Fall haben wir die 7tägigen Werte sowohl bei der I. wie III. Schicht jeweils als 100% angenommen und die Werte der anderen Altersgruppen dazu ins Verhältnis gesetzt.

Wie aus obigen Angaben hervorgeht, zeigt die III. Schicht eine allmählich fortschreitende Ferriionen-, d. h. Hämoglobinverminderung, die von dem 7tägigen Wert von 40,7 μg zu dem 70tägigen Wert von 13,1 μg ununterbrochen weitergeht. Das an der Gelenkkapsel haftende Granulationsgewebe

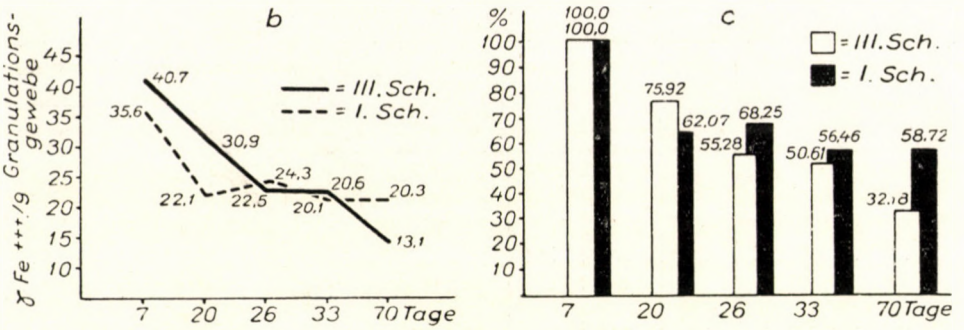


Abb. 2

Resultate der Hämoglobinbestimmungen (Erklärung im Text.)

	Hund I. Schichte				Hund III. Schichte			
	1	2	3	Durchschnitt	1	2	3	Durchschnitt
7 Tägig	37,0	23,8	46,0	35,6	36,6	36,8	48,8	47,0
20 „	17,3	25,0	24,0	22,1	38,0	23,8	31,0	30,9
26 „	16,6	32,0	23,9	24,3	19,2	25,8	24,1	22,5
33 „	14,9	25,0	20,3	20,1	23,6	21,0	17,2	20,6
70 „	27,0	15,6	19,0	20,3	13,9	14,6	10,7	13,1

(I. Schicht) weist demgegenüber zwei Unterschiede auf. Einer besteht darin, daß der Initialwert (35,6 μg) am 7. Tage von vornherein niedriger ist als der Wert von 40,7 μg der III. Schicht. Die Differenz zwischen den beiden ist zwar denkbar, kann aber wegen der individuellen Schwankungen dennoch nicht berücksichtigt werden. Als wesentlicher Unterschied ist aber zu betrachten, daß die 20, 26, 33 und 70 Tage alten Stoffe der I. Schicht nahezu die gleichen, aber keinesfalls weit voneinander entfernte Werte zeigen (22,1, 24,3, 20,1, 20,6 μg), im Gegensatz zu dem ständig sinkenden Eisen- bzw. Hämoglobingehalt der III. Schicht, was zu der Schlußfolgerung führen muß, daß das Ausmaß der Vaskularisation der Gelenkflächenschicht 70 Tage lang ständig abnimmt, während die Vaskularisation des an der Kapsel haftenden Granulationsgewebes etwa vom 20. Tage an praktisch unverändert bleibt.

Die Ergebnisse der *Milchsäurebestimmungen* sind in den Diagrammen »*a*« und »*b*« der Abb. 3 sowie in nachfolgenden Angaben dargestellt (die Zahlenangaben der Tabelle entsprechen dem Milchsäurewert in mg%):

I. Schicht

Zeitspanne zwischen Operation und Tötung	Hund Nr.								Durchschnitt	Durchschnittl. Abweichung
	1	2	3	4	5	6	7	8		
7 Tage	97	75	104	103	134	138	128	74	106	19
20 „	123	106	136	197	117	140	114	112	130	20
26 „	139	142	104	119	163	193	127	171	144	23
33 „	184	221	227	196	124	110	117	166	168	38
70 „	129	113	98	166	121	80	164	172	130	27

III. Schicht

Zeitspanne zwischen Operation und Tötung	Hund Nr.								Durchschnitt	Durchschnittl. Abweichung
	1	2	3	4	5	6	7	8		
7 Tage	125	142	111	87	146	150	115	92	121	19
20 „	164	263	151	228	128	128	140	121	165	27
26 „	162	185	160	208	195	235	296	256	212	37
33 „	188	176	274	187	140	148	109	202	178	34
70 „	111	87	85	112	120	110	148	130	112	14

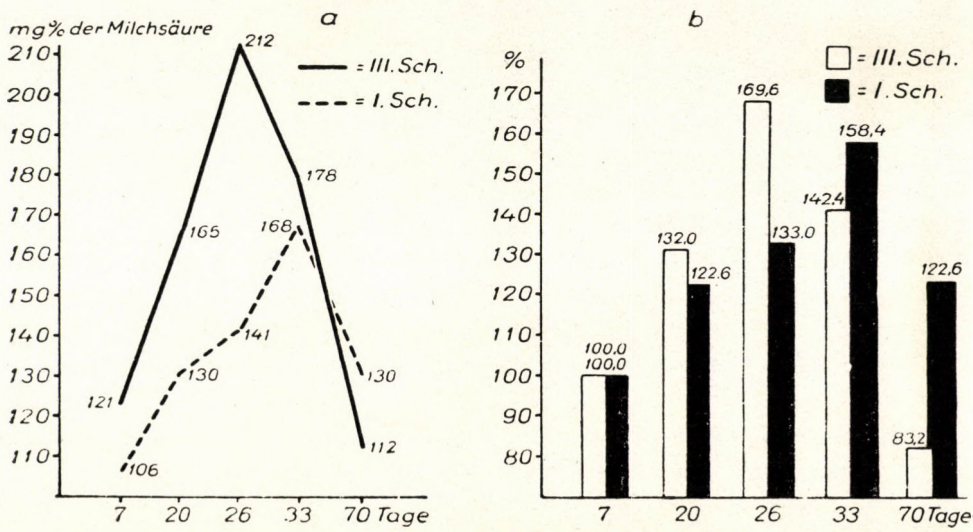


Abb. 3

Das Diagramm »*a*« der Abb. 3 zeigt die zeitliche Veränderung der festgestellten Durchschnittswerte, während in »*b*« die 7tägigen Werte sowohl der I. wie III. Schicht mit jeweils 100% angenommen und die Werte der anderen Stadien im prozentualen Verhältnis dazu angegeben sind.

Die Angaben des Gelenkflächengranulationsgewebes (III. Schicht) zeigen, daß nach 7 Tagen das reich vaskularisierte Granulationsgewebe — im Verhältnis zum Blut (32 mg%) — bereits einen hohen Wert aufweist. Von hier an ist bis zum 26. Tage eine sehr starke Erhöhung (bis zu 212 mg%) zu beobachten. Im Zusammenhang damit sei erwähnt, daß wir bei unseren früheren Untersuchungen in diesem Stadium die ersten morphologischen Anzeichen der Knorpelbildung in dieser Schicht wahrnehmen konnten. Hiernach fällt die Kurve steil ab, und der Milchsäurewert beträgt am 33. Tage (Erscheinen isolierter Knorpelinseln) 178 mg%, am 70. Tage (Entstehung konfluierender Knorpelinseln) 112 mg%. Wir dachten natürlich auch an die Möglichkeit, daß für diese Differenzen die Unterschiede im *Trockensubstanzgehalt* verantwortlich sind. Die vorgenommenen Untersuchungen ergaben folgendes: Der prozentuale Durchschnitt der Trockensubstanz war bei dem 7tägigen Material 19,8, bei dem 20tägigen 18,0, bei dem 26tägigen 21,0, dem 33tägigen 19,6 und dem 70 Tage alten 24,2%. Die Trockensubstanzbestimmungen bestätigen demnach unsere obigen Angaben. Die verhältnismäßig niedrigen Milchsäurewerte der 7tägigen Stoffe steigen im 20, 26 und 33 Tage alten Granulationsgewebe nahezu auf das Doppelte bei etwa gleichem Trockensubstanzgehalt, während wir im 70tägigen Stadium trotz des höheren Trockensubstanzgehaltes eine geringere Milchsäuremenge als am 7. Tage gewinnen.

Das an der Kapsel haftende Granulationsgewebe (I. Schicht) zeigt eine in der Intensität zwar herabgesetzte, aber ebenfalls stärker steigende Tendenz als das 20-, 26-, ja auch als das 33tägige Material (130, 141, 168 mg%). Von da an sehen wir eine geringe Senkung (auf 130 mg%) bis zum 70. Tage.

Die Unterschiede im Verhalten der beiden Schichten können wir folgendermaßen zusammenfassen: Die III. Schicht enthält bereits am 7. Tage mehr Milchsäure und zeigt eine größere Erhöhung als die I. Schicht. Ihren Höhepunkt erreicht die Steigerung bei der III. Schicht am 26., bei der I. Schicht am 33. Tage; die Senkung der Milchsäurewerte ist am 70. Tage bei der III. wesentlich größer als bei der I. Schicht.

Die Milchsäurebestimmungen im Blut und normalen Gelenkknorpel gaben folgende Werte (in mg%):

	Individuelle Ergebnisse								Durchschnitt mg%	Durchschn. Abweichung
	1	2	3	4	5	6	7	8		
Blut	31	21	40	38	35	20	20	38	32	6
Gelenkknorpel	100	225	71	201	135	90	73	123	129	47

Sämtliche Untersuchungsergebnisse (Milchsäure, Hämoglobin, frühere planimetrische Untersuchungen der III. Schicht, 24) sind in den Diagrammen »*a*« und »*b*« der Abb. 4 zusammengefaßt. Im Diagramm »*a*« sind die Milchsäurewerte der III. Schicht in mg%, die Ferriionen in μg, die Gefäßgebiete im Prozentsatz der Gesamtgranulationsgewebsfläche in nicht zueinander ins Verhältnis gesetzten Werten angegeben. Dieselben Werte der I. Schicht — mit Ausnahme der planimetrischen Angaben des Gefäßgebietes — finden sich im Diagramm »*b*«. Diesen ist folgendes zu entnehmen:

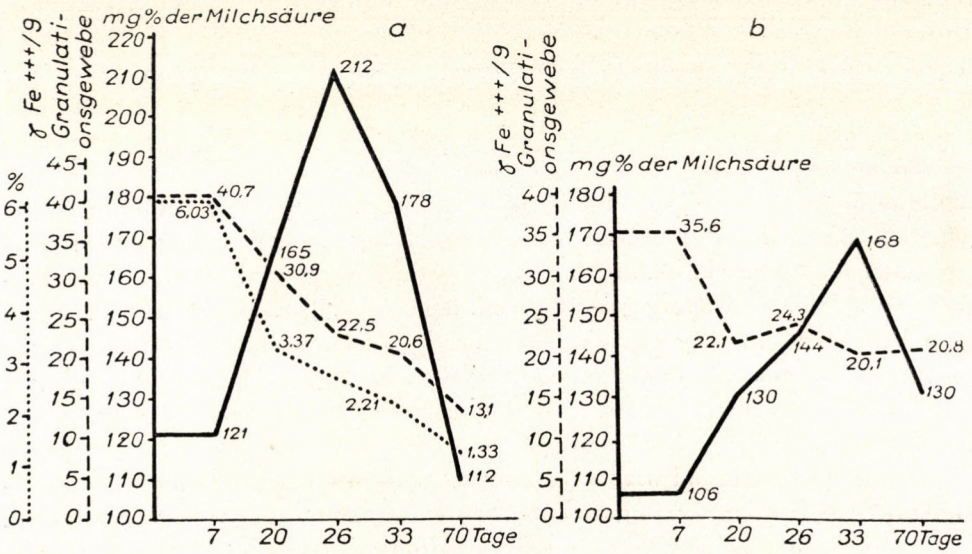


Abb. 4

In bezug auf das Granulationsgewebe der Gelenkfläche ergaben der durch die Hämoglobinbestimmung und die planimetrische Messung charakterisierte Vaskularisationszustand und die Milchsäurewerte bis zum 26. Tage das erwartete Bild. In dem Maße, wie die Vaskularisierung abnimmt, steigt der Milchsäuregehalt. Dem 7tägigen verhältnismäßig hohen Fe+++-Gehalt (40,7 μg) entspricht ein relativ niedriger Milchsäuregehalt (121 mg%). Im wesentlichen dasselbe finden wir am 20. (30,9 μg/165 mg%) bzw. 26. Tage (22,5 μg/212 mg%). Bisher führte also der ständig zunehmende Sauerstoffmangel zu dauernd vermehrter Milchsäureanhäufung. Vom 26. Tage sehen wir eine qualitative Änderung, da die Vaskularisation weiter abnimmt, aber auch die Milchsäurewerte sinken, die am 33. Tage nur noch 178, am 70. Tage 104 mg% ausmachen. Bei weiterhin zunehmendem Sauerstoffmangel sehen wir demnach sich verringernde Milchsäuremengen.

Das spiegelbildartige Verhalten der Eisen-Milchsäurewerte tritt bei der an der Kapsel haftenden (I.) Granulationsgewebsschicht bis zum 20. Tage

besonders schön in Erscheinung. Die Ferriionen vermindern sich von 35,6 auf 22,1 μg, während die Milchsäure zugleich von 106 auf 130 mg% steigt. Von da an erhöhen sich am 26. und 33. Tage bei ziemlich stagnierendem Vaskularisationszustand die Milchsäurewerte (141 und 168 mg%), doch ist diese Erhöhung von geringerem Ausmaß als bei der III. Schicht. Bei im großen ganzen gleichfalls unverändertem Vaskularisationszustand erfolgt auch die Senkung der Milchsäurewerte (auf 130 mg%), und zwar in geringerem Maße als bei der III. Schicht.

Nachfolgende Zahlenangaben zeigen die Werte der Milchsäurebestimmungen nach FRIEDEMANN—COTONIO—SCHAFFER und BARKER—SUMMERSON aus denselben Materialien:

Nach FRIEDEMANN—COTONIO—SCHAFFER: 16,6 μg, 9,8 μg, 7,0 μg, 8,2 μg, 19,8 μg.

Nach BARKER—SUMMERSON: 18,0 μg, 10,0 μg, 5,9 μg, 8,3 μg, 20,0 μg.

Wie ersichtlich, stimmen die gewonnenen Werte gut überein.

In einigen Fällen (hauptsächlich in jüngeren Stadien) untersuchten wir, ob nicht anläßlich der Befreiung von Kohlenhydraten Milchsäure aus Triphosphat entsteht (TANKÓ [48]). Mit der Methode von MEYERHOF und LOHMANN [37] ließ sich das in den untersuchten Fällen nicht nachweisen.

Besprechung

Anläßlich der Operationen kamen es zu Blutungen teils aus der geöffneten Gelenkkapsel, teils aus der erschlossenen Spongiosa. Das daraus entstandene Hämatom bzw. Granulationsgewebe füllte das Gebiet zwischen Kapsel und Gelenkfläche aus und haftete an beiden. Wenn wir vom 5. Tage an die Gelenke bewegten, so teilte sich das Granulationsgewebe in den meisten Fällen in zwei Abschnitte, der eine behielt die Verbindung zur Kapsel (I. Schicht), der andere zur Spongiosa (III. Schicht). In manchen Fällen geschah die Trennung nicht in gerader Linie, es isolierte sich eine in der Mitte gelegene Schicht, die im weiteren entweder zu der einen oder zur anderen rechnete. Diese wäre die II. Schicht, an der wir teils wegen ihres unsicheren Vorkommens, teils wegen ihres nicht charakteristischen Verhaltens keine Bestimmungen vorgenommen haben. Da wir diese Aufteilung jedoch auch in unseren früheren Mitteilungen benutzten, wollen wir weiterhin dabei bleiben. Das Schicksal der beiden Schichten gestaltet sich späterhin unterschiedlich. Die I. gesellt sich zum Kapselgewebe, die III., d. h. die an der Knochenoberfläche befindliche, differenziert sich in Richtung zum Knorpel. In der anfänglichen Vaskularisierung bestehen keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden Schichten, doch ist wesentlich, daß das Granulationsgewebe der Gelenkfläche den eventuellen Einwirkungen der Umgebungsfaktoren (Druckwirkung der kontralateralen Gelenkfläche, unmittelbare knöcherne Umgebung) in auffallender

Weise ausgesetzt ist. Die Gestaltung dieser beiden Schichten in verschiedener Richtung gibt uns die Möglichkeit, innerhalb desselben Gelenks Vergleiche anzustellen und die Prozesse, welche die Knorpelbildung begleiten, zu berücksichtigen.

Im Rahmen unserer vorangegangenen Untersuchungen (HADHÁZY, KOSTENSZKY, OLÁH [24]) trachteten wir das Verhalten der Vaskularisation mit morphologischen Methoden (Injektion, planimetrische Berechnung des Gefäßgebietes) festzustellen. Diese Resultate mußten durch eine den funktionellen Zustand besser widerspiegelnde Methode ergänzt werden. Die Hämoglobinbestimmungen haben wir zum Teil aus diesem Grunde durchgeführt. Die beiden Bestimmungsverfahren ergaben parallele Ergebnisse, und da sie dieselbe Frage von zwei verschiedenen Seiten prüfen, können sie auch als wechselseitige Kontrolle gelten, denn die Zuverlässigkeit der Resultate wird durch das ähnliche Verhalten der Werte sicherlich erhöht.

Aus den Untersuchungen geht hervor, daß nach und nach, parallel zur Dauer der nach der Operation verstrichenen Zeit, die Verkleinerung des Gefäßquerschnitts und deshalb Hämoglobinsenkung eintritt. Neben der ständigen Verminderung des Hämoglobins als Sauerstoff transportierender Substanz kann der Gewebsstoffwechsel als ziemlich empfindlicher Indikator der Sauerstoffversorgung dienen. Beobachten wir demnach parallel zur Hämoglobinsenkung eine wesentliche Vermehrung der in der anaeroben Phase der Glykolyse entstehenden Milchsäure, so spricht das dafür, daß anaerobe Glykolyse stattfindet, was Mangel an dem für die Stoffwechselprozesse erforderlichen Sauerstoff anzeigt. Aus ähnlichen Erwägungen wird der Milchsäurenachweis auch von LONG [36], CARTIER [13], LIPSCHITZ und BUEDING [35] sowie GROSSE—BROCKHOFF [22] angewandt. Wir gewannen auch mit zwei als zuverlässig anerkannten Methoden enorm hohe Milchsäurewerte und halten es daher für sehr wahrscheinlich, daß sich eine relative ischämische Hypoxidose entwickelt hat, deren Folge anaerobe Glykolyse war. In seinen in letzter Zeit erschienenen Mitteilungen ist KROMPECHER [32, 33] auf Grund theoretischer Überlegungen zu der Schlußfolgerung gelangt, daß die der Neodifferenzierungsknorpelbildung vorangehende Verminderung der Vaskularisation zum Übergang auf den Stoffwechsel durch anaerobe Glykolyse führt, und nach dem Studium seiner anfänglichen Hypothese sind auch wir — unabhängig von ihm — zu diesem Schluß gekommen.

Die infolge der Hypoxidose entstehenden Stoffwechselprodukte bringen aller Wahrscheinlichkeit nach Reaktionsprozesse in Gang. Nach Literaturangaben wirken nämlich die hier in Frage kommenden Produkte gegen Gefäßverengerung bzw. Gefäßobliteration. So übt z. B. laut SCHRÖDER, SCHOOP und STEIN [42] der Sauerstoffmangel selbst lokal erweiternde Wirkung auf die Kapillaren aus. Den vasodilatatorischen Effekt der Kohlensäure erkannte u. a. schon BAYLISS [6] und unter gewissen Bedingungen wurde dasselbe auch von

FLEISCH [17] beobachtet. Die Erhöhung der Wasserstoffionenkonzentration wirkt gleichfalls erweiternd auf die Kapillaren (MEVES [38]; FLEISCH [17]; ATZLER und LEHMANN [3]). Den vasodilatatorischen Effekt der in der anaeroben Phase entstehenden Milchsäure hat GASKELL [21] bereits 1880 beschrieben, und seither wurde er von mehreren bestätigt (KELLER, LOESER und REIN [29], u. a.). Eine den obigen ähnliche Wirkung üben die phophorylierten Stoffwechselprodukte (FLEISCH und WEGER [18]), wie auch Adenosintriphosphat (RIEGLER, [41]) aus. Ebenso ist die arteriolenerweiternde Wirkung des hier gegebenenfalls vorkommenden Histamins bekannt (SCHRÖDER—SCHOOP und STEIN [42]). Diese Faktoren scheinen sämtlich am Prozess teilzunehmen, und ihr Effekt wirkt nach obigen Angaben gegen die Verminderung der Vaskularisation. So ergibt sich von neuem die Frage, welches der wichtige Faktor sei, der trotz der eben erwähnten Kompensationsbestrebungen die ständig fortschreitende Einengung der Vaskularisation herbeiführt. In unseren früheren Mitteilungen haben wir uns mit dieser Frage bereits beschäftigt [23, 24], und neben der Aufrechterhaltung jener Ausführungen (mechanischer Faktor, Verknöcherung an der Grenze von Knochen- und Granulationsgewebe, eventuelle chemische Substanz) wollen wir noch eine Möglichkeit erwähnen. Wir halten es für denkbar, daß die dünnwandigen Gefäße durch die Zell-, hauptsächlich aber durch die Fasernvermehrung immer mehr in den Hintergrund gedrängt bzw. komprimiert werden.

Jedenfalls schreitet der Prozeß weiter fort, verläuft aber doch nicht auf die beim Epithelgewebe übliche Weise, d. h. die die Autolyse hervorrufenden proteolytischen Fermente werden nicht aktiviert. Die Abweichung von der erwarteten Richtung ist auch durch die Senkung der Milchsäurewerte gekennzeichnet, die bei der III. Schicht größer ist und rascher eintritt als bei der I. Bei der III. Schicht, d. h. dem Granulationsgewebe der Gelenkfläche, kommt es zur Knorpelbildung. Auf diese Weise ergibt sich die Möglichkeit, eine Beziehung zwischen der Knorpelbildung bzw. der Hypoxie, der anaeroben Glykolyse bzw. der Milchsäureproduktion zu suchen. Auf diese Beziehung weist auch schon der Umstand hin, daß die Milchsäurewerte dann am höchsten sind, wenn die ersten morphologischen Anzeichen der Knorpelbildung beobachtet werden können. Zugleich muß berücksichtigt werden, daß bei der I. Schicht gleichfalls Milchsäurevermehrung vorkommt, obwohl hier Knorpelbildung nicht wahrzunehmen ist. Aus den Angaben von KRONTOWSKI und MAGATH [34], NEUHAUS [39], OKUNEFF [40], BÜCHNER [8] und anderen wissen wir, daß die milchsäureproduzierenden anaeroben Prozesse in wachsenden und sich differenzierenden Geweben im allgemeinen gesteigert sind. So müssen wir unabhängig von der Knorpelbildung mit der Anwesenheit einer gewissen Milchsäuremenge an der regenerierenden Gelenkfläche rechnen. Die beiden wachsenden und sich entwickelnden Granulationgewebsschichten enthalten aber Milchsäure in verschiedener Menge, die sich in Knorpelrichtung differenzierende

wesentlich mehr als die andere. Die quantitative Differenz und zeitliche Verschiebung der Milchsäurekurve der III. Schicht dürften daher mit der Knorpelbildung zusammenhängen, um so mehr, als die hohen Werte von ungefähr 200 mg% mit fortschreitender Knorpelbildung den für den Knorpel bezeichnenden Milchsäuremengen (etwa 130 mg%) immer näher kommen.

Anläßlich unserer morphologischen Beobachtungen [23] sahen wir, daß bereits am 7. Tage eine sich auf die Spongiosa-Granulationsgewebsgrenze lokalisierende bindegewebsartige Verknöcherung in Gang kommt, die in allen unserseits beobachteten Stadien anwesend war und die das Knochenmark begrenzende Platte produziert. Darüber hinaus sind Umbauerscheinungen an den dem Granulationsgewebe naheliegenden Spongiosaabschnitten wahrnehmbar, d. h. man muß in beiden Fällen mit Osteoblastentätigkeit rechnen. CARTIER [13] fand bei der Untersuchung des Verknöcherungsprozesses, daß die Milchsäurewerte in der Initialphase steigen, später sinken, und daß die Milchsäureproduktion von der Aktivität der Osteoblasten abhängt. Er machte diese Beobachtungen bei chondraler Verknöcherung, bei welcher der Knorpel von vornherein eine größere Milchsäuremenge enthält. In unserem Fall war das präformative Gewebe nicht Knorpel, aber da in der Umgebung dennoch auch Osteoblastentätigkeit stattfindet, erkennen wir das Vorhandensein der Möglichkeit an, halten sie aber in unserem Fall nicht für primär.

Worauf also läßt sich die nach dem 26. Tage beobachtete Senkung der Milchsäurewerte zurückführen? Theoretisch wäre eine Normalisierung der Sauerstoffversorgung und im Zusammenhang damit die Aufhebung der anaeroben Richtung möglich. Dies glauben wir auf Grund sowohl des morphologischen Bildes als auch der Hämoglobinwerte ausschließen zu können. Man könnte sich ferner vorstellen, daß entweder wegen Nährstoffmangel oder Schädigung des Fermentsystems (bei einer oder mehreren Stufen) Produktionsausfall vorliegt.

Gleichzeitig könnte man aber auch annehmen, daß zwar Milchsäure entsteht (die Substanz ist also vorhanden, und die Fermentsysteme funktionieren gut), aber zur Bildung einer anderen Substanz verbraucht wird. Unsere bisherigen Ergebnisse geben keine Antwort auf diese Frage, die wir bei den weiteren Untersuchungen beachten werden.

BÜRGER und SCHLOMKA [10] nahmen im Laufe ihrer Forschungsarbeiten über das Altern Untersuchungen an bradytrophen Geweben vor, die infolge ihres herabgesetzten Kreislaufs für diesen Zweck besonders geeignet sind. Im Laufe der Untersuchungen stellten sie fest [11], daß diese Gewebe eine metachromatische Substanz in verhältnismäßig großer Menge enthielten. Auf diese Beziehung zwischen bradytrophem Gewebszustand und metachromatischer Substanz wurde auch in anderen Mitteilungen hingewiesen (ALTSHULER und ANGEVINE [2]; FAVILLI [16] ; u. a.). Bereits in der Einleitung erwähnten wir, daß für den Stoffwechsel der bradytrophen Gewebe nach einigen Angaben die anaerobe Glykolyse charakteristisch sei. Aus den Untersuchungen von KAUNITZ

und SELZER [28] sowie SCHÜRMANN und MACMAHON [43] u. a. wissen wir, daß unter den Stoffwechselveränderungen der serösen Entzündung die Anwesenheit der milchsäureproduzierenden anaeroben Glykolyse am kennzeichnendsten sei. Nach den Angaben von ALTSHULER und ANGEVINE [2] kommt es jedoch bei den subakuten und chronischen Formen der serösen Entzündung sehr oft zur Vermehrung der sauren Mukopolysaccharide. Dies wäre bereits eine zweite Beziehung — neben der obigen — zwischen der Bildung der Mukopolysaccharide und der anaeroben Glykolyse. Dieselben Autoren verweisen in ihrer zusammenfassenden Mitteilung auf die Rolle der Mukopolysaccharide in degenerativen Prozessen [1, 2] und bemerken, daß bei der Pathogenese der Sklerose, des Amyloids, Hyalins und Fibrinoids eine Ähnlichkeit in der Teilnahme der Grundsubstanz an ihrer Entstehung beobachtet werden kann. Sie erwähnen, daß auch physikalische Agenzien, wie Trauma und Hypoxie, zur Vermehrung der Mukopolysaccharide führen. Ähnlich verhält es sich auch bei verschiedenen bakteriellen Infektionen und geschwulstigen Veränderungen; ferner muß auch mit hormonalen Faktoren gerechnet werden. So stellte z. B. SZIRMAY [46, 47] bei seinen Untersuchungen über die bindegewebige Grundsubstanz des Hahnen- bzw. Kapaunenkammes fest, daß sich die Mukopolysaccharide auf Wirkung von Testosteron vermehren. FAVILLI [16] hebt diese Rolle der Schilddrüsen- und Sexualhormone gleichfalls hervor.

So scheint in manchen Fällen eine Beziehung zwischen der anaeroben Glykolyse und der Bildung der sauren Mukopolysaccharide zu bestehen, die in anderen Fällen nicht auffällt. Dennoch halten es KROMPECHER und wir (auch auf Grund der gegenwärtig an Haut verschiedenen Alters und an der Nabelschnur durchgeführten Untersuchungen) nicht für ausgeschlossen, daß zwischen der Bildung der sauren Mukopolysaccharide und der anaeroben Glykolyse eine allgemeinere Beziehung vorliegt.

In Kenntnis der vorstehend angeführten Tatsachen ergibt sich letzten Endes die Frage, inwieweit der Prozeß der Hypoxie bzw. anaeroben Glykolyse bei der Knorpelbildung eine kausale Rolle spielen bzw. als Begleiterscheinung betrachtet werden kann. Laut unserer gegenwärtigen Hypothese kann die oben besprochene »relative Hypoxie« an und für sich einen prädisponierenden Zustand, aber keinen bestimmenden Faktor der Knorpelbildung bedeuten. Dies erscheint sogleich als natürlich, wenn wir berücksichtigen, daß an den verschiedensten Stellen des Organismus — auch bei Anwesenheit pluripotenter Zellen — Hypoxie ohne Knorpelbildung zustande kommen kann. Dieser prädisponierende Faktor entwickelt sich im Laufe des sich realisierenden Knorpelbildungsprozesses zu einer Begleiterscheinung. Gleichzeitig kann die anaerobe Glykolyse des hypoxidotischen Zustandes (zusammen mit der Beschränkung anderer Kreislauffunktionen) bei der Entstehung der Mukopolysaccharide im allgemeinen, also auch der für den Knorpel bezeichnenden Mukopolysaccharide, von determinierender, kausaler Bedeutung sein.

Zusammenfassung

Anläßlich früherer Untersuchungen beobachteten die Verfasser, daß das Knorpelgewebe unter Neodifferenzierungsverhältnissen herabgesetzte Vaskularisation aufweist bzw. sich in avaskulärer Umgebung entwickelt. Von den Folgen der verminderten Vaskularisation bzw. ihres partiellen Aufhörens behandelt vorliegende Mitteilung das Problem des Sauerstoffmangels.

An 55 Hunden wurde die Halbgelenkbildungsoperation nach KROMPECHER und PUKY vorgenommen und die Untersuchung der Tiere 7, 20, 26, 33 und 70 Tage nach der Operation durchgeführt. Vom operierten Gelenk wurde das an der regenerierenden Gelenkfläche angetroffene Granulationsgewebe sowie der an der Gelenkkapsel haftende Teil des Granulationsgewebes isoliert. Die beiden Granulationsgewebsschichten zeigten einen wesentlichen Unterschied, indem sich in der ersteren Knorpel entwickelt hatte, in der letzteren dagegen nicht. An 15 Hunden wurden Hämoglobinbestimmungen nach WONG, an 40 Hunden Milchsäurebestimmungen nach FRIEDEMANN—COTONIO—SCHAFFER sowie nach BARKER und SUMMERSON vorgenommen, mit denen der etwaige Sauerstoffmangel nachgewiesen werden sollte. In Anlehnung an Literaturangaben wurden die Milchsäurebestimmungen auf Grund der Überlegung durchgeführt, daß in Ermangelung des für die Stoffwechselprozesse erforderlichen Sauerstoffs anaerobe Glykolyse vor sich geht, die zur Miclhsäurevermehrung führt.

Nach den Untersuchungsergebnissen nimmt der Hämoglobingehalt des Granulationsgewebes der Gelenkfläche in den untersuchten Stadien dauernd ab. Demgegenüber ergab das an der Gelenkkapsel haftende Granulationsgewebe — in dem also Knorpel nicht entsteht — am 20., 26., 33. und 70. Tage nahestehende Werte. Auch die Resultate der Milchsäurebestimmungen in den beiden Granulationsgewebsschichten fielen unterschiedlich aus. Die Gelenkflächenschicht enthält bereits am 7. Tage mehr Milchsäure, der Höhepunkt der aus den Ergebnissen zusammengestellten Kurve ist am 26. Tage zu beobachten und liegt höher als bei der anderen Schicht. Das an der Gelenkkapsel haftende Granulationsgewebe enthält die meiste Milchsäure am 33. Tage und zeigt bis zum 70. Tage eine geringere Senkung als die andere Schicht.

Im Besitze dieser Resultate wird es als sehr wahrscheinlich erachtet, daß sich unter den Untersuchungsbedingungen ein hypoxidotischer Zustand entwickelt hat, dem bei der Neodifferenzierungsknorpelbildung prädisponierende Bedeutung zugeschrieben wird. In der Mitteilung werden das in späteren Stadien wahrnehmbare gegensätzliche Verhalten der Hämoglobin- und Milchsäurewerte, der vorausgesetzte Mechanismus und die wahrscheinlich die Milchsäurewerte verändernden Prozesse erörtert. Unter diesen Prozessen erwähnen Verfasser die Bildung der Mukopolysaccharide und ihre Hypothese, daß die anaerobe Glykolyse des hypoxidotischen Zustandes (parallel mit der Beschränkung anderer Kreislauffunktionen) bei der Bildung der Mukopolysaccharide im allgemeinen und daher auch der für den Knorpel bezeichnenden Mukopolysaccharide von determinierender Bedeutung sein kann.

LITERATUR

1. ALTSHULER, C. H., ANGEVINE, D. M.: (1949) Histochemical Studies on the Pathogenesis of Fibrinoid. Amer. J. Path. *25*, 1061. — 2. ALTSHULER, C. H., ANGEVINE, D. M.: (1951) Acid Mucopolysaccharide in Degenerative Disease of Connective Tissue, with Special Reference to Serous Inflammation. Amer. J. Path. *27*, 141. — 3. ATZLER, E., LEHMANN, G.: (1922) Untersuchungen über den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Blutgefäße von Säugetieren. Pflügers Arch. ges. Physiol. *197*, 221. — 4. BÁLINT, P.: (1952) Klinikai laboratóriumi diagnosztika. Egészségügyi Kiadó, Budapest, 176. — 5. BARKER, S. B., SUMMERSON, W. H.: (1941) The Colorimetric Determination of Lactic Acid in Biological Material. J. Biol. Chem. *38*, 535. — 6. BAYLISS, W. M.: (1901) The Action of Carbondioxide on Blood Vessels. J. Physiol. *26*, 32. zit. S. M. HILTON (26). — 7. BECKER, V.: (1954) Gewebelich gebundener Sauerstoffmangel. (Histotoxisch bedingte Hypoxidosis.) Klin. Wschr. *32*, 577. — 8. BÜCHNER, F.: (1956) Allgemeine Pathologie. Urban u. Schwarzenberg, München—Berlin. II. Aufl. — 9. BÜRGER, M.: (1949) Einführung in die pathologische Physiologie. Georg Thieme, Leipzig, III. Aufl. 476. — 10. BÜRGER, M., SCHLOMKA, G.: (1928) Ergebnisse und Bedeutung chemischer Gewebsuntersuchungen für die Altersforschung. Klin. Wschr. *7*, 1944. — 11. BÜRGER, M.: (1939) Die chemischen Altersveränderungen an Gefäßen. Z. ges. Neurol. Psychiat. *167*, 273. — 12. BYWATERS, E. G. L.: (1937) The Metabolism of Joint Tissues. J. Path. Bact. *44*, 247. — 13. CARTIER, P.: (1951) Les constituants mineraux des tissues calcifiés. V. Les anions organiques de l'os. Bull. Soc. Chim. biol. *33*, 161. — 14. DICKENS,

F., WEIL-MALHERBE, H. : (1936) Metabolism of Cartilage. Nature. *139*, 125. — 15. DICKENS, F., WEIL-MALHERBE, H. : (1936) Metabolism of Normal and Tumour Tissue. XIV. A Note on the Metabolism of Medulla of Kidney. Biochem. J. *30*, 659. — 16. FAVILLI, F. : (1952) Probleme der Mucopolysaccharide des Bindegewebes der Schleimsubstanzen und ihre spezifischen Enzyme. Wien. Klin. Wschr. *64*, 405. — 17. FLEISCH, A. : (1918) Experimentelle Untersuchungen über die Kohlensäurewirkung auf die Blutgefäße. Pflügers Arch. ges. Physiol., *171*, 86. — 18. FLEISCH, A., WEGER, P. : (1937) Die gefäßweiternde Wirkung der phosphorylierten Stoffwechselprodukte. Pflügers Arch. Ges. Physiol. *239*, 362. — 19. FRIEDEMANN, T. E., COTONIO, M., SCHAFFER, PH. A. : (1927) The Determination of Lactic Acid. J. Biol. Chem., *73*, 335. — 20. FRUNDER, H. : (1951) Wasserstoffionenkonzentration im Gewebe lebender Tiere. G. Fischer, Jena, zit. HOLLE, G., BURKHARDT, R., ARNDT, S., BLÖDORN, M. (27). — 21. GASKELL, W. H. : (1880) On the Tonicity of the Heart and Blood Vessels. J. Physiol. *3*, 48, zit. Hilton, S. M. (26). — 22. GROSSE-BROCKHOFF, F. : (1944) Sauerstoffmangel als klinisches Problem. Klin. Wschr. *23*, 145. — 23. HADHÁZY, Cs., OLÁH, É. : (1958) Untersuchungen über die Knorpelbildung I. Problemstellung und allgemeine histologische Untersuchungen unter Neodifferenzierungsverhältnissen. Acta Biol. Hung. *9*, 139. — 24. HADHÁZY, Cs., KOSTENSZKY, K., OLÁH, É. : (1959) Untersuchungen über die Knorpelbildung II. Die Vaskularisationsverhältnisse bei der Gelenkbildung. Acta Biol. Hung. *9*. 271. — 25. HILLS, G. M. : (1940) The Metabolism of Articular Cartilage. Biochem. J. *34*, 1070. — 26. HILTON, S. M. : (1953) Experiments on the Postcontraction Hyperaemia of Skeletal Muscle. J. Physiol. *120*, 230. — 27. HOLLE, G., BURKHARDT, R., ARNDT, S., BLÖDORN, M. : (1955) Über manometrische, histochemische, histologische und phasenoptische Befunde bei ischämischer Hypoxydose. Virchows Arch. path. Anat. *327*, 150. — 28. KAUNITZ, H., SELZER, L. : (1938) Respirationsversuche über den Sauerstoffbedarf bei verschiedenen mit seröser Entzündung einhergehenden Gewebsschädigungen. Z. ges. exp. Med., *103*, 643. — 29. KELLER, C. J., LOESER, A., REIN, H. : (1930) Die Physiologie der Skelettmuskeldurchblutung. Z. Biol. *90*, 260. — 30. KROMPECHER, ST. : (1955) La régénération et néoformation experimentale des articulations. VI. Congrés Fédératif International d'Anatomie (Paris, 25—30 Iuillet 1955). C. R. de l'Ass. des Anat. *91*, 813. — 31. KROMPECHER, ST. (1956) Die Beeinflußbarkeit der Gewebsdifferenzierung der granulierenden Knochenoberflächen, insbesondere die der Callusbildung. Langenbeck's Arch. u. Dtsch. Z. Chir., *281*, 474. — 32. KROMPECHER, ST. : (1958) Die qualitative Adaptation der Gewebe. Z. mikr. anat. Forsch., *65*, 59. — 33. KROMPECHER, ST. : (1958) A szövetdifferenciálódás kísérleti befolyásolása, különös tekintettel az izületképzésre. M. T. A. Biol. Oszt. Közl. I., 81. — 34. KRONTOWSKI, A. A., MAGATH, M. A. : (1930) Glykolyse und Aciditätszunahme in den Gewebskulturen und analoge Erscheinungen im Organismus. Klin. Wschr., *9*, 2165. — 35. LIPSCHITZ, W. L., BUEDING, E. : (1939) J. Biol. Chem. 129, 333, zit. ARTZ, N. E., OSMAN, E. M. : Biochemistry of Glucuronic Acid. 1950. Academic Press. Inc., New York. — 36. LONG, C. : (1946) The Stabilisation and Estimation of Lactic Acid in Blood Samples. Biochem. J. *40*, 27. — 37. MEYERHOF, O., LOHMANN, K. : (1934) Über die enzymatische Gleichgewichtsreaktion zwischen Hexosediphosphorsäure und Dioxyacetonphosphorsäure. Biochem. Z., *271*, 89. — 38. MEVES, H. : (1953) Die Wirkung der Wasserstoffionen und der Kohlensäuren auf Gefäße und Muskulatur der Froschlunge. Pflügers Arch. ges. Physiol. *257*, 259. — 39. NEUHAUS, C. : (1930) Über den Stoffwechsel des Granulationsgewebes (Atmung und Glykolyse). Beitr. path. Anat., *83*, 383. — 40. OKUNEFF, N. : (1933) Über einige physico-chemische Erscheinungen während der Regeneration. V. Über den Milchsäuregehalt regenerierender Axolotlextremitäten. Biochem. Z., *257*, 242. — 41. RIEGLER, R. : (1932) Über die Ursache der vermehrten Durchblutung des Muskels während der Arbeit. Verh. d. Dtsch. Pharmakol. Gesellschaft, 11. Tagung, 8—11. IV. 1932, Wiesbaden. Arch. exp. Path. Pharm., *167*, 54. — 42. SCHRÖDER, W., SCHOOP, W., STEIN, E. : (1944) Die Durchblutung der Extremität im akuten Sauerstoffmangel unter besonderer Berücksichtigung der Funktion der arterio-venösen Anastomosen. Pflügers Arch. ges. Physiol., *259*, 124. — 43. SCHÜRMANN, P., MACMAHON, H. E. : (1933) Die maligne Nephrosklerose zugleich ein Beitrag zur Frage der Bedeutung der Blutgewebsschranke. Virchows Arch. path. Anat., *291*, 47. — 44. VAN SLYKE, D. D. : (1917) J. Biol. Chem., 32. 455, zit. FRIEDEMANN, T. E., COTONIO, M., SCHAFFER, PH. A. (19). — 45. STRUGHOLD, H. : (1944) Hypoxidose .Klin. Wschr., *23*, 221. — 46. SZIRMAI, J. A. : (1956) Studies on the Connective Tissue of the Cock Comb I. Histochemical Observations on the Ground Substance. J. Histochem. Cytochem., *4*, 96. — 47. SZIRMAI, J. A. : (1956) Studies on Connective Tissue of the Cock Comb. II. Effect of Androgens. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. *93*, 92. — 48. TANKÓ, B. : (1942) Vergleichende Glykolyse- und Atmungsversuche mit Glykogen und Fructosediphosphat im Muskel. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. *276*, 1. — 49. TANKÓ, B. : Persönliche Mitteilung. — 50. WENT, I. : (1958) Élettan, Medicina Kiadó, Budapest.

ИССЛЕДОВАНИЯ ОБРАЗОВАНИЯ ХРЯЩЕЙ III. СОДЕРЖАНИЕ ГЕМОГЛОБИНА И МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ В ВОССТАНАВЛИВАЮЩЕЙСЯ ПОВЕРХНОСТИ СУСТАВА В РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЯХ РЕГЕНЕРАЦИИ

Е. ОЛАХ, Ч. ХАДХАЗИ и К. КОШТЕНСКИ

В ходе предшествующих исследований авторы наблюдали, что в условиях неодифференциации хрящевая ткань выявляет сниженную васкуляризацию или же она развивается в бессосудистой среде. Среди последствий уменьшенной васкуляризации или же частичного прекращения прорастания сосудов, авторы в настоящем сообщении занимаются проблемой кислородного голодания.

На 55 собаках проводились операции по Кромпехеру и Пуки для образования полусуставов, а затем по истечении 7, 20, 26 и 33, далее 70 дней после вмешательства животных подвергали исследованию. На оперированных животных авторы изолировали грануляционную ткань на восстанавливающейся поверхности сустава, как и ту часть грануляционной ткани, которая прилипла к капсуле сустава. Между двумя слоями грануляционной ткани они наблюдали значительную разницу, поскольку в первом слое образовался хрящ, а во втором последний отсутствовал. 15 собак использовались для выявления гемоглобина по Вонгу, а на 40 собаках проводилось определение молочной кислоты по методу Фридеманн—Котонио—Шаффера, как и Баркер—Саммерсона. Целью определений было выявление возможного кислородного голодания. Выявление молочной кислоты — опираясь на литературные данные — проводилось на основе того размышления, что вследствие отсутствия кислорода, необходимого для процессов обмена веществ, происходит анаэробный гликолиз, что обусловливает аккумуляцию молочной кислоты.

Результаты авторов доказали, что содержание гемоглобина в грануляционной ткани поверхности сустава в исследованных стадиях постоянно уменьшается. В противоположность этому прилипающая к сумке сустава грануляционная ткань, — значит в которой не образуется хряща — в 20, 26, 33 и 70 дневных стадиях дает близкие друг к другу величины. Результаты определений молочной кислоты также различны в двух слоях грануляционной ткани. Грануляционная ткань на поверхности сустава уже на 7 день содержит больше молочной кислоты, а максимум кривой, составленной из полученных результатов, проявляется на 26. день, и показывает большую величину, чем предыдущий слой. Прилипающая к сумке сустава грануляционная ткань содержит больше всего молочной кислоты на 33. день, а к 70. дню это содержание уменьшается в меньшей мере, чем в случае другого слоя.

На основе своих результатов авторы считают весьма вероятным, что при данных экспериментальных условиях развивалось состояние кислородного голодания, которому они приписывают предрасполагающее значение в неодифференциационном образовании хрящей. Авторы обсуждают в настоящей статье противоположное поведение величин гемоглобина и молочной кислоты, наблюдаемое в более поздних стадиях, далее предположенный ими механизм, как и процессы, предположительно альтерирующие величины молочной кислоты. Среди этих процессов следует отметить образование мукополисахаридов, как и то предположение авторов, что анаэробный гликолиз при состоянии кислородного голодания (вместе с ограничением других функций кровообращения) может иметь решающее значение в образовании мукополисахаридов вообще, следовательно и в образовании таких соединений, характерных для хрящей.

INVESTIGATIONS OF CHONDROGENESIS

III. Haemoglobine and lactic acid content of the regenerating joint surfaces in different steps of the regeneration

É. OLÁH, CS. HADHÁZY and K. KOSTENSZKY

In previous investigations it has been found that under the conditions of neodifferentiation, cartilage was growing in an environment poorly vascularized or wholly avascular. The present study deals with oxygen deficiency, as one of the results of the poor, or the partially absent, vascularization.

The semi-arthroplastic operation of Krompecher and Puky was performed on 55 dogs which were then studied 7, 20, 26, 33 and 70 days after surgery, respectively. The granulation

tissue on the regenerating articular surface and that adhering to the articular capsule were removed from the operated joints. The two strata of granulation tissue considerably differed from each other, insofar as one contained cartilage, whereas the other did not. Haemoglobin was determined according to Wong in 15 dogs, and in 40 dogs lactic acid determinations were carried out, by Friedemann—Cotonio and Schaffer's as well as Barker and Summerson's methods, in order to demonstrate the presence of oxygen deficiency. The lactic acid content was studied on the basis of the previous consideration that a lack of oxygen caused anaerobic glycolysis and this would lead to an accumulation of lactic acid.

The results indicated that the haemoglobin content of the granulation tissue on the joint surface was constantly decreasing during the stages tested. In contrast with this, the granulation tissue attached to the articular capsule (in which no cartilage had formed) yielded closely similar values after 20, 26, 33 and 70 days. The two kinds of granulation tissue contained different amounts of lactic acid. The granulation tissue on the articular surface contained more lactic acid from the 7th day on ; the curve for its lactic acid content reached a peak after 26 days, and ran above that for the other kind of granulation tissue, which showed the maximum of lactic acid to be present on the 33rd day. The subsequent decrease of the lactic acid content was slower in the latter kind of granulation tissue, as judged from the 70 day values.

Our results tend to indicate that under the given conditions a hypoxic state develops and this seems to play the role of a predisposing factor in neodifferentiative cartilage growth. The divergence between the haemoglobin and lactic acid values during the later stages, the probable mechanism of the process, as well as the factors possibly affecting the lactic acid content, have been discussed, especially the formation of mucopolysaccharides. In our opinion, together with restrictions in other circulatory functions, the anaerobic glycolyses resulting from the oxygen deficiency may be of decisive importance in the formation or mucopolysachcharides in general, and of similar compounds peculiar to cartilage in particular.

Éva Oláh
Dr. Csaba Hadházy
Dr. Katalin Kostenszky

Debrecen, 12. Anatomia, Ungarn

Department of Stomatology, Medical University, Debrecen (Director: P. ADLER)

NORMAL VARIABILITY OF THE CHANGING DENTITION

P. ADLER and C. ADLER-HRADECKY

(Received September 29, 1958)

The interest of modern orthodontics is not any more centered exclusively upon the treatment of malocclusion, but rather on controlling and directing the development of the masticatory organ. The goal is to attain the genetically possible optimum cosmetically as well as functionally in each individual child. In order to meet the requirements of the enhanced scope of this special branch of dentistry,* orthodontists and paedodontists must be familiar with every phase in the normal development of the dentition, especially with eruption and arrangement of the permanent teeth into functional occlusion. Adding well-established data to our present knowledge upon this subject is in our opinion of some value in paedodontics. The most interesting feature and the greatest difficulty in the study of the changing dentition is the extreme variability encountered in clinical as well as in population studies. It may be questioned whether or not, from the multiplicity of phaenotypes it is possible to draw any conclusion of general validity ; and if such conclusions are nevertheless drawn, how far they are valid not as regards any population group but rather for the single individuals whom the group is composed of. While *e. g.* anthropology and epidemiology are interested mainly in the behaviour of populations, the objectives of clinical medicine — and thus of paedodontics and orthodontics — concern single individuals.

The course of the changing dentition was studied by us in a selected Hungarian provincial population group, consisting of approximately 13 000 children of both sexes, between the 6th and 14th birthdays. The basis of selection was a partial (but nevertheless marked) resistance to caries in the deciduous dentition in children prior to their 9th birthday. The selection was performed, however, not on an individual, but on a community basis. Children of the total age range, born and continuously resident in communities where the prevalence of dental caries was low in the deciduous molars in examinees of 6 to 9 years, were taken into account as a whole group, without regard to caries prevalence in the individual child.

* Orthodontics is the oldest recognized speciality within the realm of dentistry.

First the mean ages were determined at shedding of the individual pairs of deciduous, and eruption of the individual pairs of permanent teeth. The normal (Gaussian) probability curve was used to show graphically the temporal course of these events. By plotting percentage values of tooth presence with advancing age in the same sex on probability paper, and similarly by plotting the probits of the tooth presence percentages, taking into account the double standard error of the tooth presence percentage values, straight lines were obtained. — Mean ages and standard deviations were read from these graphs. — Similar data were available in abundance in dental literature as regards populations other than Hungarian but none concerning the inhabitants of Hungary. Our group offers, however, some advantage in comparison to other White groups studied hitherto : with regard to the low prevalence of dental caries in the deciduous dentition, the influence of "early" extraction of deciduous teeth was minimalized upon shedding as well as eruption ages.

In agreement with data in the literature, we found considerable temporal variations within the limits of (assumed) normalcy as regards the loss of the deciduous, and the eruption of the permanent, teeth in the population. The range of temporal variability is somewhat narrower in the first phase of the changing dentition (eruption of M_1, I_1, and I_2, and shedding of the deciduous incisors), broader in the second phase (eruption of C, P_1, P_2, and M_2, and shedding of the deciduous cuspids and molars). This difference is partly due to the higher prevalence and severity of caries in the posterior deciduous teeth (molars), and to their consecutive "early" extractions, since hereby eruption is influenced not only of the successional teeth but also of some accessional ones (as *e. g.* lower M_2).

By our findings the data in the literature have been fully confirmed in that the temporal course of the changing dentition is highly variable. In this connection, some importance is to be attributed to stating whether or not the dental development of an individual child agrees with his chronological age. For the study of this problem, relying upon a suggestion of B. SIMON, tables have been constructed of the typical tooth formulae of "early" and "late" eruptors at each ½ year of age, within the ranges of assumed normalcy.

With the use of *Table I*, it is easy to state whether or not an individual child diplays some significant divergence, as regards dental development, from children of equal chronological age, used as extreme normal variants. As to the practical use of *Table I*, the following items should be taken into consideration.

(i) *Retarded teething* is diagnosed if the examine has not all permanent teeth that are shown by the typical tooth formula for a "late" eruptor of the same sex and chronological age.

(ii) *Advanced teething* is diagnosed if the examinee has more permanent teeth than are displayed by the tooth formula for the "early" eruptor of equal

Table I

Typical tooth formulae of "early" and "late" eruptor boys and girls in school age, within ranges of normalcy

Age		BOYS		GIRLS	
		"early"	"late"	"early"	"late"
years	months	eruptors		eruptors	
6	6	6edcb1 / 6edc-1	abcde / abcde	6edcb1 / 6edc21	abcde / abcde6
7	—	6edc-1 / 6edc21	abcde / abcde	6edc21 / 6edc21	abcde / abcde6
7	6	6edc21 / 6edc21	abcde6 / abcde6	6edc21 / 6edc21	abcde6 / 1bcde6
8	—	6e-c21 / 6edc21	abcde6 / 1bcde6	6edc21 / 6edc21	abcde6 / 1bcde6
8	6	6e4c21 / 6e-c21	—bcde6 / 1bcde6	6e4c21 / 6e--21	1bcde6 / 1bcde6
9	—	6e4c21 / 6--c21	1bcde6 / 1bcde6	6e4c21 / 6-4321	1bcde6 / 12cde6
9	6	6-4c21 / 6-4321	1-cde6 / 12cde6	654-21 / 6-4321	12cde6 / 12cde6
10	—	654-21 / 654321	12cde6 / 12cde6	654321 / 7654321	12cde6 / 12cde6
10	6	654321 / 7654321	12cde6 / 12cde6	654321 / 7654321	12cde6 / 12cde6
11	—	7654321 / 7654321	12cde6 / 12cde6	7654321 / 7654321	12cde6 / 12cde6
11	6	7654321 / 7654321	12cde6 / 12cde6	7654321 / 7654321	12cde6 / 12cde6
12	—	7654321 / 7654321	12cde6 / 12cde6	7654321 / 7654321	12cde6 / 123de6
12	6	7654321 / 7654321	12cde6 / 12cde6	7654321 / 7654321	12c4e6 / 1234e6
13	—	7654321 / 7654321	12c4e6 / 123-e6	7654321 / 7654321	12c4e6 / 1234e6
13	6	7654321 / 7654321	12c4e6 / 1234e6	7654321 / 7654321	123456 / 1234-67

Permanent teeth are symbolized by arabic numerals 1 to 7 (from central incisor to second molar), deciduous teeth by small letters a to e (from central incisor to second dec. molar).

age and sex. Acceleration is assumed furthermore if the examinee has a permanent tooth not present in the tooth formula for the corresponding "early" eruptor, but at the same time not all those teeth had erupted in the examinee which are displayed in the "early" eruptor's formula.

(iii) In *Table I*, deciduous teeth are also shown in the typical tooth formulae. Of practical importance are only the teeth absent from the formula of the "late" eruptors. If a tooth absent in the "late" eruptor formula is seen in the examinee's mouth, its persistence (retention) is to diagnosed. The underlying cause is then to be clarified by X-rays.

The dental age of an individual child — be it determined relying upon the typical tooth formulae, or even in a simpler way upon the number of the erupted permanent teeth — is not stated as a simple figure like chronological age, but has to be characterized by the possible maximal and minimal limits. Instead of a definite number of years and months, *a certain range of dental age* is stated. In this way due consideration can be paid to temporal variations of shedding and eruption.

It is remarkable that while temporal variability has been duly considered in the literature as regards tooth loss and eruption during the changing dentition, since beside mean ages standard deviations have often been computed, hardly any attention has been paid to variations in the sequence of eruption. Generally, sequence of eruption was confined to taking into consideration the mean eruption ages only ; sometimes a short remark is added that deviations from this sequence may occur. HELLMAN, however, apparently considered divergences in the sequence of eruption — established relying upon the mean eruption ages of the individual teeth — to be characteristic of certain orthodontic anomalies.

In our opinion, the sequence of eruption cannot sufficiently be characterized by confining ourselves to the mean eruption ages. In our material we found differences in the sequence of eruption, relying upon percentage values of tooth presence, *e. g.* between the sequences of the 10th, 50th, and 90th percentiles *(Fig. 1)*. Differences of similar type are obvious as regards the shedding sequence of deciduous teeth *(Fig. 2)*.

Even more marked are, however, the differences if the sequence of eruption is studied not in the population (as shown in *Figs. 1* and *2*), but in individual children. Studies of this kind were carried out by ADLER and GÖDÉNY, CLEMENTS et al., LO and MOYERS, more recently by GARN et al., and by ADLER.

Our studies in Hungary have shown that in most cases a certain interval occurs between the eruption of the last tooth in the first, and the first one in the second, phase of permanent tooth eruption. In the upper jaw, comparing the sequence of eruption of the lateral incisor (I_2) and the first premolar (P_1), the exceptions amount to approximately 2,5 to 3 per cent, whereas comparing I_2 with C in the lower jaw, a reversed sequence of eruption is encountered in only 1 per cent *(Fig. 3)*. In explaining the difference in the frequency of the eruption sequence's reversal, the fact is to be taken into account that aplasia of the upper I_2 is not uncommon in White populations. In the grammar-

school children of Debrecen, I. NAGY found this anomaly in approximately 1,7 per cent; this is in excellent agreement with our present findings as regards the difference of reverted eruption sequence.

In the first phase of the changing dentition, we found that from the homologous incisors the lowers erupt markedly earlier than the uppers. Earlier

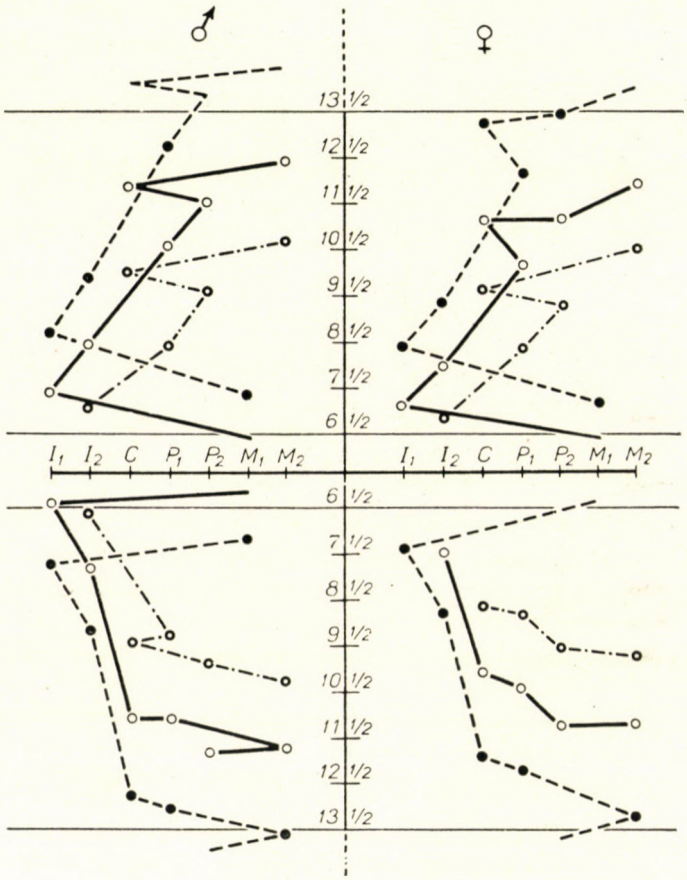


Fig. 1. Sequence of permanent tooth eruption in boys and in girls, in the upper and in the lower jaw, in reliance upon the 10th, 50th, and 90th percentiles of tooth presence.

10th percentiles: black dots connected by —·—·—·
50th percentiles: white dots connected by ————
90th percentiles: black dots connected by — — — —

eruption of an upper incisor — as compared with its lower mate — was exceptional. As regards the first molars, the lower ones erupted earlier in the majority of the subjects, but in approximately 25 per cent of our material the upper first molars were in advance of the lowers. — In the upper jaw, the usual sequence of eruption was M_1—I_1 — I_2 (encountered in approximately 98 per cent of the population). In the mandible, however, exemptions were found in

the sequence of eruption of M_1 and I_1. Mostly, M_1 erupted earlier, but a reversion of the eruption sequence was found in approximately 14 per cent of the examinees. I_2 erupted practically in no instance earlier than I_1. Thus, if in a child the lower I_2 is seen to erupt before I_1, the rather infrequent but nevertheless typical aplasia of the central incisor is to be taken into account.

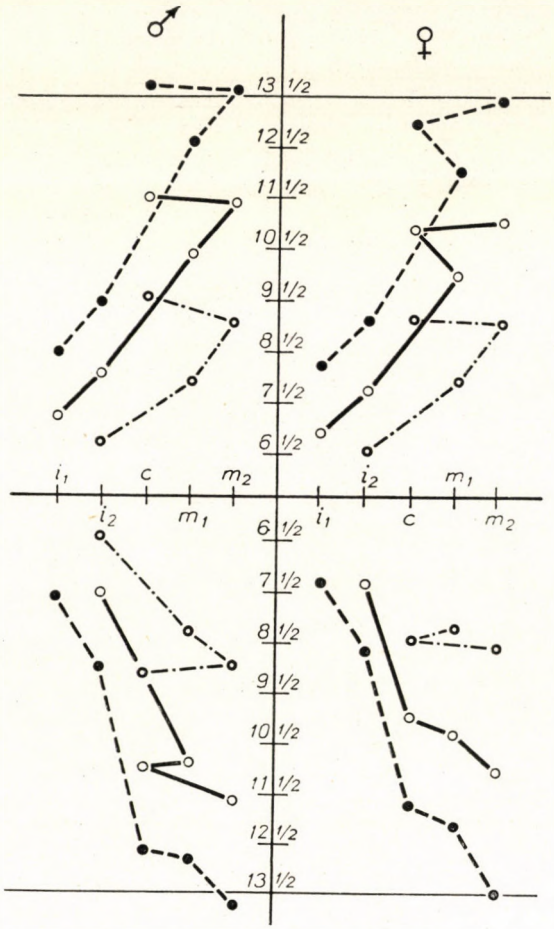


Fig. 2. Sequence of loss of the deciduous teeth in the upper and lower jaws of boys and of girls, in reliance to the 90th, 50th and 10th percentiles of deciduous tooth presence.

90th percentiles : black dots connected by ·—·—·—
50th percentiles : white dots connected by ————
10th percentiles : black dots connected by — — — —

Considerably more variability is displayed in the sequence of eruption during the second phase of changing dentition. In the upper jaw P_1 usually emerged first, and M_2 last. Earlier eruption of P_2 than of P_1 occurred in hardly 5 per cent of the examinees ; earlier emergence of C than of P_1 was even less

frequent. On the other hand, eruption of C occurred later than of M_2 in 24 per cent of boys, and 16 per cent of girls. M_2 emerged before P_2 in somewhat more than 10 per cent of the examinees. In the mandible, C and P_1 erupted markedly earlier than P_2 and M_2. In girls, in 65 per cent the first tooth to erupt was the cuspid (C), while in boys there was no marked preponderance of this tooth over P_1 (in 47 per cent of boys C erupted prior to P_1 ; in 39 per cent P_1 prior to C ; while in the remaining 14 per cent emergence of these two types occurred practically simultaneously). Eruption of P_2 before C occurred in approximately 11 per cent of male, but only in 5 per cent of female examinees. In some

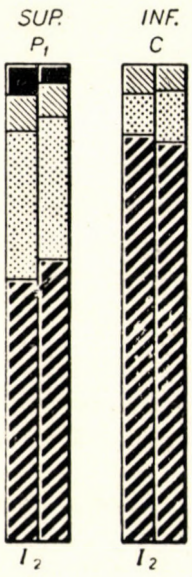


Fig. 3. Mutual eruptional stage of the upper I_2 and P_1, and of the lower I_2 and C in boys (left of the double columns) and in girls (right in the double columns).
The percentage of examinees displaying two incisors and no premolar or cuspid is *thick streated*
Percentage of examinees with two incisors and one premolar or cuspid is *pointed*
Percentage of examinees with one incisor, and no premolar or cuspid is *thin streated*
Percentage of examinees with one incisor and one premolar or cuspid, one premolar or cuspid and no incisor, two premolars or cuspids and one incisor or no incisor is noted : *black*
Number of examinees in comparing the two pairs of teeth in the upper jaw: 1967, in the lower jaw : 1880 h

instances M_2 erupted earlier than C ; this sequence was encountered in 14 per cent of the boys, and in 5 per cent of the girls. P_2 erupted usually much later than P_1 ; exceptions were encountered in less than 10 per cent. As regards the sequence of emergence of P_2 and M_2, an advance of the premolar was somewhat more frequent, but advanced eruption of M_2 was nearly as frequently met with.

Comparing the homologous upper and lower pairs, in agreement with data of the literature an advance of the lower ones was found as regards C

and M_2. Earlier eruption of an upper cuspid was seen in boys with approximately 10, in girls with less than 5 per cent frequency. With the second molars, reversal of the eruption was found in both boys and girls with approximately 10 per cent frequency. — As regards premolars, text-books emphasize the earlier eruption of the upper ones. This was true in the majority of our material but a reversed sequence was not infrequent either. Exemptions from the general rule concerning the first premolars was observed in 18 per cent of the boys and 30 per cent of the girls. Earlier eruption of the lower second premolar in comparison with the upper one was encountered with 27 and 40 per cent frequency in boys, and in girls, respectively.

Although teeth are arranged in symmetrical pairs, during the changing dentition transitory asymmetries are often seen. Bilateral mates of teeth do not erupt at the same time in many a child. Discrepancies often occur between the right and left halves of the jaws also in the sequence of eruption. According to our experience (ADLER), such asymmetries are considerably more frequent in the second than in the first phase of the changing dentition.

As it has been pointed out, divergencies from the usual sequence of eruption are rather frequent. Therefore, in our opinion, a reversal of the usual sequence of eruption cannot be regarded in most instances as pathological. Such reversals often result after the early extraction of a deciduous tooth when its successor erupts considerably earlier than it should in the normal course of events (after the natural shedding of the deciduous predecessor), prior to several other teeth whose normal eruption occurs at an earlier age but is not altered in the examinees. — Findings of this kind were most frequently recorded in connection with deciduous molars and permanent premolars. As a sequel of this we found in the examinees a premolar erupted on the one side of one jaw, although this tooth does not appear in the typical "early" eruptor tooth formula of the equal sex and chronological age, but other teeth were still absent that are contained in the typical tooth formula of the "early" eruptors. As has been pointed out when discussing the temporal variability of eruption and the dental age, these cases are regarded as instances of advanced dental development. Clinically, an importance can hardly be attributed to them.

Taking into consideration the variations in the eruption age and the sequence of eruption, a correct diagnosis of the anomalies of replacing the deciduous teeth can hardly be expected from a single examination of school-age children. Anomalies of the changing dentition may be suspected in all cases of retarded shedding or eruption, especially if there has emerged a tooth that usually erupts later, while teeth usually erupting at an earlier age are not yet present in the mouth, first of all if a tooth of the second dentitional period emerged before all teeth of the first period had erupted. Unfortunately, we are not able to recognize at due time those disturbances of the changing dentition — relying upon either normal variations of eruption ages, or on the

typical tooth formulae, or upon any other criterion — which would need early treatment or at least permanent control, as *e. g.* aplasia of the upper lateral incisor, or of the lower or upper second premolar on the one hand, aberrant eruption and imminent retention of the permanent cuspid or a permanent premolar, on the other hand. When disturbances of this kind are recognized, it is mostly necessary to start treatment by appliances in order to correct the malocclusion or the sequelae of aberrant development.

Considering the great variability of eruption ages and of the sequence of eruption, it seems questionable whether or not there is any reliable criterion during the period of changing dentition which would permit to recognize aberrations from the normal. We have been able to show that such a criterion actually exists, namely the duration of the "edentulous interval", *i. e.* the time elapsing between the natural shedding of a deciduous tooth and the emergence of its permanent successor. It was pointed out earlier (ADLER) that a disturbance of the dentition change has to be suspected if the emergence of a permanent tooth does not occur within two months after the (natural) shedding of the deciduous predecessor. It is noteworthy that the duration of the "edentulous interval" is rather constant in "early", "average", and "late" eruptors.

Summary

Variability of the mean ages at eruption of the individual teeth and of the sequence of tooth eruption have been dealt with, with regard to population and clinical studies. While there are reliable methods for population studies, none has been known to permit an early diagnosis of disturbances of the tooth elimination and replacement process in surveying school-age children. The main reason of this lack of proper methods is the great individual variability in the course of changing dentition. Of all characteristics of this peculiar developmental period, the duration of the "edentulous interval" has proved to be subject to the least variability.

REFERENCES

1. ADLER, P.: (1956) A fogváltás időrendjének egyes törvényszerűségei. — Thesis. — 2. ADLER, P.: (1957) Über das zahnlose Intervall. Stoma (Konstanz) *10*, 137. — 3. ADLER, P.: (1957) Die Eignung der normalen Wahrscheinlichkeitskurve zur Darstellung der Elimination und Eruption der einzelnen Zähne während des Zahnwechsels. Öst. Z. Stomatol. *54*, 449. — 4. ADLER, P.: (1958) Die Asymmetrie des Zahnwechsels. Stoma (Konstanz) *11*, 123. — 5. ADLER, P. und C. ADLER-HRADECKY: (1958) Der Gebrauch der "typischen Zahnformeln" zur Bestimmung des individuellen Zahnalters. Dtsch. zahnärztl. Z. *13*, 1362. — 6. ADLER, P. and E. GÖDÉNY: (1952) Studies on the eruption of the permanent teeth. II. The sequence of eruption. Acta Genet. (Basel) *3*, 30. — 7. CLEMENTS, E. M. B., E. DAVIES—THOMAS, and K. C. PICKETT: (1953) Order of eruption of the permanent human dentition. Brit. med. J. *1*, 1425. — 8. GARN, S. M. and A. B. LEWIS: (1957) Relationship between the sequence of calcification and the sequence of eruption of the mandibular molar and premolar teeth. J. dent. Res. *36*, 992. — 9. HELLMAN, M.: (1943) The phase of development concerned with erupting the permanent teeth. Amer. J. Orthodont. *29*, 507. — 10. LO, R. T., and R. E. MOYERS: (1953) Studies in the etiology and prevention of malocclusion. I. The sequence of eruption of the permanent dentition. Amer. J. Orthodont. *39*, 460. — 11. NAGY, I.: (1953) Hypodontia előfordulása a debreceni középiskolák tanulóin. Fogorv. Szemle *46*, 110. — 12. SIMON, B.: (1942) Stomatologiai diagnosztika. Universitas, Budapest.

НОРМАЛЬНЫЕ ВАРИАЦИИ СМЕНЫ ЗУБОВ

П. АДЛЕР и Ц. АДЛЕР–ХРАДЕЦКИ

Авторы излагают изменчивость времени выпадения молочных зубов, и прорезывания постоянных зубов, далее порядка прорезывания зубов, с одной стороны, с точки зрения популяции, а с другой, в отношении клиники. Для исследования смены зубов среди популяции имеются подходящие методы, однако, нет возможности в ходе массовых исследований для раннего распознавания у детей расстройств в смене зубов. Одной из главных причин этого является большая индивидуальная изменчивость процесса смены зубов. Среди характерных данных смены зубов оказалась самой постоянной величиной продолжительность интервала отсутствия зубов.

DIE NORMALE VARIABILITÄT DES ZAHNWECHSELS

P. ADLER und C. ADLER-HRADECKY

Die Variabilität der mittleren Ausfallszeiten der einzelnen Milch- und der mittleren Durchbruchszeiten der einzelnen bleibenden Zähne sowie der Durchbruchsfolge der Zähne wurde in bezug auf Populations- und klinische Studien diskutiert. Während für Populationsstudien geeignete Methoden zur Verfügung stehen, ergibt sich keine Möglichkeit der Frühdiagnose der Zahnwechsel-Störungen in Rahmen von Reihenuntersuchungen. Die Hauptursache liegt in der hochgradigen individuellen Variabilität im Verlaufe des Zahnwechsels. Von allen diese Entwicklungsphase betreffenden Zahlenangaben erwies sich die Dauer des »zahnlosen Intervalles« als den geringsten Variationen unterworfen.

Prof. Dr. Peter Adler
Dr. C. Adler-Hradecky
} **Debrecen, 12. Fogászati klinika, Hungary.**

Department of Pathological Anatomy, Medical University, Debrecen (Director: Prof. P. ENDES)

FUNCTIONAL REACTIVITY OF HOMOTRANSPLANTED RAT THYROID

I. DÉVÉNYI and L. MEGYERI

(Received December 19, 1958)

In our previous experiments [1, 2, 3] a technique has been elaborated for the homotransplantation of rat thyroid gland. The resistance of the host organism was controlled by transitory cortisone treatment, and the success of the transplantations was attributed to the tolerance thus induced [4]. It follows from the practical object of transplantation experiments that we must not content ourselves with a simple "take" of the transplants, with the mere survival of its cells. What we have to achieve is an organic incorporation into the host organism of the transplant, its adequate response to the actions of the organism's various regulation mechanisms.

Certain data of this kind, obtained in the course of the said experiments, were furnished by the body-weight curves of the thyroidectomized host animals and the histologically observable functional state of the transplants.

We performed some further experiments with a view to studying the functional reactivity of the transplants by means of their I^{131} uptake [5]. It was found that the transplants needed 11 days to develop such functional changes as could be attributed to the action of endogenous TSH produced by the thyroidectomized host. Since literary data showed this time to be comparatively long, we felt induced to approach the problem from another angle as well.

The usual methods for the registration of functional changes in the thyroid gland are the following.

1. Measurement of nuclear volume. It has been proved that nuclear volume increases on the administration of TSH [11, 12] and decreases on that of potassium iodide [13].

2. Measurement of the height of epithelial cells in the follicles. It has been proved that a stimulation by TSH increases cell height [9, 8, 10, 16, 6].

3. Among other cytological methods, worthy of mention is the cyclic change of esterase activity dependent on the functional state [17], or changes in phosphatase activity which latter become less pronounced on treatment with thyroxine and more marked on treatment with TSH and thiocyanate [14].

Induced by KÖNIG's report [8], we chose the second method.

Results are detailed in Table I.

Table I

Serial number of test animal	Average cell height	Standard deviation	Group
1.	3,19±0.05	0.59	Control
2.	3,23±0.09	0.91	,,
3.	3.54±0.08	0.81	,,
4.	2.74±0.05	0.58	,,
5.	3.26±0.08	0.81	,,
6.	5.29±0.08	0.84	1-day group
7.	4.85±0.08	0.83	,, ,,
8.	4.7 ±0.09	0.99	,, ,,
9.	5.27±0.09	0.96	,, ,,
10.	4.61±0.08	0.89	,, ,,
11.	4.98±0.06	0.64	2-day group
12.	4.02±0.11	1.11	,, ,,
13.	7.04±0.12	1.24	,, ,,
14.	5.32±0.09	0.95	,, ,,
15.	6.86±0.12	1.26	,, ,,
16.	6.06±0.08	0.89	,, ,,
17.	5.83±0.09	0.95	4-day group
18.	5.89±0.11	1.15	,, ,,
19.	5.15±0.1	1.05	,, ,,
20.	5.44±0.14	1.47	,, ,,
21.	6.99±0.13	1.39	,, ,,
22.	8.28±0.13	1.39	6-day group
23.	6.38±0.13	1.32	8-day group
24.	8.83±0.15	1.52	,, ,,
25.	11.03±0.2	2.03	,, ,,
26.	9.96±0.2	2.03	,, ,,
27.	10.46±0.22	2.21	,, ,,
28.	11.24±0.22	2.2	10-day group
29.	9.8 ±0.18	1.8	,, ,,
30.	8.73±0.14	1.41	,, ,,
31.	10.44±0.25	2.51	10-day group
32.	8.86±0.16	1.64	,, ,,
33.	12.29±0.19	1.93	13-day group
34.	11.66±0.25	2.51	,, ,,
35.	11.28±0.2	2.09	,, ,,
36.	7.82±0.13	1.33	,, ,,
37.	9.97±0.16	1.66	,, ,,

Table I (continued)

Serial number of test animal	Average cell height	Standard deviation	Group
38.	9.52±0.18	1.87	,, ,,
39.	7.94±0.14	1.45	16-day group
40.	7.77±0.22	2.29	,, ,,
41.	11.12±0.17	1.74	,, ,,
42.	11.16±0.22	2.24	,, ,,
43.	11.26±0.21	2.16	,, ,,
44.	10.44±0.2	2.0	,, ,,

Method

A total of 60 female albino rats with body weights between 140 and 160 g was used in these experiments. Immediately after having transplanted homologous thyroid lobes under the skin of the back of the animals (for the technique of transplantation see (1), treatment with cortisone was begun. A total amount of 15 mg, distributed over 6 doses, was administered every other day. Each animal was kept in a separate cage for 90 days after which 48 animals were thyroidectomized in the known manner (1) and 12 animals left as controls. The 48 thyroidectomized animals were divided into 8 groups, and these groups of six were then exsanguinated in chloroform anaesthesia on the 1st, 2nd, 4th, 6th, 8th, 10th, 13th and 16th days, respectively. The implants were removed from the sacrificed animals and worked up histologically in serial sections. On the 90th day, the implants were excised also from the 12 control animals and serially sectioned in a like manner. Transplants appearing unsuccessful on gross examination (16 altogether) were discarded, which of course caused a corresponding change in the original composition of the groups.

Using an eyepiece micrometer, we measured the height of 100 follicle-epithelial cells per animal in the serial sections of the removed transplants and converted the obtained relative figures into micra. We determined the average cell height per animal, its scattering, as also the dispersion of the entire assembly of measured figures. We further ascertained the mean value of the individual average heights within each group and its scattering. This done, the significance of the group differences was determined as far as it was necessary.

Figures illustrating the average height of follicular epithelium in each particular group are shown in Table II.

Table II

Group	Average cell height	Standard deviation
Control	3.19±0.07	0.74
1-day group	4.94±0.09	0.90
2-day group	5.71±0.1	1.01
4-day group	5.87±0.11	1.13
6-day group	8.28±0.13	1.39
8-day group	9.33±0.18	1.82
10-day group	9.82±0.19	1.9
13-day group	10.42±0.19	1.9
16-day group	9.95±0.19	1.98

It can be seen that thyroidectomy is followed by a progressive growth of the follicular epithelium. Such growth is marked as early as after 24 hours. To ascertain the significance of the difference between controls and tests, the 500 data obtained for the five animals of the control group were compared with the 500 data obtained for the five animals of the 1-day group by means of Wilcoxon's method. It was found that even at a probability level of 001 there was a significant difference between the two statistical assemblies.*

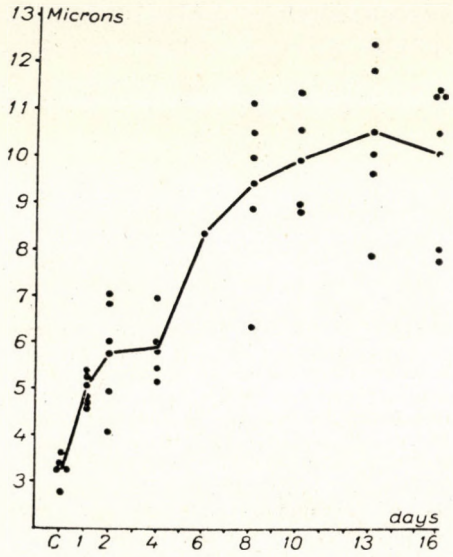


Fig. 1. Cell heights in single groups and in the animals within each group. Average group heights connected by continuous line

Figures concerning cell height in the various groups are well illustrated in Fig. 1. The dates at which the transplants were removed and analysed are shown on the abscissa, the cell heights, expressed in micra, on the ordinate. Dots mean the cell heights within each group, while the dots representing the average height of each group are connected by a continuous line.

Fig. 2 shows the percentage distribution of all cell heights in the control group, the 1-day group and the 10-day group. It can be seen that, after thyroidectomy, the curve is gradually moving to the right, becomes, at the same time, flatter and covers a gradually widening range. This is also observable from the gradually increasing dispersion values.

For the morphological illustration of the change in cell height we prepared identical enlargements of a definite visual field from various groups (Figs. 3—4). The gradual increase of cell height can be clearly followed in them,

* For the statistical analysis we are indebted to the Institute of Mathematics of the University of Debrecen.

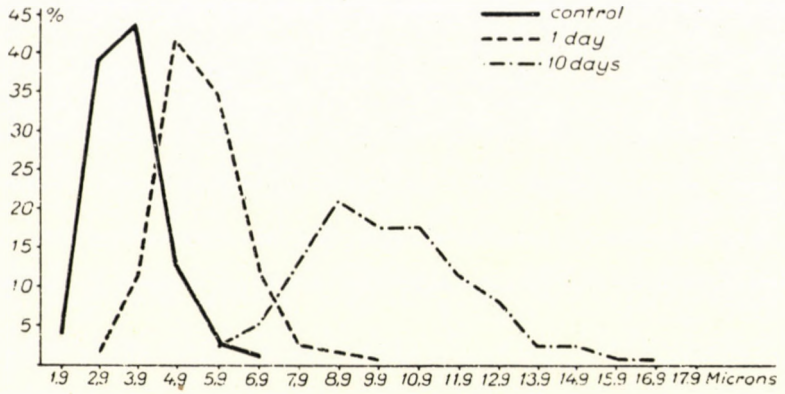


Fig. 2. Percentage distribution of cell heights in the control group, the 1-day group and the 10-day group

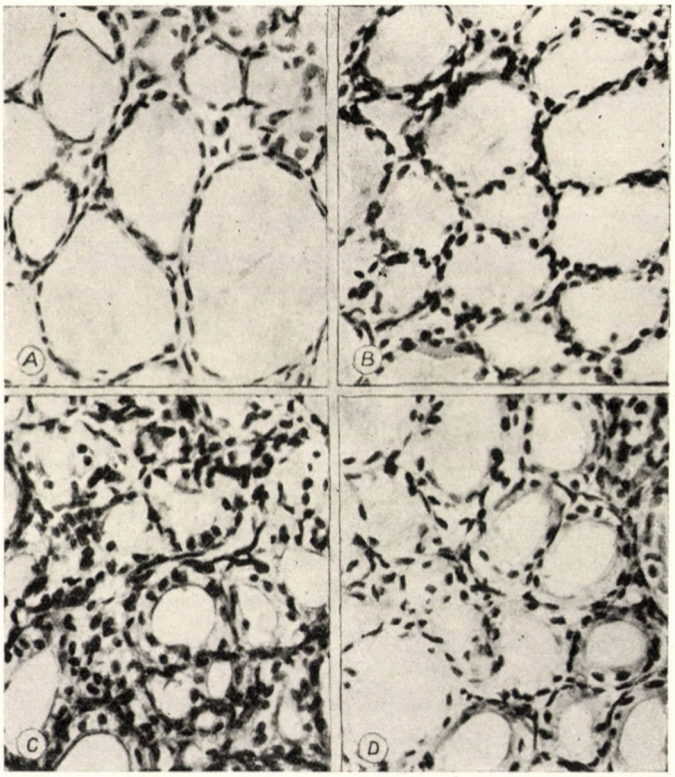


Fig. 3. 90-day transplants after treatment with adaptation doses of cortisone. HE, × 360. — A : animal No. 2, control with own thyroid gland ; average height of follicular epithelium, 3.23 ± 0.09 μ. — B : animal No. 6. Thyroidectomized 24 hours before removing the transplant ; average height of follicular epithelium, 5.29 ± 0.08 μ. — C : animal No. 13. Thyroidectomized 48 hours before removing the transplant ; average height of follicular epithelium, 7.04 ± 0.12 μ. — D : animal No. 26. Thyroidectomized 8 days before removing the transplant ; average height of follicular epithelium, 9.96 ± 0.20 μ

and they also show how the storing, inactive follicles change into more active, later almost excessively functioning, follicles.

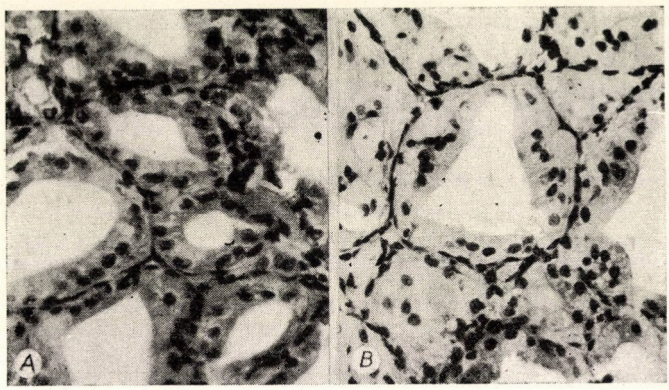


Fig. 4. 90-day transplants after treatment with adaptation doses of cortisone. HE × 360. — A : animal No. 28. Thyroidectomized 10 days before removing the transplant ; average height of follicular epithelium, 11.24 ± 0.22 μ. — B : animal No. 34. Thyroidectomized 13 days before removing the transplant ; average height of follicular epithelium, 11.66 ± 0.25 μ

Discussion

The observation that transplants are favourably reacting to the enhanced TSH stimulus following thyroidectomy and that this response is manifest as soon as within 24 hours, seems to be the most significant result of our experiments.

A morphological change of the follicular epithelium consequent upon injection of TSH was demonstrated by JUNKMANN and SCHOELLER [7] to have occurred within 12 to 24 hours and by OKKELS [15] as early as 30 minutes after the introduction of the hormone. These authors employed other cytological methods in some of their experiments and made their observations on normal thyroids *in situ*, with arbitrary doses of thyrotropic hormone. The changes observed in our own experiments were induced by an endogenous TSH-stimulus which is undoubtedly weaker than that elicited by injected hormone ; they prove that the functional value of our implants and the degree of their collaboration with the host organism were nearly as good as those of intact normal thyroids, and that, thus, implanted thyroid glands are capable of satisfactorily replacing the removed organ.

Summary

Homologous thyroid tissue was transplanted into 44 female albino rats which were treated with adaptation doses of cortisone.

The normal thyroid gland of 39 test animals was removed after 90 days and the implanted thyroid tissue was examined at various intervals following thyroidectomy. The degree

of secretory activity in the transplants was determined by measuring the height of the cells composing the follicular epithelium.

As early as one day after thyroidectomy a very significant increase in the height of the said epithelial cells could be registered. A comparison of this observation with literary data concerning the time needed by normal — *in situ* — thyroid glands to respond to stimulation by TSH permits of the conclusion that the functional value of implanted thyroids and their collaboration with the host organism are hardly inferior to those of the intact organs.

REFERENCE

1. Dévényi, I., Czenkár, B., Endes, P.: (1957) Wirkung der Cortisonadaptationsbehandlung auf das Totale und erwachsene Schilddrüsen- und Nebenschilddrüsen-Homoiotransplantat der Ratte. Frankfurt. Z. Path. *68*, 418. — 2. Dévényi, I., Czenkár, B., Endes, P.: (1958) Homotransplantation of adult rat thyroid and parathyroid with simultaneous cortisone treatment. Acta Morph. Hung. *8*, 39. — 3. Dévényi, I., Czenkár, B., Endes, P.: (1958) Homotransplantation of foetal thyroid glands to temporarily cortisone-treated rats. Acta Morph. Hung. *8*, 59. — 4. Dévényi, I., Czenkár, B., Endes, P.: (1957) Untersuchung der immunbiologischen Anpassung von Homoiotransplantaten. Frankfurt. Z. Path. *68*, 435. — 5. Dévényi, I., Kertész, L., Czenkár, B.: (1958) I—131 uptake of homotransplanted thyroids. Acta. Biol. Hung. *8*, 326. — 6. Griesbach, W. E., Purves, H. D.: (1943) The assay of thyrotropic activity by the cell height response in guinea-pigs. Brit. J. exp. Path. *24*, 185. — 7. Junkmann, K., Schoeller, W.: (1932) Klin. Wschr. 1176. Cit: König (8). — 8. König, J.: (1953) Die experimentelle Morphologie der Schilddrüse. Med. Mschr. 7, 624. — 9. Kracht, J., Kracht, U.: (1952) Zur Histopathologie und Therapie der Schreckthyreotoxikose des Wildkaninchens. Virchow's Arch. path. Anat. *321*, 328. — 10. Kracht, J.: (1953) Über die Regulation der Ausschüttung des thyreotropen und corticotropen Hormons. Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 59. Kongress. — 11. Mess, B.: (1954) Kernvolumina der Schilddrüse als Maßstab für die thyreotrophe Aktivität des Hypophysenvorderlappens. Acta Morph. Hung. *4*, 515. — 12. Mess, B.: (1956) Ein Verfahren zur Bestimmung kleinerer Mengen thyreotrophen Hormons. Acta Physiol. Hung. *9*, 215. — 13. Moesch, H. R.: (1956) Zur Jodwirkung auf die Schilddrüse. Histologische und kernvolumetrische Untersuchungen an Schilddrüsen normaler, hypophysektomierter, sowie mit Thiouracil behandelter Albinoratten. Acta Anat. *27*, 193. — 14. Negri, L., Weber, G.: (1953) L'attivita fosfatasica nella tiroide di ratto nella norma e in diverse situazioni funzionali sperimentali (trattamento con metiltiouracile, tireotropina ipofisaria, tiroxina). Arch. "De Vecchi" Anat. patol. *20*, 253. — 15. Okkels, H.: (1932) Acta path. microbiol. scand. *9*, 1. Cit.: König (8). — 16. Rawson, R. W., Starr, P.: (1938) Arch. int. Med. *61*, 726. Cit.: König (8). — 17. Weber, G.: (1954) L'attivita esterasica nella tiroide di ratto nella norma e in diverse situazioni funzionali sperimentali (trattamento con tireotropina ipofisaria e tiroxina). Arch. "De Vecchi" Anat. patol. *22*, 929.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ СПОСОБНОСТИ К РЕАКЦИИ ГОМОТРАНСПЛАНТАТОВ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРЫС

И. ДЕВЕНЬИ и Л. МЕДЬЕРИ

Авторы проводили гомотрансплантации щитовидной железы крыс на 44 самках белых крыс, применяя одновременно обработку животных адаптационными дозами кортизона, согласно разработанной ими методике. Они удалили собственные щитовидные железы у животных-хозяев 90-дневных трансплантатов, а затем исследовали в различных периодах трансплантаты и регистрировали степень секреторной активности последних путем измерения высоты фолликулярных эпителиальных клеток.

Уже за день после удаления щитовидной железы наблюдалось сильно сигнификантное повышение высоты фолликулярных эпителиальных клеток. Сопоставляя полученные результаты с литературными данными о времени реакции нормальных щитовидных желез на стимул TSH, указывается на то, что функциональная ценность трансплантатов, их взаимодействие с организмом животных-хозяев сильно подходит к функциональной ценности нормальной щитовидной железы.

UNTERSUCHUNG DER FUNKTIONALEN REAKTIONSFÄHIGKEIT VON HOMO-TRANSPLANTIERTEN RATTENSCHILDDRÜSEN

I. DÉVÉNYI und L. MEGYERI

An 44 weissen weiblichen Ratten wurde Homotransplantation von Rattenschilddrüse durchgeführt, bei gleichzeitiger Behandlung der Tiere mit von den Verfassern ausgearbeiteten Kortisonadaptationsdosen. 90 Tage nach der Transplantation wurde die eigene Schilddrüse der Akzeptortiere entfernt, und danach die Transplantate in verschiedenen Zeiträumen untersucht. Der Grad der sekretorischen Aktivität der Transplantate wurde mittels Messung der Höhe der Follikelepithelzellen registriert.

Bereits nach Verlauf eines Tages nach der Ektomie konnte eine stark signifikante Zunahme der Höhe der Follikelepithelzellen beobachtet werden. Ein Vergleich dieses Ergebnisses mit den literarischen Angaben über die Reaktionszeit von normalen Schilddrüsen auf TSH Stimulation weist darauf hin, dass der funktionelle Wert der Transplantate, ihr Zusammenwirken mit dem Wirtsorganismus, dem Wert der normalen Schilddrüsen stark nahekommt.

Dr. István DÉVÉNYI
Dr. László MEGYERI
Debrecen, 12. Kórbonctani intézet, Hungary.

2nd Department of Surgery, Medical University, Debrecen (Director: Prof. J. LADÁNYI)

EXPERIMENTAL INTRATHORACIC OESOPHAGOPLASTY WITH SKIN TUBE

L. E. SZABÓ*, G. TOMPA and G. BAKÓ

(Received December 5, 1958)

During the past decade, thoracic surgery has been advancing at enormous strides. VISHNEVSKY's vagosympathetic blockade, intratracheal anaesthesia, the extensive use of transfusions and antibiotics have greatly reduced the hazards of opening the chest. In oesophageal surgery intrathoracic techniques are common and transpleural methods are employed in an increasing number for oesophageal repair approaching best the aims to be attained. Oesophagoplasty performed in this way is physiologically and cosmetically adequate and the functional results are by far superior to those obtained by antethoracic repair. However, the present techniques of intrathoracic surgery still leave much to be desired and research must continue to develop efficient and reliable techniques.

Experimental

Dogs weighing 12 to 18 kg were used. Under ether anaesthesia an oblong full-thickness piece of abdominal skin was cut to make a skin tube 80 to 100 mm long and 15 to 20 mm in diameter. With the epithelium inward, the graft was united by knotted sutures to form a tube and was transplanted into the lower portion of the omentum maius of dogs, covering it completely with omentum, fixing it by few knotted sutures then placing it into the abdominal cavity. Three to six weeks later the transplant was pulled out from the abdomen, opened up at the two ends and the omentum was prepared up from the margins in a width of a few mm, to facilitate anastomosis (*Fig. 1*). The omentum maius was pedicled to facilitate pulling up into the thorax, taking care for the pedicle's adequate blood supply. Under intratracheal anaesthesia thoracotomy was performed in the left 7th intercostal space. The mediastinum, vagus nerve and phrenic nerve were infiltrated with procaine and below the aortic arch a piece of oesophagus, 4 to 6 cm long, was resected. The diaphragm was cut near the oesophageal hiatus, the skin tube prepared for anastomosis hanging on the pedicled omentum was pulled up into the anterior thorax to the stomach and was anastomosed in place of the resected part of the oesophagus *(Fig. 2)*. Anastomosis was performed in three layers, separating the oesophageal muscle layer from the layer of mucosa. In the first layer the mucosa was united with skin, by interrupted sutures. As the second layer, the first line of sutures was so covered by the detached muscle layer, that the muscle was sutured to the subcutis. In the third layer the detached part of the omentum was sutured circularly onto the oesophagus *(Fig. 3)*. The diaphragm wound was narrowed and the omental pedicle was fixed to its margins with a few sutures. After administering penicillin and streptomycin into the thoracic cavity, the wounds were closed by layers. The survivors were fed a liquid diet for one week, and a light, mixed diet until death.

* Present address, 1st Dept. of Surgery, Medical University of Budapest.

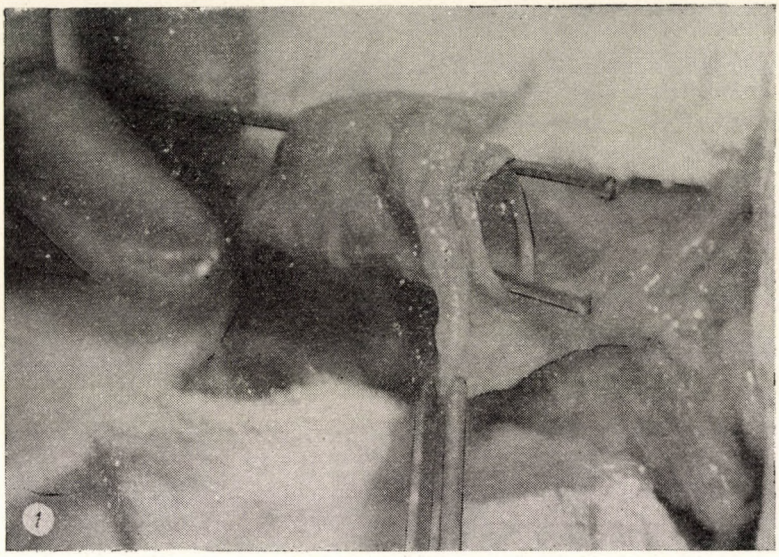


Fig. 1. Skin tube in the lower portion of the great omentum, six weeks after transplantation. The two ends are prepared, ready for anastomosis

Fig. 2. Skin tube attached to omental pedicle, pulled into thorax, to repair resected oesophagus

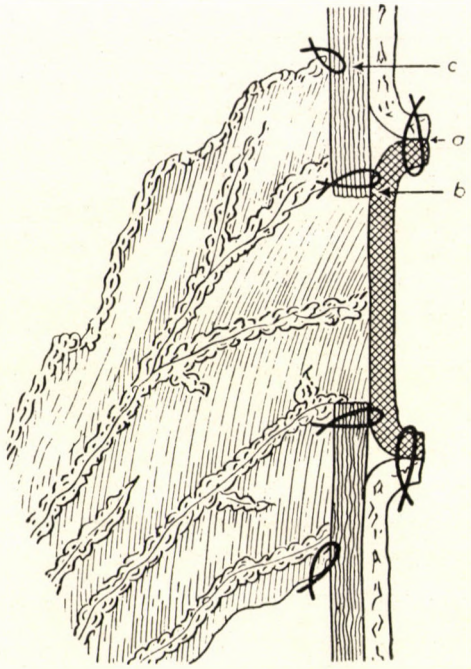


Fig. 3. Diagrammatic representation of oesophageal-skin tube anastomosis by three layers. (a : skin to mucosa, b : skin to muscle, c : omentum to oesophagus)

Results

Of the 14 skin tubes 2 had partially necrosed and could not be used for anastomosis. In the other 12 cases oesophagoplasty was performed 3 to 6 weeks after grafting. At that time the skin tubes were moderately shrunk and filled with a soft mass composed of sebum, epithelial sells and hairs. The surface of the skin was covered by very fine hairs. Microscopically, the structure of the epithelium was intact, the stratum corneum slightly loosened. Many capillaries were present in the subcutaneous connective tissue. There were no considerable differences between the grafts transplanted after 3 and 6 weeks, except that in the latter the subcutaneous connective tissue was more richly vascularized.

Of the 8 animals lost immediately after transplantation 4 died of pneumonia and/or empyema, 3 of suture insufficiency and 1 as a result of vascular occlusion in the omental pedicle due to compression or thrombosis. The remaining animals survived for 27 to 115 days and died of intercurrent disease or inanition *(Table I)*. In the dogs which had survived longer, necropsy revealed an intact graft in 3 animals ; in 1 graft there was an ulcer about 2 cm in diameter. The grafts united well with the oesophagus, but shrank and the distal line of sutures was narrowed in every animal. The section of the oesophagus above the graft was dilated *(Fig. 4)*. The histologic pattern of the section above

Table I

No.	Interval between omental transplantation and oesophagoplasty, days	Survival time, days	Cause of death, post-mortem findings
1.	24	1	Pneumonia, pleuritis, heart failure
2.	35	5	Empyema, insufficiency of suture
3.	35	5	The partially necrosed skin tube was unsuitable for use in oesophagoplasty
4.	41	27	Pneumonia, marasmus, the lower anastomosis blocked by a nut-sized ball of meat
5.	21	3	Empyema, suture insufficiency
6.	34	52	Pneumonia, inanition, lower anastomosis narrowed to pencil-thickness
7.	35	2	Pneumonia, empyema, suture insufficiency
8.	38	1	Pneumonia, pleuritis, heart failure
9.	26	3	Empyema, suture insufficiency
10.	26	3	Partial necrosis of skin tube, as in case 3.
11.	43	115	Inanition, distal anastomosis extremely narrowed
12.	36	2	Empyema, necrosis of graft, thrombosis of the blood vessels of the omental pedicle superior to the diaphragm
13.	30	98	Inanition, extremely severe stricture at the distal anastomosis, in the skin graft an ulcer, about 2 cm in diameter, bleeding and covered by fragile tissue
14.	32	1	Pneumonia, pleuritis, heart failure

the graft was normal. In the well-discernible upper portion of the graft a part measuring about 5 mm of the oesophageal muscle pulled down during operation was visible. Below that level the wall of the graft tube consisted of connective tissue. The oesophageal muscle surrounded the graft at the gastric end. The epithelium of the transplant was composed of 4 to 5 layers of flat epithelial cells. In the subepithelial connective tissue there were leucocytic and mainly lymphocytic infiltration, dilated capillaries and smaller arterioles.

Discussion

The afore-told experimental investigations have shown that the full thickness abdominal skin tube graft takes when transplanted into the great omentum and retains its histologic structure. Three to 6 weeks after transplantation the tube grafted on an omental pedicle may be pulled up through the diaphragm into the thorax and can replace a resected part of the oesophagus. The anastomosis by three layers remained firm in 75 per cent of the cases and this percentage may further be raised by improving the surgical technique. The omental pedicle pulled up into the thorax has a good blood supply. Only one of the grafts connected with it was necrosed, presumably as a result

of surgical error ; the diaphragmal wound had namely been sutured too tightly around the pedicle, compressing its blood vessels. Except in one case, the grafts remained intact, though shrunk. At the distal suture line a stricture developed so that the animals could not eat and died of inanition or from intercurrent

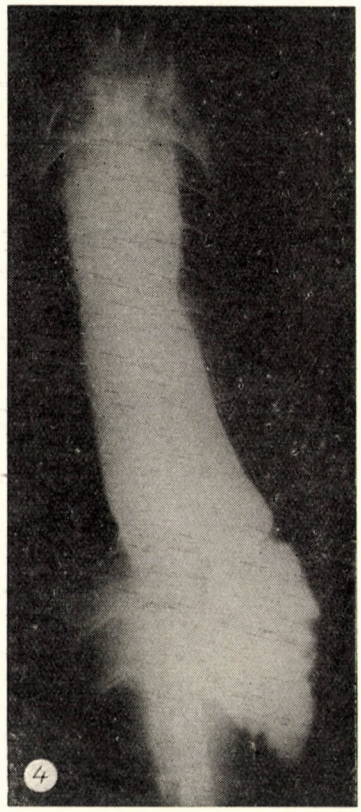


Fig. 4. X-ray appearance of oesophagus 3 months after operation. Stricture at lower anastomosis, dilatation of the proximal part of oesophagus

disease due to starvation. The stricture developed apparently because of the absence of sufficient peristaltic pressure to carry the food further across that area. Peristalsis pressed the food through the upper suture line, but below it there was no peristaltic activity. With antethoracic repair it is also usual that the patients help with their hands to forward the food in the skin tube, preventing thereby a congestion of food, and press it through the distal suture line.

In our experiments the mortality rate was very high immediately following intrathoracic surgery, greater than in clinical practice. This is easy to understand if we realize that it is difficult to institute shock-relieving measures, blood transfusions, infusions and parenteral alimentation in animals and

we had no possibility for employing such therapeutic interventions. Even so, refined surgical technique and adequate experience may considerably reduce the mortality rate. Our method may still prove superior in clinical practice to that involving the use of plastic tubes (BERMANN, RÓTH) or to those in which lyophilized specimens are transplanted (PATE, SAVAYER, PATAKY, MOLNÁR JAKAB, BORNEMISZA). Repair with a skin tube carried up into the thorax, complete with an omental pedicle with good vascular supply and anastomosed in three layers, seems to be a more reliable method than the transplantation of a free skin tube, as employed by EDGERTON, CONNER, and others ; such tubes are not certain to take.

The method facilitates segmental repair of the oesophagus ; the cardia may be retained and thus oesophagitis, ulceration due to regurgitation may be prevented. The procedure cannot be claimed to have solved the problem of segmental intrathoracic oesophageal repair, in view of the fact that the insufficient intraluminal pressure resulting from the lack of peristalsis caused the distal suture line to constrict, so that the animals that had survived the operation subsequently died of inanition. We think that for oesophagoplasty such an organ should be used which by its own peristaltic activity is capable of producing a sufficient intraluminal pressure and may thus forward food even through the distal suture line. Research should therefore be continued in this direction.

Summary

In animal experiments a full thickness abdominal skin tube flap was prepared which was then transplanted into the great omentum. Three to six weeks later the skin tube with its omental pedicle was pulled up through the diaphragm into the thorax to serve for repairing the oesophagus from which a section had been excised. The skin tube united with the oesophagus, but shrank. As a result of a lack of peristaltic activity and low intraluminal pressure the distal line of sutures became narrowed and a stricture developed.

The method seems to be superior to those involving the use of plastic tubes or lyophilized oesophagus for oesophagoplasty. It is more reliable than the use of a free skin tube, but it cannot be claimed to have solved the problem of segmental oesophagoplasty. To this end, an organ should be used which has a peristaltic activity of its own and is thus capable of passing the food across the line of distal anastomosis.

REFERENCES

1. DEBAKEY, M. E., OCHSNER, A. : (1948) Subtotal Esophagectomy and Esophagogastrostomy for High Intrathoracic Esophageal Lesions. Surgery *23*, 935. — 2. BERMANN E. F. : (1952) A Plastic Prothesis for Resected Esophagus. Arch. Surg. *65*, 916. — (1952) The Experimental Replacement of Portions of the Esophagus by a Plastic Tube. Ann. Surg. *135*, 337. — (1954) Carcinoma of Esophagus ; A New Concept in Therapy. Surgery *35*, 822. — 3. BIRCHER, E. : (1907) Ein Beitrag zur plastischen Bildung neuen Oesophagus. Zbl. Chir. *51*, 1749. — 4. CONNAR, R. G., CAMPBELL, F. H., PICKRELL, K. L. : (1956) Esophageal Reconstruction with Free Autogenous Dermal Grafts. Surgery *39*, 459. — 5. EDGERTON, M. T. : (1952) One Stage Reconstruction of the Cervical Esophagus or Trachea. Surgery *31*, 239. — 6. GERGELY, R. : (1952) A mesenterium mobilizálásának jelentősége az antethoracalis nyelőcsőplasztikában. Magy. Sebészet *1*, 23. (The Significance of Mesenteric Mobilization in the Antethoracic Eosophagoplasty.) —7. HERZEN, P. : (1908) Eine Modification der Rouxschen Oesophago-jejuno-gastrostomie. Zbl. Chir. *35*, 219. — 8. Юдин С. С. : (1954) Опыт трансплевральной пластики пищевода из тощей кишки. Вест. Хир. *75*, 5, 25. — 9. LEXER, E. :

(1908) Oesophagoplastik. Dtsch. med. Wschr. *34*, 574. — 10. MARTON, T., FEUER, I. : (1952) Kísérletes nyelőcsőgyomor anastomosis. Mag. Sebészet *1*, 19. (Experimental Eosophagogastric Anastomosis). — 11. NISSEN, R. : (1954) Operation am Ösophagus. Thieme, Stuttgart. — 12. PATE, J. W., SAVAYER, P. N. : (1953) Failure of Freezed-Dried Esophageal Grafts. Amer. J. Surg. *86*, 152. — 13. PATAKY, Zs., MOLNÁR, L., JAKAB, T. : (1958) Erfahrungen aus Experimenten mit lyophilisierten Speiseröhrentransplantaten. Zbl. Chir. *83*, 2071. — 14. ПЕТРОВСКИЙ, Б. В. : (1948) Значение отечественных хирургических школ в развитии хирургии пищевода. Хирургия *24*, 9, 28. — PETROVSKIJ, B. V. : (1953) A cardia és nyelőcsődaganatok sebészete. Egészségügyi Kiadó, Budapest. — 15. REMINE, W. A., GRINDLAY, J. H. : (1954) Skin-Lined Omentum and Plastic Sponge Tubes for Experimental Choledochoduodenostomy. Arch. Surg. *69*, 255. — 16. ROB, C. G., BATEMAN, C. H. : (1949) Reconstruction of the Trachea and Cervical Oesophagus. Brit. J. Surg. *37*, 202. — 17. RÓTH, M., HARKÁNYI, I., TÓTH, J. : (1954) Kísérletes nyelőcsőpótlás műanyagcsővel. Magy. Sebészet *3*, 184. (Experimental Replacement of the Oesophagus with Plastic Tube.) — 18. RUBÁNYI, P.: (1952) A nyelőcső anastomosisai a cardia jóindulatú szűkületei esetén. 1951. Congress of Hungarian Surgeons, Egészségügyi Kiadó, Budapest, p. 14. (Oesophageal Anastomosis in the Cases of Benign Stricture of Cardia.) — 19. SZÁNTÓ, GY. : (1952) Nyelőcsőplasztika intrathoracalisan a nyakra felvezetett vékonybélkaccsal. 1951. Congress of Hungarian Surgeons. Egészségügyi Kiadó, Budapest. p. 19. (Oesophagoplasty with Jejunum Pulled up onto the Neck Intrathoracally.)

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ВНУТРИГРУДНАЯ ЗАМЕНА ПИЩЕВОДА КОЖНОЙ ТРУБКОЙ

Л. Е. САБО, ДЬ. ТОМПА и Г. БАКО

Авторы в опытах на животных сшивали полную толстую кожу брюшной стенки в трубку, обращая эпителий во внутрь, и пересаживали ее в большой сальник. 3—6 недель после имплантации они прилипшую кожную трубку подняли при помощи сальниковой ножки трансдиафрагмально в грудную полость и заменили таким образом иссеченную часть пищевода. Кожная трубка сраслась с пищеводом, но она сморщивалась. Вследствие отсутствия перистальтики и давления внутри просвета дистальная линия шва суживалась. Методом авторов можно добиться лучших результатов, чем заменой пищевода трубкой из пластмассы или лиофилизированным пищеводом. Это более надежный метод, чем трансплантация свободной кожной трубки, однако, вопрос сегментарной замены пищевода при помощи этой методики еще не следует считать разрешенным. Авторы того мнения, что для внутригрудной замены пищевода пригоден только орган, который соответствующей перистальтикой своей мышечной стенки и надлежащим внутрипросветным давлением способен продвигать пищу также через нижнюю линию анастомоза.

EXPERIMENTELLE INTRATHORAKALE ÖSOPHAGUSPLASTIK MITTELS HAUTROHR

L. E. SZABÓ, GY. TOMPA und G. BAKÓ

In Tierversuchen wurde ein von der Bauchwand entnommener volldicke Hautrohrlappen — mit dem Epithel nach innen — in das grosse Netz implantiert. 3—6 Wochen nach der Implantation wurde das haftende Hautrohr am Netzstiel durch das Zwerchfell in die Brusthöhle hinaufgebracht und damit der herausgeschnittene Teil der Spieseröhre ersetzt. Das Hautrohr verheilte zwar mit der Spieseröhre, erlitt aber Schrumpfung. Infolge der fehlenden Peristaltik und des intraluminalen Druckes hatte sich die distale Nahtlinie verengt. Mit der beschriebenen Methode konnten zwar bessere Ergebnisse erzielt werden, als durch Ersetzung des fehlenden Teiles der Speiseröhre mit einem Kunststoffrohr, oder lyophilisierter Speiseröhre, und kann auch zuverlässiger durchgeführt werden, als die Transplantation eines freien Hautrohrs, doch kaum die segmentale Ösophagusplastik mit beschriebenen Methode noch nicht als gelöst betrachtet werden — zu diesem Zweck scheinen zu sein, nur solche Organe geeignet, die durch entsprechende Peristaltik ihrer muskulösen Wand und durch entsprechenden intraluminalen Druck imstande sind, die Nahrung über die untere Anastomose zu befördern.

Dr. László E. SZABÓ Budapest, VIII. Üllői út 78., Hungary
Dr. Gyula TOMPA, Dr. Géza BAKÓ Debrecen, 12. 2 sz. Sebészeti klinika, Hungary.

Experimental Embryology Laboratory, Timişoara (Director: Prof. B. MENKES), Scientific Basis of the Academy of the Rumanian People's Republic

ON THE ROLE OF THE REACTIVITY OF THE INFECTED ORGANISM IN THE DEVELOPMENT OF TUBERCULOSIS

(STUDIES ON EMBRYONIC TISSUES)

I. SÁNDOR

(Received July 31, 1958)

The aim of this paper is to analyse the morphogenesis of tuberculosis, as an expression of the reactivity of the infected organism. Studies on the tuberculous changes in connection with the consecutive reaction forms of embryonic evolution shed light on the influence of reactivity on the pathological process. On the other hand, the fact that tissues of different reactivity are present within the same embryonic organism, makes it possible to investigate the connection between pathological changes and tissue reactivity.

To study the reactivity to infection, the embryonic complex was infected with Koch bacilli of the human, bovine and avian type, respectively. According to MENKES, the embryonic complex consists of the body of the embryo with all its appendages, with all its living environment. This concept includes the maternal organism as well; as we shall, however, deal with avian embryos, the term embryonic complex will mean only the embryo and the structures included in the egg.

A total of 297 white Leghorn and Plymouth chicken embryos was studied in 32 series. Bacterial infection of the hen's egg and of the avian embryo complex has extensively been studied, under both artificial and natural conditions [2—5, 14—23, 27, 31—33, 35, 36]. There seems to be general agreement in that the pathogens may penetrate the intact shell before or after the laying of the egg. This view is of particular biological significance, because it infers that the embryonic complex, which repeatedly contacts various pathogens during its phylo- and ontogenesis, would in some way adapt itself to the unusual circumstances created by the presence of the pathogen. Among others, the presence of one or more bactericidal factors in the egg white seems to corroborate this view. This adaptation develops probably in the most superficial living layers of the embryo complex, which are most exposed to contact with external pathogenic factors.

The few studies on the tuberculous infection of the embryo complex were focussed not so much on the reactivity of embryonic tissues, as on the circumstances of bacterial growth and the effects of certain drugs, and most of the morphological investigations on the chorio-allantoic membrane [1, 5, 13,

15, 19, 21—24, 28, 30]. These investigations yielded the following general conclusions:

(i) The chicken embryo complex (used by most workers) can be infected with all of the more important types of *Mycobacterium tuberculosis.*

(ii) The site of tuberculous changes depends to a certain degree on the mode of infection.

(iii) The nature and extent of changes are more or less influenced by the type, quantity and virulence of the pathogenic agent, though there is also some contradictory evidence as to the role of virulence.

(iv) The most marked changes occur in the chorio-allantoic membrane, as well as in the liver and spleen.

(v) The changes in the chorio-allantoic membrane are partly mesenchymal (infiltrations, foci, etc.) and partly ectodermal (epithelial proliferation, etc.) The presence of giant cells is characteristic. In the internal organs the changes are usually non-specific, consisting mainly of infiltration and necrosis.

6. The tuberculous changes develop much faster in the embryo than in the adult organism.

7. Infection is most successful when carried out on the 10th to 12th day of incubation.

8. According to certain authors, the nature of the tuberculous process is influenced also by the species of bird used.

Methods

1. *Direct infection of the chorio-allantoic membrane.* In one case minced tissues from a tuberculotic guinea pig were used. In other cases suspensions of *Mycobacterium tuberculosis* (about 1 mg/ml physiologic saline), or minced chorio-allantoic membrane soaked in the suspension were employed. In every case the chorio-allantoic membrane was infected after 7 or 8 days of incubation.

2. *Direct infection of the embryo* was carried out according to MENKES [27], placing a piece of chorio-allantoic membrane soaked in the *Mycobacterium tuberculosis* suspension on the neural tube opened on the third day of incubation.

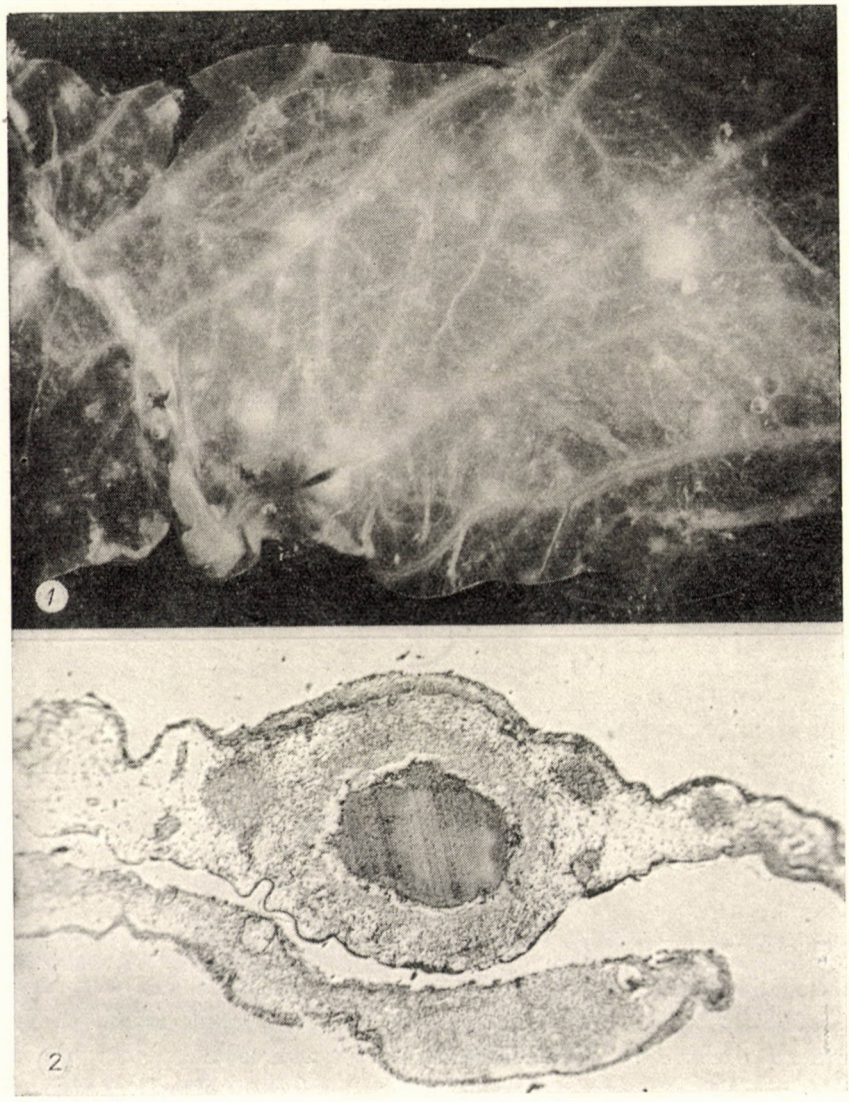
3. *Intraamniotic infection by injuring the body of the embryo.* On the fourth day of incubation a suspension of Koch bacilli was injected into the amniotic sac, afflicting with the tip of the needle on injury at the caudal end of the embryo.

4. *Intravenous infection.* The suspension of *Mycobacterium tuberculosis* was injected into the allantoic vessels of 12—13 day old chicken embryos, by the slightly modified technique of EICHHORN.

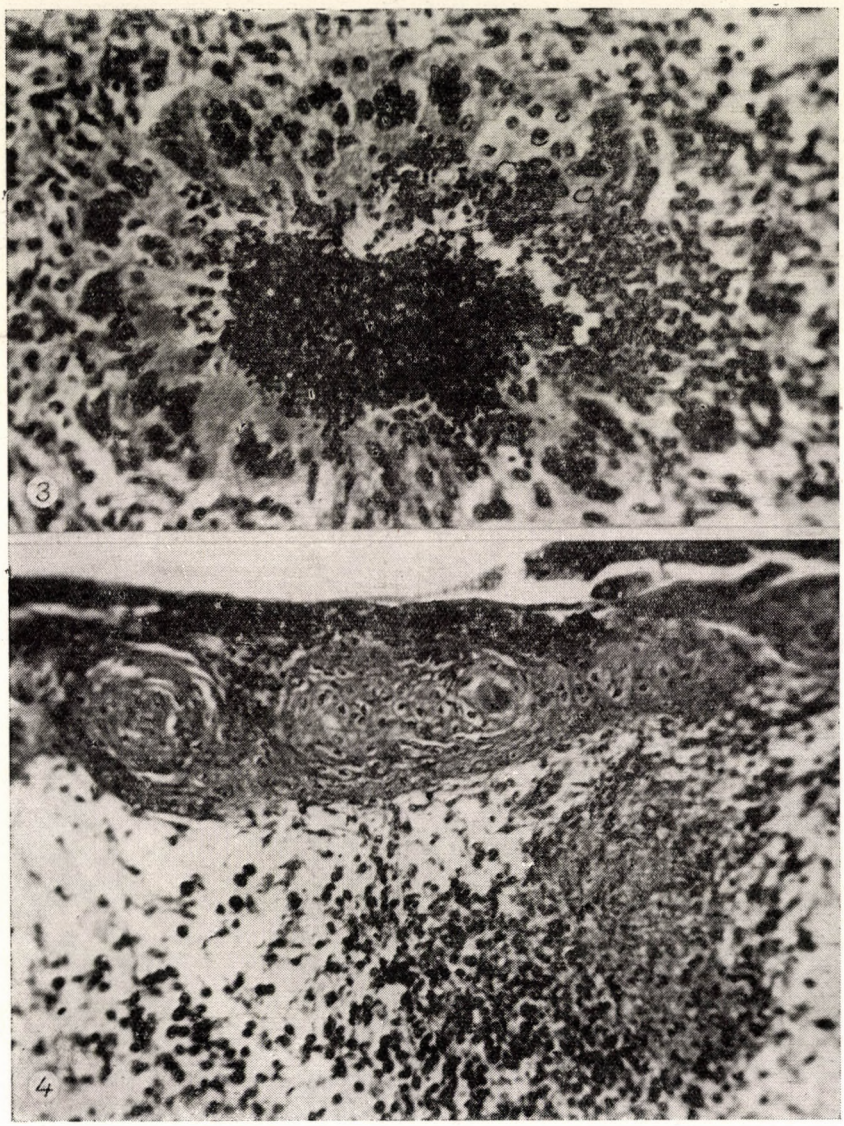
The embryos were worked up 6, 7, 8, 9, and 11 days after infection in case 1., 6 to 16 days after infection in case 2., 15 days after infection in case 3. and 6, 7, and 8 days after infection in case 4. The specimens were fixed in Susa's solution or in 4 to 5 per cent formol. The embryos were usually examined every day, by the naked eye or under a binocular lens. In some cases smears were made from the blood taken from the still beating heart, immediately after breaking up the shell, and were stained according to PAPPENHEIM, or with haematoxylin-eosin. The histologic sections were stained with haematoxylin-eosin and by a Ziehl—Neelsen technique adapted to staining tissues. Silver impregnation according to GÖMÖRI and PAPP was also carried out in some cases. Histologic sections and blood smears from normal embryos of the same age were used as the control specimens.

Results

1. Direct infection of the chorio-allantoic membrane with tuberculous guinea pig tissues. The typical changes developed in about 10 days. Unevenly distributed, white foci appeared on the chorio-allantoic membrane, which turned opaque and became oedematous. Under the microscope, infiltrations and foci, composed mainly of eosinophile cells, were seen. In the more advanced stage the foci contained polynuclear giant cells and necrosed areas *(Figs 1, 2, 3).*

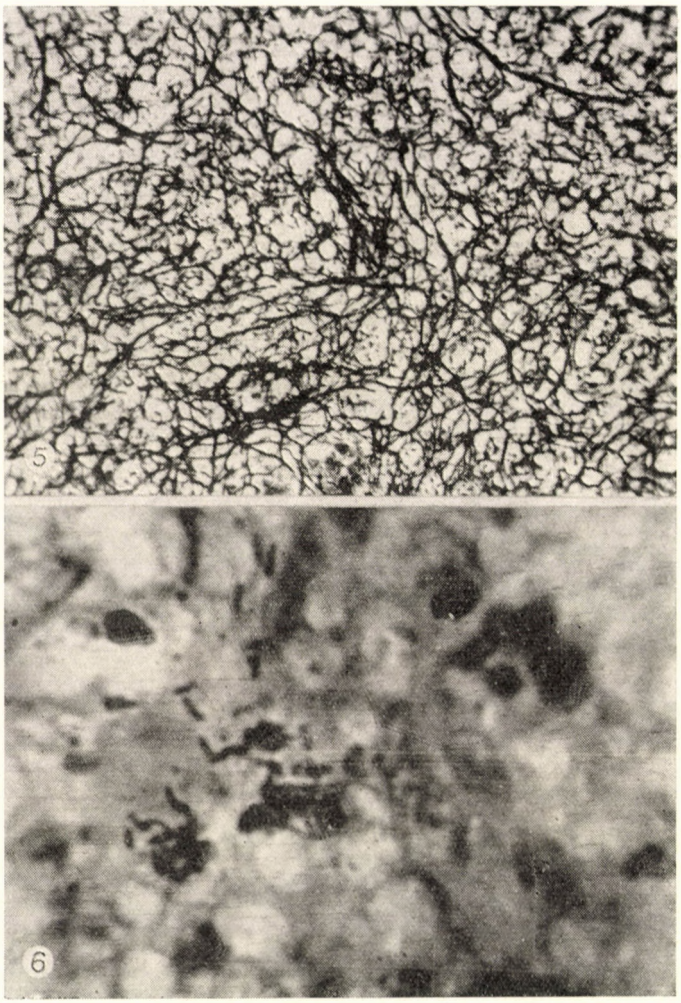


Figs. 1—2



Figs. 3—4

The inflammation was accompanied by an epithelial reaction. The ectodermal epithelium became multi-layered and sometimes cornified (metaplasia). At sites, epithelial bundles penetrated deep into the mesenchymal tissus of the membrane *(Fig. 4)*. In the inflammatory changes a considerable increase of the argyrophilic fibre ground substance was visible *(Fig. 5)*. Large numbers of Koch bacilli were present in the inflamed tissues *(Fig. 6)*.



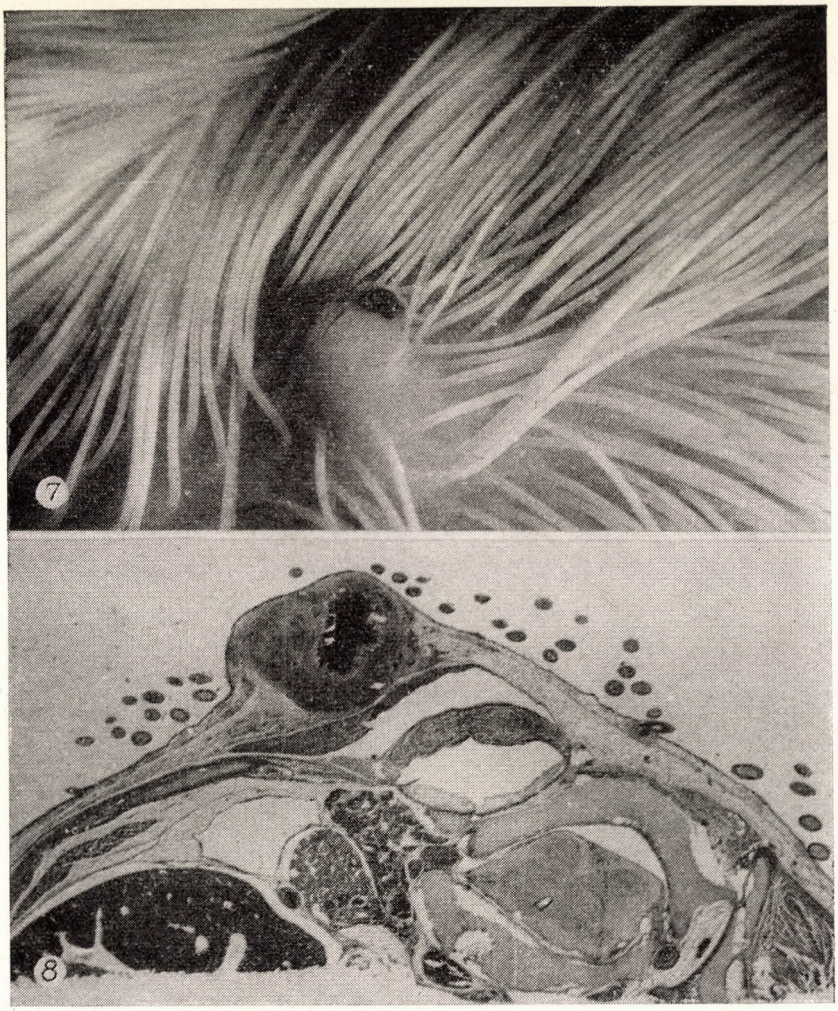
Figs. 5—6

Thus, the tissues of the chorio-allantoic membrane develop marked changes in response to the implantation of heterogenous infected tissues.

2. Direct infection of the chorio-allantoic membrane with a suspension of Mycobacterium tuberculosis or with infected membrane. The first changes appeared 4 to 5 days after infection, to become more and more marked subsequently. Essentially, the same focal changes developed as described above. Under the microscope, infiltrations, foci of similar nature, eventually necrotic changes and a few polynuclear giant cells were visible.

The epithelium showed diffuse metaplasia, which was less marked than in the former case. Sometimes small epithelial processes penetrated deep into

the mesenchyma. In the inflamed tissue the number of argyrophilic fibres was markedly increased and numerous Koch bacilli could be found. The internal organs exhibited no particular changes.

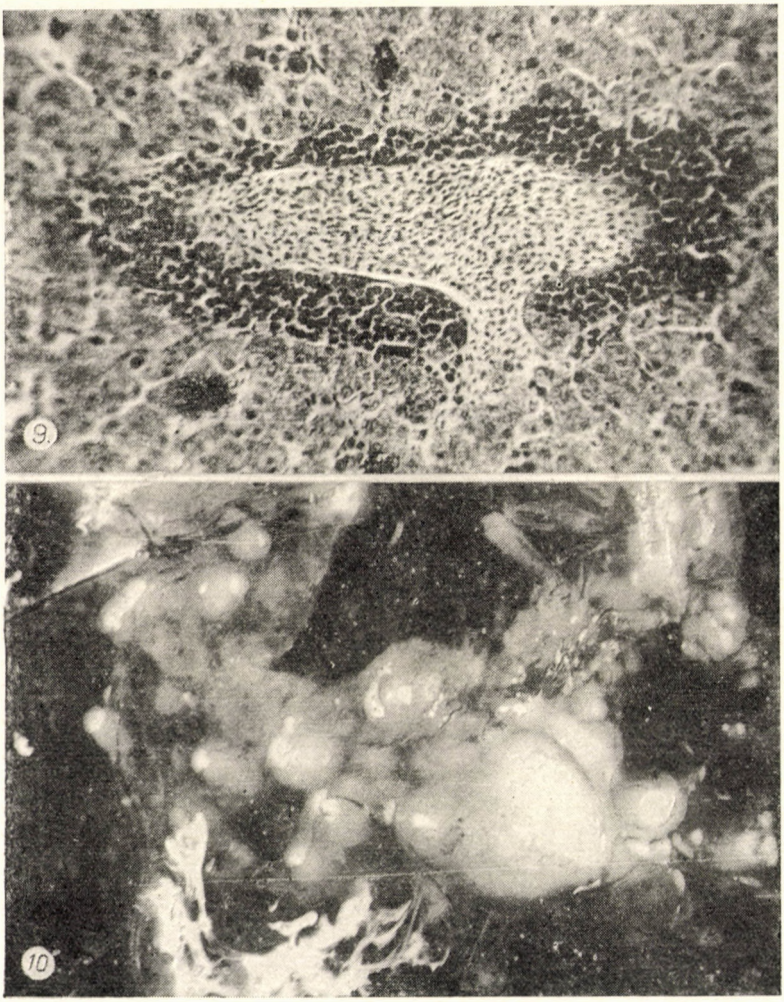


Figs. 7—8

Thus, the tissue of the chorio-allantoic membrane develop diffuse and marked changes in response to direct infection by various methods.

3. *Direct infection of the embryo.* In single cases circumscribed foci, similar in gross and microscopic appearance to those described above, were visible at the site of infection *(Figs. 7, 8)*. Except for a few perifocal infiltrations, there was no evidence of a spread of the process. These infiltrations were

often the sole changes, the skin and its epithelium showing none whatever. In some cases perivascular infiltrations composed of round cells or eosinophile cells were present in the liver, kidney, and lungs *(Fig. 9)*.



Figs. 9—10

The chorio-allantoic membrane showed changes similar to those found in the formed series. The changes were fully developed about 10 days after infection. The membrane was gradually thickened, turned opaque, and there was evidence of a circulatory disturbance. Some foci attained a considerable

size and even formed conglomerates *(Fig. 10)*. No epithelial response was visible even in the presence of a very intense inflammatory reaction, except when the epithelium had been infected directly. In the affected areas of the embryo, the number of argyrophilic fibres had increased and Koch bacilli were demonstrable.

The other annexes (yolk sac, amnionic sac) exhibited no marked changes.

Thus, under the same experimental conditions, within the same embryonic complex and at the same time, the various parts of the complex respond differently to the same pathogenic agent, in the present case to *Mycobacterium tuberculosis*. The response of the embryonic body is weak, local or totally absent, whereas that of the chorio-allantoic membrane is diffuse and marked.

4. Intra-amniotic infection, with injury to the embryo. Although a few embryos were only involved in this series, it was apparent that also on this kind of infection the changes develop in the first place in the chorio-allantoic membrane. They were essentially the same as those described above. In the body of the embryo there were only non-specific perivascular infiltrations, mainly in the liver.

5. Intravenous infection. No changes were usually demonstrable in any part of the embryonic complex 6 to 8 days after infection. In some cases a slight infiltration appeared in the chorioallantoic membrane at the site of the injection and mild perivascular infiltration in some viscera.

Biological tests were carried out to demonstrate the presence of virulent tubercle bacilli. Guinea pigs or rabbits were inoculated with the bacillus contained in homogenized embryonic tissue, whereafter typical, rapidly spreading tuberculous changes developed.

In a few cases living chicken were obtained from the infected eggs. As determined 4, 8, 22 and 23 days after hatching, productive, circumscribed foci were found in the liver, spleen and lungs. These were similar to the usual tuberculous changes. In some instances necrosis was also noted *(Fig. 11, 12)*.

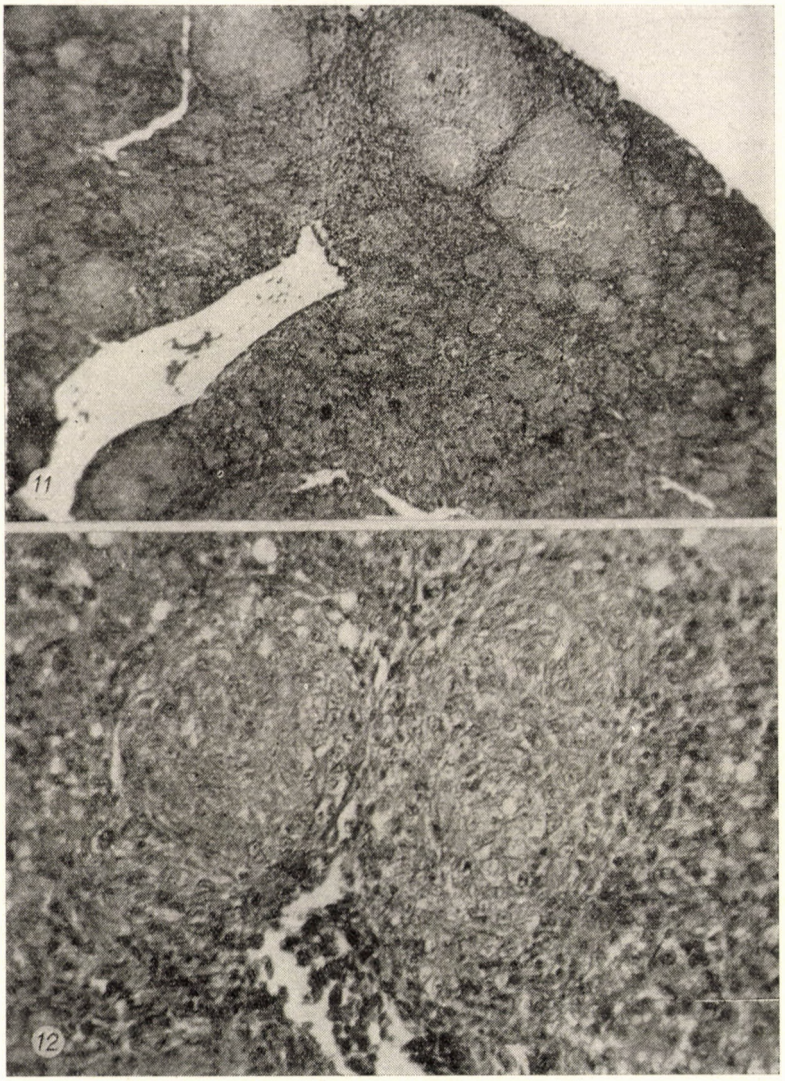
6. Morphology of the blood from normal and infected embryos. Comparative analysis of the differential blood counts of normal and infected embryos aged 18, 19 and 20 days showed the following changes for the infected embryos:

a) a relative decrease in the number of eosinophile meta- and promyelocytes;

b) a marked relative increase in the number of pseudoeosinophile (neutrophile) metamyelocytes;

c) a marked decrease in the relative lymphocyte (and sometimes promyelocyte) count.

These changes varied in degree. The erythrocyte changes were less marked only in some cases of intravenous infection was there a slight increase in the number of young forms.



Figs. 11—12

Discussion

I

Our investigations have elucidated several phenomena of the development of tuberculosis in the embryo complex. Some of the findings agree with the data in the literature. This applies to certain of the fundamental changes caused by tuberculous infection, to the specific reactions of the epithelium, as well as to the relative incidence of changes in the liver and spleen.

II

The other findings are somewhat at variance with the published evidence. From our few observations it seems that the type of the pathogenic agent is not of decisive significance from the point of view of morphological changes. This applies in particular to the "characteristic" difference claimed by MOORE to exist between the actions of human and bovine types. We are also unable to agree with the view that the optimum time for infection is the 12th day of incubation, as attained with reproducible and characteristic results with early infection.

The term "giant cell of the Langhans type" is used by many authors to denote the giant cells arising in the embryo as a result of tuberculous infection. We think that these giant cells differ in type, at least morphologically, from those seen in human tuberculosis. This applies to the shape of such giant cells (symplasts), to the localization of nuclei, etc. In our studies in guinea pigs the giant cells produced by tuberculous infection were morphologically different from the Langhans cells. As the shape or morphogenesis express the reactivity of the living substrate, these morphological differences indicate a difference in reactivity between the reacting organisms. It is interesting that the giant cells occur usually in the proximity of necrotic foci, sometimes in radial distribution. We have seldom found giant cells in the changes present in the body of the embryo, although such cells were frequently found by some authors.

In contrast with CANAT and OPIE, we have not observed a reaction of the embryonic epithelium in response to direct infection.

As regards the term "caseation" used by some authors to denote the necrotic process, we agree with the considerations put forward by LEE and STAVITZKY. In fact, the necrosed foci observed by us were markedly different from the usual pattern of caseous necrosis. The necrosed mass staining a dark red and containing cellular detritus and sometimes erythrocytes cannot be identified with tuberculous caseation. It has been suggested recently that caseation would be a morphological manifestation of tuberculous hypersensitivity. According to present knowledge, it is hardly justified to speak about an allergic reaction during embryonic life.

Finally, one is not fully justified to use the term "tubercle" to denote tuberculous changes in the embryo. The inflammatory foci observed considerably differ in both composition and structure from the human tubercles. For example, there occurs no lymphatic reaction. This fact alone makes it clear that the specific reactivity of the substrate is of a decisive importance in the development of morphological changes. It is obvious that the specific actions so often claimed for certain components of the tubercle bacillus (for instance, a mobilization of lymphocytes) can take effect only in the presence of adequate reactivity.

III

Our experiments have elucidated certain aspects of the problem investigated. From the point of view of methodology it is believed to be significant that we have used relatively small numbers of bacilli for infection ; this is thought to have certain advantages. Moreover, we have ensured a prolonged course of the tuberculous process by carrying out infection on the third days. Further, by means of experimental myelorachischisis the embryo was infected directly.

The following of our results should be emphasized.

(i) The tuberculous infection of the chick embryo produces an ectodermal epithelial reaction in the chorio-allantoic membrane and a reaction in the embryonic mesenchyma.

A) The epithelial reaction is composed of two phenomena.

a) A simple, non-specific metaplasia, which develops in response to various external effects and which corresponds to the adaptation that had developed on the chorio-allantoic membrane, as the most superficial living layer of the embryo complex.

b) A considerable non-specific epithelial reaction, which leads to a deep invasion by epithelial cells and to the development of epithelial islets and pearls. This seems to be the response to both the implanted tissue and the pathogenic agent. The most marked reaction of this type was characteristically produced by the implantation of infected tissue from another species (guinea pig). Similar observations have been made in connection with the transplantation of certain malignant tumours [25].

When infection had been carried out on the third day, *i.e.* before the development of the allantoic sac, the ectodermal epithelium of the chorio-allantoic membrane showed no substantial changes, despite the subsequent development of marked focal changes. The reactivity of the membrane growing in an infected medium seems to be altered in a short time. This is only natural in view of the extreme plasticity peculiar to embryonic tissues.

B) The epithelium or skin of the embryo, unlike the ectodermal epithelium of the chorio-allantoic membrane, exhibits no substantial reactions.

C) Notwithstanding the time of infection, the embryonic mesenchyma of the chorio-allantoic membrane responds with inflammatory infiltrations and with the development of foci. Necrosis and the appearance of giant cells are characteristic features. Likewise, there is a remarkable increase in the argyrophilic ground substance. The reaction is usually diffuse.

D) The mesenchymal response of the embryonie body is circumscribed. In our opinion, the focus which develops at the site of infection originates mostly from the implanted chorio-allantoic tissue and not from the organism's own tissues.

(ii) Like our previous experiments with malignant tumours [25], the present ones, too, showed that the reactivity of the body of the embryo differs morphologically from that of the chorio-allantoic membrane. This difference is related also to certain general biological and pathological laws.

A) It has been proved once again that the development of a pathological change (in the present case, of the specific inflammation) depends greatly on the reactivity of the substrate. Although the pathogenic agent is present throughout the embryo, the changes develop selectively, in accordance with the reactivity of the various parts of the embryo complex.

B) Our results suggest that (at least in our cases) reactivity is greatly influenced by certain local, cellular factors. Otherwise it would be rather difficult to explain the difference in reactivity between the body of the embryo and the chorio-allantoic membrane. Local factors, especially in the non-innervated chorio-allantoic membrane, may have an important role to play.

IV

The intravenous infection experiments showed, in agreement with the data published by LEE and STAVITZKY, that specific inflammatory changes are absent, even though virulent pathogens were demonstrated in the embryo by biological tests. One feels tempted to claim, especially in view of the results obtained by myelorachischisis, that the body of the embryos were in some measure immune to the tubercle bacillus. However, it would be premature to draw a final conclusion. According to our observations, the tuberculous changes develop fully in about 9 to 10 days in the embryo complex. However, the intravenous injections administered on the 12th or 13th day, only 8 to 9 days are left from the hatching time. Experiments are in progress to prolong the development of intravascular infection and it is hoped that their results will bring us nearer to the solution of this problem.

The tuberculous changes of productive nature found in the viscera of hatched chicks should be interpreted with caution. Hatching seems suddenly to alter the reactivity of the organism and, as a result, the form of systemic reaction. The occurrence of such an alteration is quite probable. According to data in the literature [5], by the end of embryonic growth the inflammatory reaction becomes similar to that seen in the post-embryonic stage. Nevertheless, the small number of our observations does not allow for final conclusions.

Comparative studies on normal and infected embryos have shown that in the period tested the haematological response of the embryo is similar to that occurring in human and animal tuberculosis. Neutrophilia and lymphopenia occur in man and experimental animal alike, according to data in the literature and our own observations.

Summary

1. The reaction of the chick embryo complex to tuberculous infection, as induced by different methods, has been investigated.

2. The morphological response of the chick embryo complex exhibited the following features.

a) Epithelial reaction of the chorio-allantoic membrane. This is either a simple, non-specific response elicited by the widest variety of external effects, or a more marked reaction, involving epithelial invasion and development of islets of epithelium. No epithelial reaction takes place when the chorio-allantoic membrane has developed in an infected medium.

b) The epithelium of the body of the embryo does not respond to direct mechanical intervention or to local inflammatory changes ; even the epithelial appendices develop normally.

c) Reaction of the mesenchymal tissue of the chorio-allantoic membrane. This involves the formation of infiltrations and foci of inflammation, necrosis and appearance of giant cells. The reaction is marked and diffuse.

d) The local inflammatory focus which develops at the site where the embryo has been directly infected is apparently due to the implanted tissue. A slight infiltration of the mesenchyma occurs exclusively in the proximity of the focus.

e) Intravenous infection produces no specific changes, only non-specific infiltrations. The process develops within a short time and therefore the problem requires further investigation.

f) Productive focal changes have been found in the viscera of chicken, on the 4th to 23rd days after hatching, following infection with tubercle bacilli during embryonic life. This phenomenon suggests that hatching may suddenly alter systemic reactivity.

g) The differential blood count from infected embryos showed marked changes on the 18th, 19th and 20th days of incubation. The number of neutrophile (pseudoeosinophile) leucocytes increased, that of the eosinophils and lymphocytes decreased.

3. The giant cells found in the tuberculous changes of the embryonic complex differ morphologically from the giant cells of the Langhans type.

4. The necrotic changes in the embryonic complex differ from the usual pattern of caseation.

5. The cellular composition of inflammatory foci is different from that of tubercles. Epitheloid cells and lymphocytes are usually absent and mainly eosinophilic cells (mono- or polynuclears) are found in their place.

6. A marked difference in reactivity is observable, especially between the body of the embryo and the chorio-allantoic membrane. This corroborates the earlier findings of MENKES et al. Under the same conditions of infection the chorio-allantoic membrane responds markedly and diffusely, whereas the response of the body is weak and circumscribed. The marked reactivity of the chorio-allantoic membrane is apparently due to a phylogenetic adaptation to repeated external injuries.

7. The different changes found in the tissues of different reactivity corroborates the significant role of the substrate's reactivity in the development of a pathological process. Moreover, in regard to the peculiar conditions prevailing in the embryo complex (presence of tissues without innervation, etc.) it seems that local factors, too, may play a role in the response to the pathogenic agent.

REFERENCES

1. BLOCH, F., COSTIL, L. : (1938) Réactions de la membrane chorioallantoide de l'embryion de poulet aux bacilles tuberculeux bovins. C. R. Soc. Biol. (Paris) *128*, 849. — 2. BUDDINGH, J., POLK, A. : (1939) Experimental Meningococcus Infections of the Chick Embryo. J. exp. Med. *70*, 845. — 3. BUDDINGH, J., POLK, A. : (1939) The Pathogenesis of Meningococcus Infection in the Chick Embryo. J. exp. Med. *70*, 499. — 4. BUDDINGH, J., POLK, A. : (1939) A Study of Passive Immunity to Meningococcus Infection in the Chick Embryo. J. exp. Med. *70*, 511. — 5. CANAT, F. H., OPIE, E. L. : (1943) Inflammation in Embryonic Life. Amer. J. Path. *19*, 371. — 6. CALMETTE, A. : (1936) L'infection bacillaire et la tuberculose. Paris. — 7. COSTIL, L., BLOCH, F. : (1938) Réaction de la membrane chorioallantoide de l'embryon de poulet au BCG. C. R. Soc. Biol. (Paris) *129*, 1094. — 8. COSTIL, L., BLOCH, F. : (1938) Réaction de la membrane chorioallantoide de poulet aux bacilles tuberculeux humains et aviaires. C. R. Soc. Biol. (Paris) *128*, 40. — 9. EGGERTH, A. H., DRESHER, E., MC OSKER, V. C. : (1948) Infection of Chick and Duck Embryos with Tubercle Bacilli. Amer. Rev. Tuberc.

57, 632. — 10. EMMART, F. W., SEIBERT, F. B.: (1945) The Effect of Tuberculous and Sensitized Sera and Serum on the Development of Tubercles in the Chorioallantoic Membrane of the Chick. J. Immun. *50*, 143. — 11. EMMART, F. W.: (1945) The Tuberculostatic Action of Streptothricin and Streptomycin with Special Reference to the Action of Streptomycin on the Chorioallantoic Membrane of the Chick Embryo. Publ. Hlth Rep. *60*, 1415. — 12. EMMART, F. W., SMITH, M. T.: (1943) The Chorioallantoic Membrane of Chick Embryo as a Medium for Testing the Virulence of Tubercle Bacilli. Amer. Rev. Tuberc. *47*, 427. — 13. FITE, G. L., OLSON, B. J.: (1944) Infectivity of Mycobacteria for Chorioallantoic Membrane of Chick Embryo. Publ. Hlth Rep. *59*, 1943. — 14. FRANCIS, J.: (1946) The Chick Embryo in Chemotherapeutic Research. Proc. Roy. Soc. Med. *34*. — 15. FRANCIS, J.: (1956) The Behaviour of Various Mycobacteria in the Chick and Duck Embryo. Amer. J. Tuberc. *2*, 276. — 16. GALLAWAN, M.: (1937) Encephalitis and Meningitis in the Chick Embryo Following Inoculation of the Chorioallantoic Membrane with H Influenzae. Amer. J. Path. *13*, 911. — 17. GALLAWAN, M., GOODPASTURE, E. W.: (1937) Infection of Chick Embryos with H. pertussis, reproducing Pulmonary Lesions of Whooping Cough. Amer. J. Path. *13*, 927. — 18. GOLDSWORTHY, N. E., MOPPETT, W.: (1935) The Reaction of the Chorioallantoic Membrane of Chick to Certain Physical and Bacterial Agents. J. Path. Bact. *41*, 529. — 19. GOODPASTURE, E. W.: (1938) Some Uses of the Chick Embryo for the Study of Infection and Immunity. Amer. J. Hyg. *28*, 111. — 20. GOODPASTURE, E. W., ANDERSON, K.: (1937) The Problem of Infection as Presented by Bacterial Invasion of the Chorioallantoic Membrane of Chick Embryos. Amer. J. Path. *13*, 149. — 21. GROSSFELD, I.: (1938) Handbuch der Eierkunde, Berlin. — 22. KNOTHE, M.: (1952) Das Verhalten von aeroben Bakterien in bebruteten Huhnereiern. (I—II). Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. *158*, 6, 383. — 23. JACOTOT, H.: (1953) Sur la permeabilité de la membrane coquillère de l'oeuf de poule à quelques agents microbiens (inoculations dans la chambre à air). Ann. Inst. Pasteur *84*, 614. — 24. LEE, H. F.: (1949) Use of the Chick Embryo for Preliminary in vivo Evaluation of Tuberculostatic Substances. Ann. N. Y. Acad. Sci. *52*, 692. — 25. LEE, H. F., STAVITZKY, A. B.: (1947) Intravenous Infection of the Chick Embryo with Tubercle Bacilli (Inhibitory Effect of Streptomycin). Amer. Rev. Tuberc. *55/3*, 262. — 26. MOORE, M.: (1942) The Chorioallantoic Membrane of Chick Embryos and Its Response to Inoculation with Some Mycobacteria. Amer. J. Path. *18*, 827. — 27. MENKES, B.: (1958) Cercetări de embriologie experimentală. Ed. Acad. R. P. R. București. — 28. MENKES, B., COTAESCU, E., DELEANU, M., OTETEA, G.: (1956) Cercetări asupra creșterii unor tumori maligne transplantate pe corpul sau pe membrana chorionalantoidă a embrionului de găină, și asupra reacției epiteliilor și mezenchimului embrionar in prezența acestor transplantate Bul. Șt. Acad. RPR. Secția Șt. Med. *8*, 1. — 29. MENKES, B., SÁNDOR, S.: (1956) Cercetări asupra reactivității complexului embrionar la infecția tuberculoasă. Studii și Cercetări Șt. Acad. RPR. Baza Timișoara. *3*, 3. — 30. PANDIT, C. G., SANJIVA RAO, SHORTT, H. E.: (1938) Response of the Chorioallantoic Membrane of the Developing Chick Embryo to Inoculation with Various Substances, with Special Reference to B. proteus X_{19}. Indian J. Med. Res. *25*, 595. — 31. RIST, N.: (1948) Pathologie et thérapeutique expérimentale de la tuberculose. Bibl. Tuberculosea Suppl. 55. Schweiz. Z. Tuberk. — 32. SANDREUTER, A.: (1951) Vergleichende Untersuchungen über die Blutbildung in der Ontogenese von Haushuhn und Star. Suppl. I. ad Vol. XI. Acta anat. (Basel). — 33. SCHURMANN, R.: (1952) Zur Histogenese des Tuberkels in der Chorioallantois Membran des Huhnchens. Virchows. Arch. path. Anat. *321*, 325. — 34. ТЕБИАКИА, А. Э.: (1955) Куриний эмбрион как модель для оценки лечебного действия антибиотиков при экспериментальной холере. Ж. Микро. Эпид. и Иммун. *7*, 25. — 35. ТОКИН, Б. П.: (1955) Иммунитет зародышей. Изд. Ленингр. Унив. — 36. TSUN TUNG: (1945) Experimental Production and Chemoprophylaxis of Corynebacterium diphtheriae Infection in the Chick Embryo. Amer. J. Hyg. *41*, 57. — 37. WEIL, A. J., GALL, I. S.: (1941) Chemotherapeutic and Immunotherapeutic Testing of Eberthella typhosa in the Developing Chick Embryos. J. Immun. *41*, 445. — 38. WEIL, A. J., VOLENTINE, J. A.: (1940) Infection of the Developing Chick Embryo with Dysentery bacilli Proc. Soc. exp. Biol. N. Y. *44*, 160.

О ПРОБЛЕМЕ РЕАКТИВНОСТИ ЗАРАЖЕННОГО ОРГАНИЗМА В РАЗВИТИИ ТУБЕРКУЛЕЗА

Й. ШАНДОР

Реакция эмбрионального комплекса цыплят в случае туберкулезного заражения проявляется в характерных изменениях. Эпителиальная реакция хорион-аллантоидной мембраны либо простая, неспецифическая, возникающая на многочисленные внешние воздействия (утолщение, метаплазия), либо она более выраженная, сопровожденная

разрастанием эпителия вглубь, образованием эпителиальных островов, и со сильной метаплазией. В противоположность этому эпителий зародышевого тела не реагирует даже на непосредственные воздействия, и развивающийся местный очаг не влияет на развитие эпителиальных придатков, или на характер эпителия. В мезенхиме хорион-аллантоидной мембраны развиваются инфильтрации и эозинофильные или же одноядерные круглоклеточные очаги с некрозами и образованием гигантских клеток. Реакция сильная и диффузная. В случае непосредственного заражения тела зародыша, кроме местного воспалительного очага, нельзя выявить значительных изменений. В случае внутривенного заражения (во второй половине инкубации) наблюдаются только небольшие инфильтрации в отдельных внутренних органах, однако, этот вопрос требует еще дальнейших исследований. После туберкулезного заражения во внутренних органах вылупленных цыплят обнаруживаются очаговые изменения продуктивного характера, предположительно в связи с изменением реактивной способности после вылупления. Туберкулезное заражение обусловливает выраженные изменения в картине крови зародышев цыплят (нейтрофильный лейкоцитоз, лимфопения и эозинопения). Образующиеся в зародышевом комплексе гигантские клетки и некрозы отличаются с морфологической точки зрения от гигантских клеток Лангханса и от створаживания. Состав клеток воспалительных очагов до вылупления отклоняется от обычного клеточного состава «бугорков». В пределах зародышевого комплекса наблюдается выраженная разница между реактивной способностью тела зародыша и хорион-аллантоидной мембраной. Выраженная реактивная способность последней развивается по всей вероятности вследствие повторных фило- и онтогенетических встреч с внешними воздействиями. Разница изменений тканей с различной реактивной способностью подчеркивает значительную роль, которую играет реакция субстрата в возникновении патологического процесса.

BEITRÄGE ZUM REAKTIVITÄTSPROBLEM DES INFIZIERTEN ORGANISMUS IN DER ENTWICKLUNG DER TUBERKULOSE

I. SÁNDOR

Die Reaktion des Hühnerembryo Komplexes nach tuberkulöser Infektion manifestiert sich in charakteristischen Veränderungen. Die Epithelreaktion der Chorioallantois besteht entweder in einer einfachen, nicht spezifischen, auf viele äußere Einwirkungen entstehenden Reaktion (Verdickung, Metaplasie), oder sie ist ausgeprägter, und mit Eindringen des Epithels in tiefen Schichten, Entstehen, von Epithelinseln und starker Metaplasie verbunden. Hingegen reagiert das Epithel des Embryokörpers selbst auf direkte Einwirkungen nicht, der sich bildende örtliche Herd beeinflußt nicht die Entwicklung der Epithelanhänge und den Charakter des Epithels. Im Mesenchym der Chorio-allantois entstehen Infiltrationen von eosinophilen bzw. einkernigen Rundzellen, mit Nekrosen und Riesenzellenbildung. Die Reaktion ist diffus und ausgeprägt. Bei direkter Infektion des Embryokörpers können außer dem örtlichen entzündlichen Herd keine wesentlichen Veränderungen nachgewiesen werden. Im Falle intravenöser Infektion (in der zweiten Hälfte der Inkubation) können bloß geringe Infiltrationen in einzelnen Innenorganen beobachtet werden, doch erheischt diese Frage noch weitere Untersuchungen. In den Innenorganen der nach tuberkulöser Infektion geschlüpften Kücken können Herdveränderungen produktiven Charakters nachgewiesen werden, vermutlich im Zusammenhang mit der Veränderung der Reaktionsfähigkeit nach der Schlüpfung. Die tuberkulöse Infektion bedingt eine ausgeprägte Veränderung des Blutbildes der Hühnerembryonen (Neutrophylie, Eosino- und Lymphopenie). Die im Embryokomplex sich bildenden Riesenzellen und Nekrosen unterscheiden sich in morphologischer Hinsicht von den Langhansschen Riesenzellen sowie von der Verkäsung. Die Zellenzusammensetzung der Entzündungsherde vor dem Ausschlüpfen ist von der üblichen Zellenzusammensetzung der »Tuberkeln« verschieden. Innerhalb des Embryokomplexes besteht ein ausgeprägter Unterschied zwischen der Reaktionsfähigkeit des embryonalen Körpers und jener der Chorio-allantois.

Die bedeutende Reaktionsfähigkeit der letzteren entsteht vermutlich infolge des wiederholten phylo- und ontogenetischen Zusammentreffens mit äußeren Einwirkungen. Die Verschiedenheit der Veränderungen von Geweben mit unterschiedlicher Reaktionsfähigkeit bestätigt die bedeutende Rolle, welche die Substratreaktion in der Entstehung eines Krankheitzprozesses spielt.

Dr. István SÁNDOR. Timişoara, Bv. Mihai Viteazul Nº 24.. Romînia.

II. Institut für Pathologische Anatomie (Vorstand: Prof. L. HARANGHY) der Medizinischen Universität, Budapest und Pathophysiologische Abteilung des Korányi-Landesinstituts für Tuberkulose, Budapest

WIRKUNG VON ADRENALIN AUF DIE KANINCHENNIERE

EDITH BEREGI, L. HARANGHY und I. FÖLDES

(Eingegangen am 3. November 1958)

In vorangegangenen Untersuchungen hatten wir nachgewiesen, daß durch Verabreichung von Pilokarpin und Baden in kaltem Wasser bei den mit Pferdeserum sensibilisierten Kaninchen diffuse akute und subakute Glomerulonephritis hervorgerufen werden kann [1]. Vorliegende Untersuchungen verfolgten den Zweck, die Pathogenese der auf diese Weise herbeigeführten Glomerulonephritis nach Möglichkeit zu klären.

Versuchsmethoden und Ergebnisse

Zuerst wünschten wir die Frage zu klären, ob bei der pilokarpinbedingten Nephritis der durch Pilokarpin herbeigeführten Adrenalinmobilisierung eine Rolle zukommt. In diesem Zusammenhang führten wir zwei Versuchsserien durch.

1. 12 Kaninchen im Gewicht von 3000—3500 g wurden an zwei aufeinander folgenden Tagen mit je 2 ml Normalpferdeserum i. v. sensibilisiert und zwei Wochen später die Nebenniere der Kaninchen in zwei Sitzungen exstirpiert. Die linke Nebenniere wurde zwei Wochen nach der rechten entfernt; hiernach erhielten die Kaninchen täglich 1 mg/kg DCA. Diese Menge wurde stufenweise auf 0,5 mg/kg herabgesetzt. Zwei Wochen nach der 2. Operation wurde den Tieren täglich subkutan 0,01 g Pilokarpin verabreicht, und nach der Injektion badeten wir sie, wie in der vorigen Arbeit [1] beschrieben, in kaltem Wasser, und zwar an den ersten beiden Tagen 3 Minuten, am dritten und vierten Tage 5 Minuten und an den folgenden 8 Minuten. Von den 12 Kaninchen gingen 2 nach der ersten Behandlung unter anaphylaxieähnlichen klinischen Symptomen ein. Bei der Sektion sahen wir dementsprechende Veränderungen, die auch vom histologischen Bild bestärkt wurden. Die Behandlungsdauer und zur Entwicklung gekommenen Veränderungen der anderen Kaninchen sind auf Tabelle I angegeben. Ein Kaninchen verendete nach 4, eins nach 6, eins nach 9, eins nach 13 Behandlungen. Im Harn dieser Tiere waren Eiweiß und Erythrozyten erschienen. Bei zwei Tieren war der Reststickstoffwert auf 90 mg% bzw. 69,8 mg% erhöht. Im Harn von 2 der verbliebenen 6 Kaninchen waren am 4—6 Tage Eiweiß, Erythrozyten und Zylinder nachweisbar. Bei einem dieser Tiere betrug der Reststickstoffspiegel 63 mg%, bei den anderen war er normal. Im Harn von 4 Kaninchen wurden keine pathologischen Abweichungen beobachtet und sämtliche 6 Kaninchen nach 18 Behandlungen durch Luftembolie getötet.

Bei der Sektion enthielt die Niere der Kaninchen, die Harnveränderungen zeigten, kleinere und größere fahlbraune, an der Oberfläche punktartige Blutungen, während auf der Schnittfläche die Rindensubstanz verbreitert war. Histologisch sind die Glomerula vergrößert, zellreich geworden, hier und da ist die Basalmembran der Glomerulumschlingen verdickt, die Bowmansche Kapsel enthält Eiweiß, stellenweise ist die Basalmembran der Bowmanschen Kapsel mit Eiweiß durchtränkt, die Epithelzellen der Tubuli sind fein granuliert, in ihrem Lumen befinden sich hyaline Zylinder, das Interstitium ist ödematös verbreitert.

Aus den klinischen und histologischen Beobachtungen geht also hervor, daß sich die Entwicklung der mit unserer Methode herbeigeführten Glomerulonephritis durch bilaterale Adrenektomie nicht verhindern läßt. Die zur Entwicklung gekommene Nephritis entspricht vollkommen dem bereits vorher beschriebenen Bild.

2. Bei der zweiten Versuchsserie gingen wir von der Überlegung aus, daß, wenn die Nephritis durch die pilokarpinbedingte Adrenalinmobilisierung zustande gebracht wird, auch dann Nephritis auftreten muß, wenn wir statt Pilokarpin direkt Adrenalin verabreichen. 17 Kaninchen im Gewicht von 3000—3500 g wurden mit 2×2 ml Normalpferdeserum i.v. sensibilisiert, erhielten drei Wochen später täglich subkutan 0,2 ml 0,1%ige Tonogen-Lösung und wurden nach dem beschriebenen Verfahren gebadet. Von einem großen Teil der Tiere wurde diese Behandlung sehr gut toleriert, ein anaphylaxieähnlicher Schock, der nach Behandlung mit Pilokarpin häufig zu beobachten war, trat niemals auf. Je ein Kaninchen ging nach 10 bzw. 14 Behandlungen zugrunde, ihr Reststickstoffwert betrug 156 bzw. 120 mg%. Die übrigen Tiere wurden nach 16 Behandlungen durch Luftembolie getötet. Der Harn von 10 Tieren enthielt Eiweiß und Zucker, die Reststickstoffwerte sind in Tabelle II angeführt. Der in der Ohrarterie blutlos gemessene Blutdruck war bei 4 Tieren ständig 90—98 mm Hg, während bei den anderen nur vorübergehende Blutdruckerhöhung vorkam. In 5 Fällen waren weder klinische noch anatomische oder histologische Veränderungen nachzuweisen. Die klinischen Befunde der 12 Kaninchen, bei denen wir anatomische und histologische Veränderungen fanden, sind auf Tabelle II zusammengestellt.

Tabelle I

Nr. des Tieres	Behandlungsdauer	Harnveränderung	Reststickstoffwert mg %
1	4*	Eiweiß ++ Sed.: Erythrozyten und Zylinder	40
2	6*	Eiweiß ++ Sed.: Erythrozyten und Zylinder	36
3	9*	Eiweiß ++ Sed.: Erythrozyten und Zylinder	69,8
4	13*	Eiweiß ++ Sed.: Erythrozyten und Zylinder	90
5	18	Eiweiß ∅ Sed.: ∅	45
6	18	Eiweiß ∅ Sed.: ∅	38
7	18	Eiweiß ++ Sed.: Erythrozyten und Zylinder	63
8	18	Eiweiß ++ Sed.: Erythrozyten und Zylinder	40
9	18	Eiweiß ∅ Sed.: ∅	34
10	18	Eiweiß ∅ Sed.: ∅	36

* = verendet

Tabelle II

Nr. des Tieres	Behandlungsdauer	Harnveränderungen	Blutdruck mm Hg	Reststickstoffwert mg %
1	16	Eiweiß op. Zucker ++ Sed. ∅	40	36
2	16	Eiweiß ++ Zucker ++ Sed. ∅	65	45
3	14	Eiweiß ++ Zucker ++ Sed ∅	90	156
4	16	Eiweiß + Zucker ++ Sed. ∅	70	43
5	16	Eiweiß ∅ Zucker ++ Sed. ∅	60	40
6	16	Eiweiß ++ Zucker ∅ Sed. ∅	45	58
7	10	Eiweiß +++ Zucker + Sed. ∅	98	120
8	16	Eiweiß ∅ Zucker ∅ Sed. ∅	50	38
9	16	Eiweiß ++ Zucker + Sed. ∅	95	90
10	16	Eiweiß + Zucker + Sed. ∅	60	38
11	16	Eiweiß ++ Zucker + Sed. ∅	90	63
12	16	Eiweiß ++ Zucker + Sed. ∅	65	45

Bei der Sektion waren die Nieren der Kaninchen Nr. 3, 7 und 9 etwas kleiner als üblicherweise, die der anderen zeigte normale Größe. Die Nieren waren bräunlich-rot, an der Oberfläche der Nieren der Kaninchen Nr. 3 und 7 sahen wir zahlreiche nadelstichgroße, mit einer gelben Flüssigkeit gefüllte Höhlen, an der Nierenoberfläche der anderen Kaninchen einige feinere Eindellungen. An der Schnittfläche war die Grenze zwischen Rinde und Marksubstanz überall deutlich erkennbar und blaßrot. Bei 8 Kaninchen war das Herz vergrößert.

Histologisch sind die Glomerula stellenweise erheblich vergrößert, zellreich, anämisch (Abb. 1); neben ihnen sind geschrumpfte Glomerula anzutreffen. Die Basalmembran der Glomerulumschlingen ist stellenweise verdickt, das interkapillare Bindegewebe hier und da verbreitert. Die Basalmembran der Bowmanschen Kapsel ist an zahlreichen Stellen mit Eiweiß durchtränkt, anderswo bindegewebig verdickt (Abb. 2). Der Hohlraum der Bowmanschen Kapsel ist stellenweise zystisch erweitert (Abb. 3) und enthält Eiweiß, die Glomerula

sind da atrophisch. Besonders auffallend ist diese zystische Erweiterung in der Niere der Tiere Nr. 3 und 7. Neben diesen sind wesentliche Veränderungen an den kleinen Gefäßen nachweisbar. Die Wand der Arteriola afferens ist verdickt, ihr Lumen eingeengt, die Wandverdickung des Vas afferens führte zur Vermehrung des interkapillaren Bindegewebes (Abb. 4). Stellenweise ist in der Wand der Arteriolen und Präarteriolen Hyalinablagerung zu sehen, und das Lumen der Gefäße ist halbmondartig eingeengt (Abb. 5). Die größeren Nierenarterien weisen

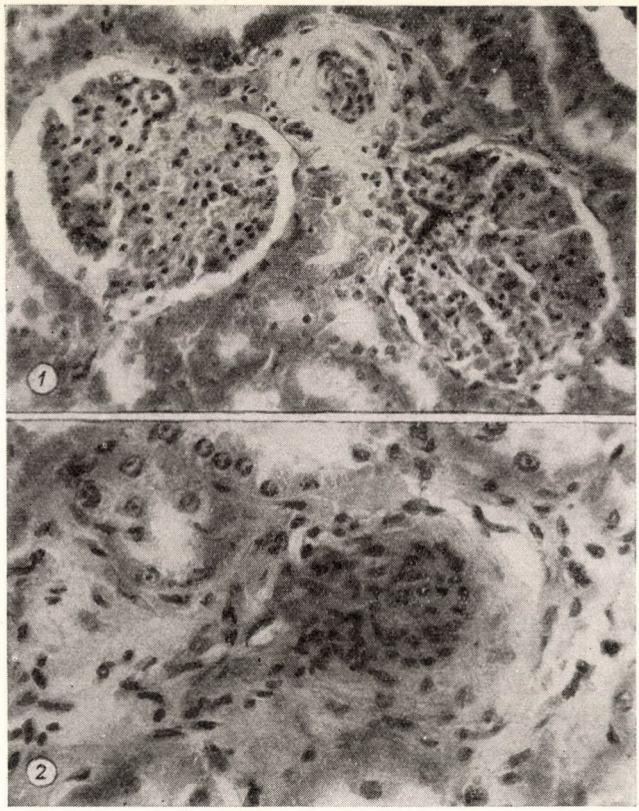


Abb. 1. Neben vergrößerten zellreichen Glomerula ist ein geschrumpfter Glomerulus anzutreffen (H.-E.-Färbung)

Abb. 2. Bindegewebige Verdickung der Bowmanschen Kapsel, welche die Glomerularschlingen komprimiert. Das Lumen des Vas afferens ist eingeengt (H.-E.-Färbung)

keine Veränderungen auf. Die Tubuli sind stellenweise hypertrophisch und hyperplastisch, anderswo atrophisch. An einigen Stellen zeigen die Epithelzellen hyalintropfige Degeneration, während das Lumen der Tubuli Hyalinzylinder enthält. Das Interstitium weist an mehreren Stellen Vernarbung auf.

Auf Grund dieser Befunde konnte festgestellt werden, daß bei den mit Pferdeserum sensibilisierten Kaninchen auf Wirkung des täglich verabfolgten Adrenalins in Kombination mit Baden in kaltem Wasser arteriolosklerotische Nephrosklerose aufgetreten war.

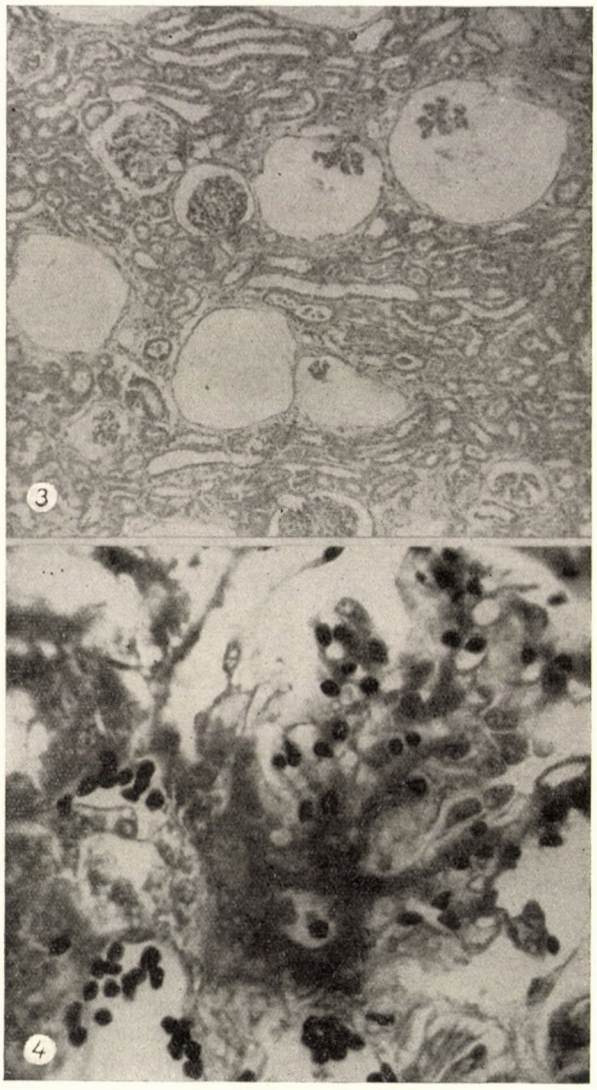


Abb. 3. Die Bowmansche Kapsel von zahlreichen Glomerulen ist zystisch erweitert und enthält Eiweiß (Azan-Färbung nach *Heidenhain*)

Abb. 4. Die Verdickung der Wand des Vas afferens und die Einengung seines Lumens führen zur Vermehrung des interkapillaren Bindegewebes (Färbung nach *Lee—Brown*)

Es schien nicht uninteressant, im weiteren die Frage zu klären, ob es zur Entwicklung der Arteriolenveränderungen aller drei Versuchsbedingungen bedarf. Zu diesem Zweck führten wir zwei Versuchsreihen durch.

a) 5 Kaninchen wurden nach obigem Verfahren mit Normalpferdeserum sensibilisiert und erhielten 3 Wochen später subkutan täglich 0,2 ml 0,1%ige Adrenalinlösung. Die Tiere wurden nicht gebadet; sie tolerierten die Behandlung gut, 1 Kaninchen verendete nach der

12. Behandlung, die anderen wurden nach 16 Injektionen durch Luftembolie getötet. Eiweiß enthielt nur der Harn des spontan eingegangenen Kaninchens, der Reststickstoffwert war bei sämtlichen Tieren normal. Der Blutdruck des nach 12 Behandlungen verendeten Tieres betrug 90 mm Hg, der der übrigen Tiere vor der Tötung 76, 69, 64 und 69 mm Hg.

Bei der Sektion war die Größe der Nieren normal, sie waren bräunlich-rot, an ihrer Oberfläche sah man einzelne feine Eindellungen. Histologisch sind einige Glomerula etwas vergrößert, blutlos, die Basalmembran der Glomerulumschlingen ist verdickt, der Hohlraum der Bowmanschen Kapsel enthält Eiweiß. Nur das Lumen vereinzelter afferenter Arteriolen ist in beträchtlichen Maße eingeengt. Schrumpfende Glomerula sind kaum vorhanden. In den Epithelzellen der Tubuli ist feine Granulation, in ihrem Lumen sind hyaline Zylinder nachweisbar. Die hier anwesenden Veränderungen waren also wesentlich schwächer als die der vorigen Gruppe.

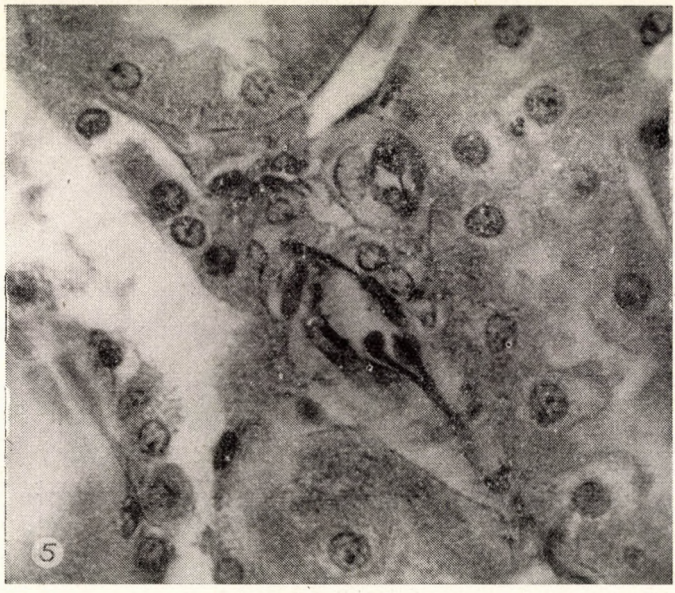


Abb. 5. Hyaline Ablagerung in der Wand einer Präarteriole und erhebliche Einengung ihres Lumens (Färbung nach *Endes*)

b) 6 Kaninchen gaben wir ohne vorherige Sensibilisierung und ohne Baden täglich 0,2 ml 0,1%ige Adrenalinlösung. Von diesen Tieren ging nicht ein einziges spontan zugrunde, ebenso fanden wir in keinem Fall Eiweiß im Harn. Der Reststickstoffwert war normal, und der Blutdruck der Tiere zeigte vor der Tötung folgende Werte : 75, 60, 60, 65, 52 und 70 mm Hg. Die Tiere wurden nach 16 Injektionen mit Luftembolie getötet. Der Sektions- und histologische Befund stimmte völlig mit den unter *a)* erwähnten Veränderungen überein.

Wie obige Feststellungen ergeben, traten, wenn die Kaninchen mit Normalpferdeserum sensibilisiert und nach 3 Wochen gleichzeitig mit Adrenalinlösung und Baden in kaltem Wasser behandelt wurden, der arteriolosklerotischen Nephrosklerose entsprechende klinische und pathologisch-anatomische Veränderungen auf. Der Prozeß trat in erheblich schwächerer Form in Erscheinung, wenn die Sensibilisierung oder Sensibilisierung und Baden weggelassen wurden.

Besprechung

Die sich mit der Hypertonie und Nephrosklerose beschäftigenden Forscher untersuchen seit langem die Frage, ob die Nebenniere im Zustandekommen der Hypertonie eine Rolle spielt. Es gab eine Zeit, in der man dem Adrenalin in der Auslösung der Hypertoniekrankheit eine gewisse Funktion zuschrieb. Später stellte es sich jedoch heraus, daß Adrenalin am Menschen den systolischen Druck erhöht, gleichzeitig aber den diastolischen herabsetzt, weshalb der Einfluß des Adrenalins auf die Hypertonie verneint wurde. Seitdem man jedoch weiß, daß die Marksubstanz der Nebenniere auch Arterenol (Noradrenalin) enthält, das sowohl den systolischen als auch den diastolischen Druck erhöht, ist die Bedeutung der Nebenniere wieder in den Vordergrund gerückt (Gömöri [6]). Für die Möglichkeit einer Funktion des Arterenols zeugt auch die Tatsache, daß durch bilaterales Entfernen der Nebennierenmarksubstanz bei Hypertonikern zumindest vorübergehend Blutdrucksenkung erzielt werden kann (Durante [3]). Es sei ferner noch die Tatsache erwähnt, daß bei Phäochromozytom Hypertonie auftritt, und wenn sie genügend lange besteht, generalisierte Arteriolosklerose, ja Arteriolonekrose zustande kommt (Zollinger [13]).

An Versuchstieren führten Haft und Prior [7] durch Behandlung mit Ephedrin und Adrenalin Rindennekrose herbei. Staemmler, Karhoff, Herink, Lingenberg [12] hatten den Hilus der linken Niere von Ratten mit einer arterenoldurchtränkten Manschette umgeben, wonach Nierenrindennekrose aufgetreten war. Nach den Autoren lassen sich die zustande gekommenen Veränderungen mit der gefäßkontrahierenden Wirkung des Aterenols erklären. An den Nieren waren nämlich organische Gefäßveränderungen, Thrombosen oder andere Veränderungen nicht zu beobachten. Die Nekrosen kann man demnach als funktionelle Infarkte auffassen, die infolge des durch die Reizung der sympathischen Nerven ausgelösten Gefäßspasmus entstehen.

Bei den bisherigen Untersuchungen war man bestrebt gewesen, der Hypertonie- und Arteriolosklerosefrage auf zwei Wegen experimentell nahezukommen. Diese Versuche sollen nur ganz kurz erwähnt werden. Eine Methode wurde von Goldblatt und Mitarbeitern [5] angewandt, die eine Nierenarterie von Hunden einengten, wonach Hypertonie auftrat, welche jedoch nach etwa 6 Monaten spontan verschwand. Wurden aber beide Nierenarterien eingeengt, so kam es zu permanenter Hypertonie. An den Gefäßen waren arteriolosklerotische und arteriolonekrotische Veränderungen nachweisbar. Page und Mitarbeiter [10] sowie Bohle, Kohler und Tomsche [2] umgaben die Niere mit einer engen Zellophankapsel. Zollinger [13] arbeitete in seinen Versuchen nach der Methode von Rolf Meyer, indem er die Niere junger Ratten mit einer Plastikkapsel umgab. Mit dem Wachsen der Nieren lag später die Kapsel den Nieren eng an und behinderte den Blutkreislauf, so daß Hypertonie mit

Arteriolenveränderungen zustande kam. LŐRINCZ und GORÁCZ [9] klemmten Niere und Nierenhilus mit Gummi ab und führten dadurch Hypertonie und Gefäßveränderungen herbei.

Zur zweiten Gruppe der experimentellen Methoden zählen die Untersuchungen von SELYE [11]. Dieser Autor wies nach, daß Nephrosklerose und Hypertonie durch Überdosierung von Desoxycorticosteron hervorgerufen werden können, ferner dadurch, daß man die Versuchstiere durch unilaterale Nephrektomie sensibilisiert und mit Na- sowie eiweißreicher Diät füttert. Auch der ungereinigte Hypophysenmittellappenextrakt verursacht Nephrosklerose. Laut SELYE sei diese Nierenläsion als Anzeichen schlechter Adaptation aufzufassen. Nach verschieden langen Stresswirkungen entwickelt sich Hypertonie. Seiner Meinung nach führt der Stress zur Erhöhung der Corticotrophinproduktion, welche die Corticoidhormonerzeugung der Nebenniere stimuliert. Nach SELYE beruhen Hypertonie und Nephrosklerose auf der endogenen Intoxikation des Organismus durch seine eigenen Corticoide. Laut ENDES [4] sei die Stresswirkung nicht rein humoraler Natur, sondern der Stress wirke durch Vermittlung der Nerven auch auf die höheren Zentren, deren veränderte Funktion durch Mobilisierung des Dienzephalon-Hypophysensystems die humorale Phase des Prozesses in Gang setzt. Nach GÖMÖRI [6] können in der Hypertonie auf Wirkung der Gewebshypoxie pathologische Impulse entstehen und in die Cortex gelangen.

Die unserseits beobachtete Nierenarteriolenveränderung, die wir bei der Untersuchung der experimentellen Glomerulonephritis als zufälligen Befund antrafen, ist sehr interessant und wahrscheinlich auf die vasokonstriktorische Wirkung des Adrenalins zurückzuführen. Es wurde schon erwähnt, daß auch andere Autoren [7, 12] die Wirkung von Adrenalin auf die Niere untersucht hatten. Diese hatten jedoch bei ihren Versuchen eine sehr große Adrenalin- bzw. Arterenolmenge auf einmal in den Organismus der Tiere eingeführt. Dies dürfte die Ursache der Nierenrindennekrose gewesen sein. Bei unseren Versuchen haben wir in der Niere niemals Nekrosen angetroffen, was wahrscheinlich darauf zurückgeführt werden kann, daß wir täglich nur eine verhältnismäßig kleine Adrenalinmenge verabreichten. Unserer Ansicht nach läßt sich der Pathomechanismus der nach obiger Methode herbeigeführter arteriolosklerotischen Nephrosklerose mit den Untersuchungen von GOLDBLATT und Mitarbeitern [5] in Parallele stellen, weil der vasokonstriktorischen Wirkung des Adrenalins in unseren Fällen wahrscheinlich entscheidende Bedeutung zukam.

Zusammenfassung

1. Die Entwicklung der nach Sensibilisierung mit Eiweiß durch Verabreichung von Pilokarpin und Baden in kaltem Wasser herbeigeführten experimentellen diffusen Glomerulonephritis wird durch bilaterale Adrenektomie nicht verhindert.

2. Nach Sensibilisierung mit Eiweiß kann bei Kaninchen durch Adrenalinverabfolgung und Baden in kaltem Wasser arteriolosklerotische Nephrosklerose hervorgerufen werden. Wird die Sensibilisierung oder das Baden weggelassen, so kommt auf Wirkung von Adrenalin eine leichtere Form der arteriolosklerotischen Nephrosklerose zustande.

LITERATUR

1. Beregi, E.: (1957) Eine neue Methode zur Herbeiführung der experimentellen Glomerulonephritis. Virchows Arch. path. Anat. *330*, 391; — (1955) Experimentell hervorgerufene Glomerulonephritis. Acta Morph. Hung. *5*, 3—4, 395. — 2. Bohle, A., Kohler, M. und Tomsche, U.: (1954) Über das Verhalten der epitheloiden Zellen der Vasa afferentia einseitig nephrectomierter Ratten bei renaler Hypertonie durch Einkapselung einer Niere. Beitr. Path. Anat. *113*, 414. — 3. Durante, L.: (1952) Resultats de 510 Medullectomies surrénales dans les syndromes de l'hypersurrénalisme médullaire. Presse méd. *60*, *5*, 102. — 4. Endes, P.: (1952) Pathologie der Nephrosklerose und Hypertonie (ungarisch). Orv. Hetil. *93*, 1455. — 5. Goldblatt, H.: (1948) The Renal Origin of Hypertension. Thomas, Springfield. — 6. Gömöri, P.: (1953) Belgyógyászati vesebajok és hypertonia. Egészségügyi Kiadó, Budapest. — 7. Haft, D. E., and Prior, J. T.: (1951) Bilateral Cortical Necrosis of The Kidneys Following Treatment on an Unusual Case of Heart Block. Ann. intern. med., *34*, 1483. — 8. Jones, D. B.: (1953) Nephrosclerosis and Glomerulus. Amer. J. Path., *29*, 619. — 9. Lőrincz, J., Gorácz, Gy.: (1954) New Method of Inducing Experimental Hypertension in the Rat. Acta physiol. Hung. *5*, 489. — 10. Page: (1948) Experimental Renal Hypertension. Thomas Springfield. — 11. Selye, H.: (1949) Textbook of Endocrinology. Acta Inc. Montreal. — 12. Staemmler, M., Karhoff, B., Herink, M. und Lingenberg, I.: (1957) Die akuten Nephrosen. Virchows Arch. path. Anat, *330*, 296. — 13. Zollinger, H. U.: (1950) Zur Pathogenese und pathologischen Anatomie der Hypertonie. Schweiz. med. Wschr. *1*, 535.

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ АДРЕНАЛИНА НА ПОЧКИ КРОЛИКОВ

Э. БЕРЕГИ, Л. ХАРАНГИ и И. ФЁЛЬДЕШ

В ходе прежних исследований авторы выявили, что у сенсибилизированных лошадиной сывороткой кроликах можно подачей пилокарпина и купаньем в холодной воде вызвать острый и подострый диффузный гломелуронефрит. В настоящих экспериментах авторы желали выяснить вопрос: играет ли вызванная введением пилокарпина мобилизация адреналина роль в возникновении гломерулонефрита? Для этой цели были проведены две серии опытов:

1. После двустороннего удаления надпочечников у кроликов вышеупомянутым способом был вызван гломерулонефрит, и установлено, что адреналэктомия не влияет на течение гломерулонефрита.

2. После введения адреналина сенсибилизированным лошадиной сывороткой кроликам, и после их купанья в холодной воде, возник артериоло- и преартериолосклероз почек. Подобный, но менее сильный процесс наблюдался, если животным давали адреналин без предварительной сенсибилизации или купанья.

THE EFFECT OF ADRENALINE ON THE KIDNEY OF THE RABBIT

E. BEREGI, L. HARANGHY and I. FÖLDES

In a previous study it has been shown that in rabbits sensitized with horse serum acute and subacute diffuse glomerulonephritis could be induced by treatment with pilocarpine and by exposure to cold bath. The present experiments were aimed at elucidating the role of the adrenaline mobilisation due to pilocarpine in the development of glomerulonephritis. Two series of experiments have been carried out.

1. Glomerulonephritis was induced in rabbits by the above method after bilateral adrenalectomy. It was found that adrenalectomy had no influence on the course of glomerulonephritis.

2. In rabbits sensitized with horse serum, the administration of adrenaline and bathing in cold water resulted in the development of arteriolar and prearteriolar sclerosis. The process was similar, though less marked, when adrenaline was administered without bathing or previous sensitisation.

Dr. Edit Beregi
Prof. Dr. László Haranghy } Budapest, IX., Üllői út 93., Ungarn
Dr. István Földes Budapest 124, Ungarn

Institut für Medizin und Biologie der Deutschen Akademie der Wissenschaften, Berlin-Buch (Präsident: Prof. W. FRIEDRICH), Arbeitsbereich Biologie (Vorstand: Prof A. GRAFFI)

EIN VIRUS ALS URSACHE MYELOISCHER LEUKÄMIEN BEI DER MAUS UND DER RATTE* **

A. GRAFFI

(Eingegangen am 1. Dezember 1958)

Im Jahre 1954 gelang uns der Nachweis, daß myeloische Leukämien der Maus (Abb. 1) durch ein virusartiges filtrierbares Agens erzeugt werden [1—4] und damit ein ähnlicher Tatbestand vorliegt, wie ihn GROSS 3 Jahre früher für die lymphatische Mäuseleukämie festgestellt hat [5]. Die ersten positiven Resultate (ca. 50% Leukämien) erzielten wir mit zellfreien Filtraten aus verschiedenen transplantablen Mäusetumoren, z. B. den Sarkomen Sa I und Sa II, dem Ehrlich-Ascites-Karzinom und unserer transplantablen Leukose SOV 16 (Tab. I). Bald konnten wir jedoch nachweisen, daß zellfreie Filtrate leukämi-

Tabelle I

	Versuchsanordnung	Tierzahl	Leukämien	% Leukämien	Latenzzeit (Monate)
	Unbehandelte Kontrollmäuse.....	2548	19	<1	>12
	Behandelte Kontrollen (Filtrate aus Normalgewebe und Rattentumoren)	466	40	9	~ 17
Zellfreies Filtrat an neugeborene Mäuse	Sa 1.....	1120	561	50	~ 7
	Sa 2.....	33	15	45	~ 7
	Ehrlich-Ascites	146	74	50	~ 7
	SOV 16	79	49	62	~ 4
	leukämische Lymphknoten .	234	172	74	~ 4
	Gehirn leukämischer Mäuse	72	51	71	~ 4

scher Lymphknoten sowie der Milz, der Leber und des Gehirns nach Filtratapplikation erkrankter Mäuse noch viel wirksamer sind als Filtrate der genannten Ausgangstumoren, in dem ein noch höherer Prozentsatz an Leukämien mit abgekürzter Latenzzeit (3—4 Monate) erzielt wird [6, 7]. Aus diesem Grunde wurden von uns in den letzten Jahren hauptsächlich leukämische Lymphkno-

* Vortrag, gehalten vor der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, am 29. Nov. 1958.

** Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. K. Thomas zum 75. Geburtstag gewidmet.

ten zur Herstellung zellfreier Filtrate angewandt. Ich möchte Ihnen nun im Rahmen dieses Referates über einige neuere Ergebnisse über die Wirkungsweise sowie die chemische und biologische Natur des Virus der myeloischen Leukose der Maus berichten. Wir verfügen zur Zeit über ein Material von über 3 000 Leukämien, die durch zellfreie Filtrate hervorgerufen wurden.

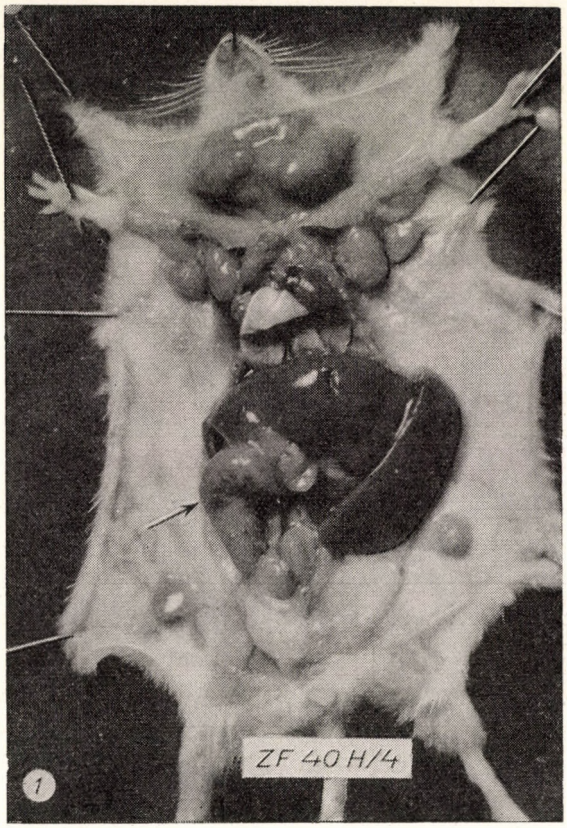


Abb. 1. Chloroleukämie einer Maus 7 Monate nach Injektion eines zellfreien Filtrats aus dem Tumor Sa II.

Nachdem wir in früheren Untersuchungen nachgewiesen hatten, daß die Wirkung unseres Leukämievirus von der genetischen Konstitution der Tiere weitgehend unabhängig ist [8], da es bei drei verschiedenen Inzuchtstämmen ungefähr die gleiche Leukämiequote auslöst (40—60%) und außerdem sowohl auf neugeborene Tiere als auch in abgeschwächtem Maße auf erwachsene Mäuse [9] wirksam ist (Tab. II), wandten wir uns der Frage der *Spezies-Spezifität* dieses Virus zu. Es wurde versucht, durch zellfreie Filtrate aus leukämischen Lymphknoten der Maus bei Ratten Leukämien zu erzielen [10] (Tab. III). Die Filtrate wurden neugeborenen Ratten subcutan, intra-

Tabelle II

	Tiermaterial	Tierzahl	Zahl der Leukämien	% Leukämien
Alter der Tiere bei der Filtrat-injektion	bis 24 Stunden	82	38	46
	2—11 Tage	89	38	42
	3—4 Monate	101	22	22
Unterschiedliche genetische Konstitution	Stamm AB	87	42	48
	Stamm sg	41	29	70
	Stamm db	51	21	41

Tabelle III

Leukämieerzeugung bei Ratten durch zellfreie Filtrate leukämischer Lymphknoten der Maus

	Tierzahl	Zahl der Leukosen	% Leukosen
Unbehandelte Kontrollratten (Wistarstamm).....	317	—	—
Behandelte Kontrollen (Filtrate von Rattentumoren).....	107	—	—
Filtrate aus leukämischen Lymphknoten der Maus an neugeborene Ratten.....	126	19	15

cerebral oder intraperitoneal appliziert, wobei hauptsächlich Wistartiere zur Anwendung gelangten, bei denen wir spontane Leukämien bisher überhaupt noch nicht beobachten konnten. 15% der mit Mäuseleukämiefiltrat behandelten Tiere erkrankten im Alter von 3—5 Monaten an einer tödlich verlaufenden, vorwiegend myeloischen Leukose, die in den meisten Fällen als intrathorakaler Tumor in Erscheinung trat, der Walnußgröße erreichte (Abb. 2). Diese Rattenleukosen waren gut transplantabel. Filtrate aus ihnen führten bei Ratten und Mäusen wiederum zu myeloischen Leukämien, die sich für den elektronenmikroskopischen Virusnachweis (s. später) im ultradünnen Schnitt als besonders günstig erwiesen. Damit war der Beweis erbracht, daß das Virus der myeloischen Leukämie der Maus eine breitere, über diese Spezies hinausgehende Wirksamkeit besitzt, und es wird von uns zur Zeit untersucht, ob auch andere in der phylogenetischen Reihe weiter entfernte Tierarten darauf ansprechen.

In einer weiteren Versuchsserie konnten wir einen interessanten Zusammenhang zwischen Viruswirkung und Milzfunktion nachweisen (Tab. IV). Durch eine *Splenektomie* unmittelbar vor oder nach der Filtratinjektion wird bei Mäusen die Leukämiequote stark herabgesetzt [11]. Eine Milzextirpation einige Wochen nach der Filtratverabfolgung läßt diesen Effekt nur andeutungsweise erkennen, und im späteren Alter ist sie völlig unwirksam. Der Mechanis-

mus dieser Milzwirkung ist uns noch weitgehend unbekannt. Es ist jedoch interessant, daß auch hinsichtlich der Erzeugung von myeloischen Mäuseleukämien durch Röntgenstrahlen eine ähnliche Wirkung der Splenektomie nachgewiesen werden konnte, während die Entstehung lymphatischer Strahlen-

Abb. 2. Intrathorakale Leukose bei einer Wistar-Ratte 5 Monate nach Injektion eines zellfreien Filtrats aus leukämischen Lymphknoten der Maus

Tabelle IV

Beziehung zwischen Filtratwirkung bei der Maus und Splenektomie

	Tierzahl	Zahl der Leukämien	% Leukämien
1. Kontrollen (ohne Splenektomie)	73	53	73
2. Splenektomie kurz vor Filtratinjektion	24	2	8
3. Splenektomie 1—5 Tage nach Filtratinjektion	20	3	15
4. Splenektomie 1—2 Monate nach Filtratinjektion	26	14	54

leukämien durch eine Thymektomie weitgehend unterdrückt werden kann. Auf Grund unserer cytologischen und histologischen Untersuchungen wissen wir, daß Knochenmark und Milz wahrscheinlich die primären Angriffspunkte des Virus der myeloischen Mäuseleukämien sind. Zur Zeit wird von uns untersucht, ob durch die Injektion von Milzextrakten die negativen Auswirkungen einer Splenektomie im Hinblick auf die Viruswirkung wieder aufgehoben werden können.

Ich möchte nun einige Versuche zur *chemischen und physikalischen Charakterisierung des Leukämievirus* anführen [12]. Aus früheren Experimenten ergab sich seine Thermolabilität, corpusculäre Natur, Resistenz gegenüber Einfrierung und Glycerin, hohe Empfindlichkeit gegenüber Äther, Desoxycholsäure, Formalin und anderen Einwirkungen. In der letzten Zeit haben wir uns vor allem mit der Resistenz des Virus gegenüber verschiedenen Fermenten befaßt und nachweisen können, daß seine Wirksamkeit durch DNase und RNase auch bei kombinierter Wirkung beider Fermente überhaupt nicht beeinträchtigt wird, während eine sehr kräftige Trypsinbehandlung zu einer deutlichen Abschwächung der Wirkung führt. Daraus resultiert, daß es sich bei diesem Virus sicher nicht um eine freie Nukleinsäure handelt, sondern Eiweißsubstanzen und eventuell auch Lipoide als weitere Bausteine beteiligt sind. Mit chemisch isolierter DNS (Dodecylsulfatmethode) und RNS (Phenolmethode nach GIERER und SCHRAMM) konnten wir bis jetzt ebenfalls keine eindeutigen Resultate erzielen. Auch gegenüber einer UV-Bestrahlung mit der Wellenlänge 260 mμ ist eine um mindestens 2 Zehnerpotenzen geringere Empfindlichkeit vorhanden als bei dem aus reiner DNS bestehenden transforming principle der Bakterien, was gleichfalls gegen die reine Nukleinsäurenatur dieses Agens spricht.

Wir haben weiterhin unsere *immunologischen* Kenntnisse über das Leukämievirus zu erweitern versucht (Tab. 5). Bekanntlich konnten wir 1955 nachweisen, daß es spezifische Antigeneigenschaften besitzt und durch ein heterologes Antiserum vom Kaninchen inaktiviert wird [13], während Antiseren

Tabelle V

Immunologische Versuche mit dem leukämogenen Agens der Maus

Versuchsanordnung	Tierzahl	Zahl der Leukämien	% Leukämien
Sa 1 — Filtrat + Anti-Sa 1 — Kaninchenserum (Kombiniert an neugeborene Mäuse)	155	7	5
Sa 1 — Filtrat + Kaninchen-Antiserum gegen normales Mäuseknochenmark	65	51	78
Leukämiefiltrat (bei der Geburt) + Anti-Leukämie-Kaninchenserum nach 1—2 Monaten (Therapieversuch)	85	46	54

gegen normales Mäusegewebe (Knochenmark, Lymphknoten) wirkungslos waren. Zunächst untersuchten wir, ob mit einem Kaninchenantiserum auch dann ein therapeutischer bzw. prophylaktischer Effekt erzielt werden kann, wenn das Serum nicht gleichzeitig mit dem Filtrat, sondern erst mehrere Wochen oder Monate später verabfolgt wird [14]. Eine derartige Wirkung konnte leider nicht nachgewiesen werden. Weiterhin wurde untersucht, ob auch bei homologer Immunisierung mit Filtraten, d. h. also bei der Maus spezifische Antikörper gegen das Virus erzeugt werden. Die Testung erfolgte in der Weise, daß das Mäuseimmunserum, kombiniert mit Filtrat, neugeborenen Mäusen appliziert wurde, also mit der gleichen Methode, die sich bei den Versuchen mit dem Kaninchenantiserum als sehr wirksam erwiesen hatte (Tab. V). Das Mäuseimmunserum zeigte nur einen geringen Inaktivierungseffekt, der sich in einer leichten Herabsetzung des Leukämieprozentsatzes und in einer Verlängerung der Latenzzeit äußerte. Auch Versuche einer aktiven Immunisierung von Mäusen, wobei durch Formalinzusatz oder längeres Stehen bei 0° abgeschwächtes Filtrat als Vakzine benutzt wurde, verliefen bis jetzt nicht sehr erfolgreich.

In den letzten Jahren haben wir uns intensiver mit *Züchtungsversuchen* unseres Virus in der *Gewebskultur* und auf der *Chorioallantois* des Hühnereies beschäftigt [15, 16]. Es konnte zunächst festgestellt werden, daß das Virus auch in der Kultur von leukämischen Zellen laufend an die Nährflüssigkeit abgegeben wird, da diese, in filtriertem Zustand an neugeborene Tiere verimpft, selbst, nach mehreren Passagen leukämogene Wirkung erkennen läßt. Wichtiger sind jedoch Züchtungsversuche unter Verwendung der Chorioallantois des Hühnereies. Schon 1955 konnten wir nachweisen, daß in Klatschpräparaten der mit Filtrat beimpften Chorioallantois stark virusverdächtige Partikeln in Haufenformen mit Hilfe des Elektronenmikroskops nachweisbar sind, die einen Durchmesser von 40—60 mμ aufwiesen [17]. In der letzten Zeit stellten wir fest, daß nach einer ausreichenden Anzahl von Passagen der Virusnachweis mit Filtraten der beimpften Chorioallantois auch im Tierversuch möglich ist, indem nach Verimpfung an neugeborene Mäuse Leukämien auftraten. Diese Versuche werden von uns zur Zeit auf breiterer Grundlage wiederholt.*

Vorausgehend wurde schon auf den *elektronenmikroskopischen Nachweis unseres Leukämievirus* hingewiesen. Es handelte sich zunächst um virusverdächtige Partikeln in Ausstrichen von hochtourigen Sedimenten der Ascitesflüssigkeit vom leukämogen wirksamen Tumor Sa I und von der beimpften Chorioallantois. Speziell die Partikeln aus der Ascitesflüssigkeit hatten eine sehr charakteristische morphologische Struktur [18], indem sie eine zentrale Eindellung erkennen ließen, die auch Gross beim Virus der lymphatischen Mäuseleukämie 1956 beschrieben hat. Im vergangenen Jahr ist uns nun die elektronenmikroskopische Sichtbarmachung unseres Virus auch im ultradün-

* Siehe Anmerkung bei der Zussammenfassung

nen Schnitt gelungen [19], und zwar sowohl im Cytoplasma leukämischer Zellen aus den erkrankten Lymphknoten als auch außerhalb der Zellen im extrazellulären Raum (Abb. 3, 4). Die Teilchen, die einen Durchmesser von 60—90 mμ besitzen und von runder Gestalt sind, haben eine äußere Membran

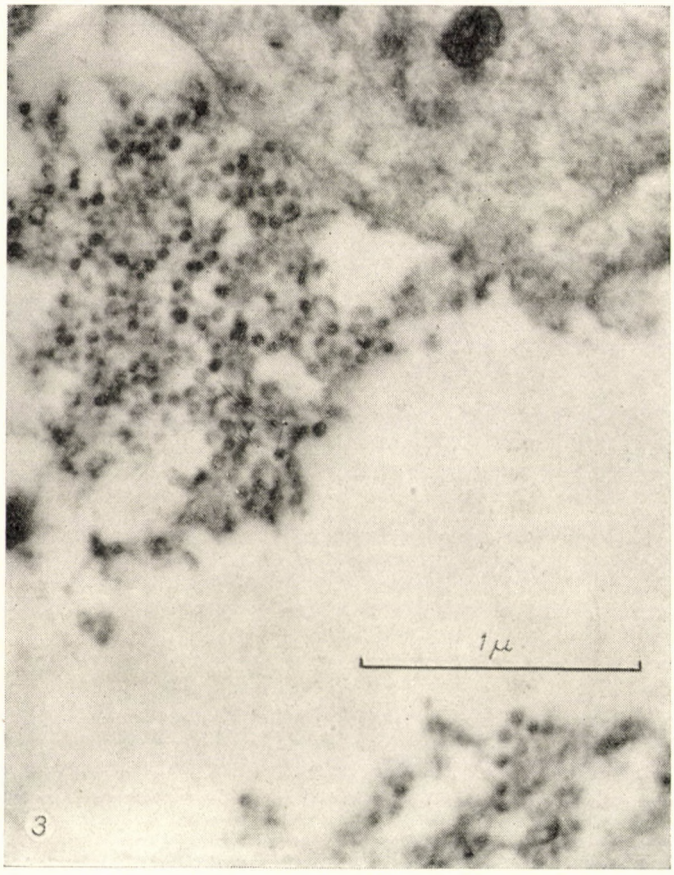


Abb. 3. Extrazelluläre virusverdächtige Partikeln im ultradünnen Schnitt eines leukämischen Lymphknotens der Maus. 32 000 ×

und einen inneren zentralen oder auch exzentrisch gelegenen dichteren Kern von ungefähr 30—40 mμ Durchmesser. Sie zeigen damit Ähnlichkeit mit dem Milchfaktor, Rous—Agens und den Viren der Hühnerleukämien. Vielfach findet man die Viruspartikeln auf der äußeren Oberfläche der Zellmembran in kleinen knopfartigen Ausstülpungen derselben. Möglicherweise sind dies Phasen der Virusausschleusung, die bekanntlich von OBERLING und BERNHARD [20] vor allem für das BITTNERsche Virus des Mamma-Karzinoms der

Maus beschrieben wurde. Allenfalls zeigen unsere elektronenmikroskopischen Untersuchungen recht eindeutig, daß es sich bei dem leukämogenen Agens in unseren Filtraten tatsächlich um ein echtes Virus konkreter Form und Struktur handelt.

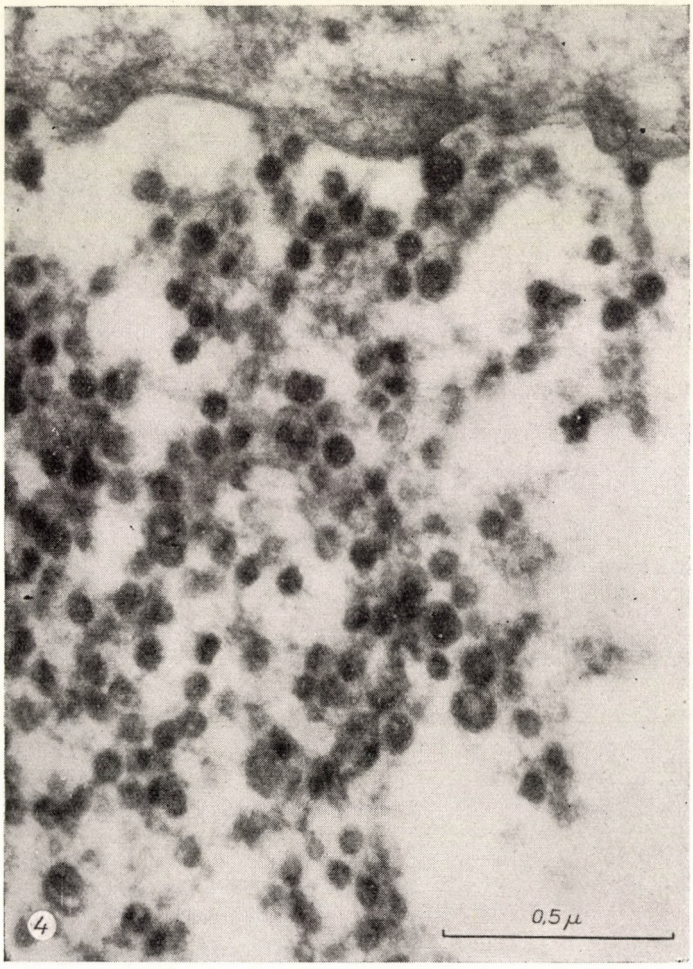


Abb. 4. wie Abb. 3 bei 80 000 facher Vergrößerung. In vielen Viruspartikeln sind die äußere Membran und eine Innenstruktur zu sehen

Zusammenfassend ergibt sich aus unseren Unte rsuchungen, daß auch die myeloische Leukämie der Maus durch ein Virus bedingt wird, wobei es besonders bemerkenswert ist, daß dieses Virus auch auf andere Spezies, z. B. auf die Ratte, wirksam ist, so daß man ihm möglicherweise fast den Charakter eines allgemeinen Leukämievirus zusprechen könnte. Wir erblicken in unseren

Befunden außerdem einen weiteren Beitrag zur Frage der Virusätiologie maligner Tumoren, da wir die Leukämien und Leukosen auch auf Grund unserer eigenen Untersuchungen als echte Geschwülste im Sinne eines Blastoms ansehen müssen.

Es ergibt sich die Frage, die bereits 1903 von BORREL [21] erstmalig gestellt wurde und in der Folge von einer Reihe sehr namhafter Wissenschaftler wie ROUS [22], OBERLING [23], GYE [24], BITTNER [25], SILBER [26], STANLEY [27] u. a. immer wieder diskutiert worden ist, ob nicht allen bösartigen Tumoren ein Virus als ursächlicher Faktor zugrunde liegt.

In Anbetracht der hohen Spezifität verschiedener chemischer Cancerogene, z. B. der wirksamsten cancerogenen Kohlenwasserstoffe wie Benzpyren, Methylcholantheren etc., von denen bereits Bruchteile eines mg bei verschiedenen Tierarten fast 100 %ig zu malignen Tumoren führen, möchten wir zu dieser Frage zunächst noch eine abwartende Stellung einnehmen. Die Annahme, daß diese Cancerogene einem ubiquitären, allgemeinen Tumorvirus nur den Boden zu seiner Wirkung vorbereiten oder es aktivieren, erscheint mir vorerst zu hypothetisch trotz gewisser Analogien bei den Bakteriophagen lysogener Bakterienstämme. Wir bemühen uns daher um eine einheitliche Konzeption der Cancerogenese, bei welcher die Auslösung der Geschwulstbildung sowohl durch Viren als auch durch chemische oder physikalische Cancerogene verständlich wird, also der großen Heterogenität der onkogenen Reize Rechnung getragen wird.

Ich möchte mir erlauben, einige zunächst noch rein spekulative Gedankengänge zu diesem Fragenkomplex zu äußern.

Man könnte sich zum Beispiel vorstellen, daß der Generalnenner der Cancerogenese ganz allgemein im Auftreten neuer genetischer Materie in einer somatischen Zelle besteht. Hierbei ist in erster Linie an eine neue genetisch aktive Nukleinsäure zu denken [28, 38]. Es sind dabei beide Formen der Nukleinsäuren, nämlich DNS und RNS, in gleichem Maße in Betracht zu ziehen, da beiden genetische Bedeutung zugesprochen werden muß. Während die DNS das genetische Material der Chromosomen bildet, ist die RNS bekanntlich der wesentliche Determinant vieler Viren, z. B. des Tabakmosaikvirus etc., weiterhin der pflanzlichen Plastiden und der autoreduplizierbaren Organellen (Mitochondrien, endozelluläres Reticulum usw.) des Cytoplasmas der tierischen Zelle. Auch das Rous-Agens und die Viren der Hühnerleukosen enthalten ausschließlich RNS [29, 30, 31]. Wir haben jedoch heute ausreichenden Grund zu der Annahme, daß eine genetisch wirksame RNS in der Zelle im Zuge ihrer Matrizenfunktion auch auf die DNS einen Einfluß ausüben kann und selbstverständlich auf die Konfiguration und die funktionellen Eigenschaften der Proteine, die ja unter ihrer unmittelbaren Mitwirkung entstehen. Folgendes Schema einer gegenseitigen Beeinflussung der genetischen Matrizen der Zelle und ihrer primären oder sekundären Produkte ist durchaus diskutierbar :

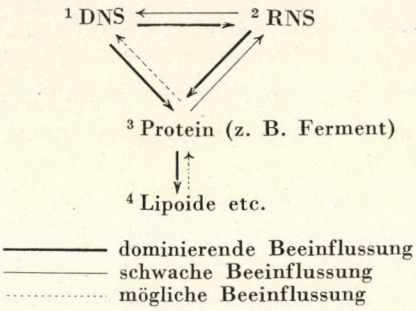


Abb. 5. (s. Text)

Auf Grund dieses Schemas würde sich ergeben, daß eine Änderung der genetischen Eigenschaften einer Zelle — wie dies für die Tumorzellen als neue Zellrasse a priori angenommen werden muß — am leichtesten dadurch zustandekommt, daß ein neues Nukleinsäuremuster (DNS oder RNS) entsteht oder von außen in die Zelle aufgenommen wird. Andererseits bleibt jedoch die Möglichkeit offen, daß eine primär abnorme RNS (z. B. Virus) auch die DNS der Zelle beeinflußt und außerdem gleichzeitig neue Proteinmuster erzeugt. Weiterhin würden diese abgeänderten Nukleinsäuren entweder direkt oder sekundär auf dem Wege einer primären strukturellen Abänderung von Proteinen oder Lipoiden entstehen können. Damit wäre die Möglichkeit gegeben, daß genetische Änderungen in der Zelle auf verschiedenen Wegen, d. h. über sehr unterschiedliche primäre Angriffspunkte (DNS, RNS, Proteine, Lipoide) zustande kommen können, womit die Heterogenität cancerogener Reize eventuell verständlich wird.

Es wurde bereits erwähnt, daß einer Abänderung des zellulären Bestandes an Nukleinsäuren wegen ihrer direkten genetischen Wirkung allenfalls die erstrangige Bedeutung zukommen dürfte. Bei einer Virusinfektion der Zelle würde dieser Zustand unmittelbar auftreten, da nach unserem heutigen Wissen genetisch wirksame Nukleinsäuren (DNS oder RNS) in allen Fällen die wesentlichen Bestandteile der Viren sind (s. Versuche von Gierer und Schramm [32] und Fraenkel—Conrat [33] mit reiner RNS vom Tabakmosaik-Virus). Bei den chemischen und physikalischen Cancerogenen kann mit gutem Grund eine Änderung des zellulären Bestandes an genetisch wirksamen Nukleinsäuren durch einen Mutationsvorgang (K. H. Bauer [34]) angenommen werden, gleichgültig ob diese Mutation durch eine direkte oder indirekte Wirkung (über Proteine und Lipoide) des betreffenden Cancerogens auf die Nukleinsäuren zustande kommt. Auch hierbei ist in gleichem Maße sowohl an die RNS der Chromosomen als auch an die RNS des Kerns (Nukleolus) und vor allem der cytoplasmatischen Organellen: System der aus Lipoid-Ribonukleoproteiden aufgebauten Doppelmembranen (Mitochondrien, endozelluläres Reticulum, Golgi-Apparat etc.) zu denken, in welchen speziell die lipoidlöslichen

Cancerogene wie z. B. die polyzyklischen Kohlenwasserstoffe besonders stark angereichert werden [35].

Wenn man die Folgen, die eine abnorme Nukleinsäure mit Matrizenfunktion in der Zelle haben dürfte (Synthese abgeänderter Proteine, z. B. Fermente, abnorme Lipoid-Eiweißkomplexe etc.), bedenkt, gleichgültig ob diese auf dem Wege einer Mutation entstanden ist oder als exogene Nukleinsäure durch die Infektion mit einem Virus in die Zelle gelangte, so lassen sich viele Eigenschaften der Tumorzelle ziemlich zwanglos erklären. Die Erblichkeit der malignen Eigenschaften ist durchaus verständlich, da ja auch die als Virus eingebrachte Nukleinsäure sich im Zuge der Zellteilung vermehrt und auf die Tochterzellen verteilt. Es wird weiterhin die verminderte Korrelationsfähigkeit (Korrelationstaubheit) und gesteigerte Autonomie der Tumorzelle verständlich, da die abgeänderten Nukleinsäure- und Eiweißmuster zwangsläufig zu einer verminderten Ansprechbarkeit der Zelle auf alle humoralen und geweblichen korrelativen Kräfte des Organismus führen müssen, durch welche die normalen Zellfunktionen und vor allem auch die zelluläre Wachstumsleistung reguliert werden. Schließlich kann angenommen werden, daß sich eine abnorme, genetisch wirksame Nukleinsäure auch auf die morphologische Feinstruktur der Zelle im Sinne einer Störung derselben auswirkt. Es ist dabei gleichgültig, ob die strukturelle Minderwertigkeit, die sich auch in der Funktion und im Zellstoffwechsel zeigen muß, unmittelbar durch die abnorme Nukleinsäure bedingt wird, die ja auch als wichtiges morphologisches Strukturelement der Zelle anzusehen ist, oder die Folge einer abgeänderten Protein- und Lipoidsynthese darstellt. Bekanntlich zeigt die Tumorzelle auch auf Grund der elektronenmikroskopischen Untersuchungen verschiedene Anomalien ihrer Feinstruktur [36, 37], die vor allem die cytoplasmatischen Doppelmembranen betreffen (Mitochondrien, Ergastoplasma, endozelluläres Reticulum) und die alle im Sinne einer Strukturschädigung und strukturellen Minderwertigkeit zu deuten sind. Gerade auch bei einer Virusinfektion kann angenommen werden, daß die neueingeführte Nukleinsäure in den Verband der zelleigenen Nukleinsäuren (RNS oder DNS) einbezogen wird und damit am Aufbau der NS-haltigen Zellbestandteile (Mitochondrien, Kerne etc.) unmittelbar beteiligt ist und auf Grund ihrer Zellfremdheit submikroskopische Strukturfehler dieser hochorganisierten Zellelemente veranlaßt. Es ist nämlich ziemlich sicher, daß nur ein relativ kleiner Anteil der Virusnukleinsäure in Form charakteristischer infektiöser Viruspartikeln vorliegt und der größere Anteil in morphologisch nicht faßbarer Form in die Strukturelemente der Zelle selber eingeht. Damit erklärt sich auch die Tatsache, daß bei Virustumoren elektronenmikroskopisch nur in einer Minderzahl der Zellen und nur bei ganz bestimmten Zelltypen (Differenzierungsgrad, Alter etc.) charakteristische Viruspartikeln nachgewiesen werden können (bei Shope-Papillomen zum Beispiel nur in den verhornten Zellen!) [38].

Die strukturelle Minderwertigkeit der Tumorzelle ist auch aus verschiedenen biologischen Eigenschaften zu entnehmen, ihrer besonderen Hinfälligkeit, Labilität und Empfindlichkeit z. B. gegenüber Wärme, Strahlen, Nahrungsmangel (schnelle Nekrose) etc.

Es ist nun nicht uninteressant, daß man gerade von der Grundlage dieser strukturellen Minderwertigkeit der Tumorzelle aus eventuell in der Lage ist, auch deren charakteristische Stoffwechseleigenschaft, nämlich ihre abnorm hohe und autonome aerobe und anaerobe Glykolyse zu verstehen [39, 40, 28].

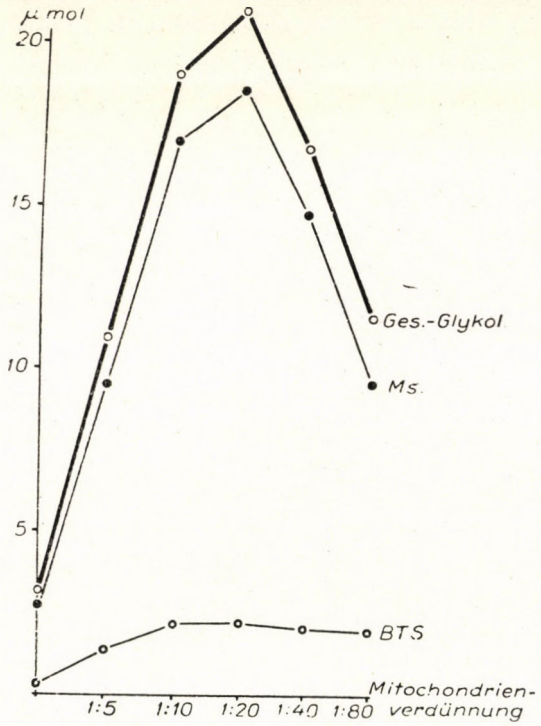


Abb. 6. Steigerung der anaeroben Glykolyse (Ordinate) eines hochtourigen Homogenisatüberstandes vom Sarkom S37 durch verschiedene Mitochondrienmengen (Verdünnungsstufen auf der Abszisse) aus Ehrlich-Ca. MS = Milchsäurebildung(h)Warburggefäß in μ mol. BTS = = Brenztraubensäurebildung(h)Warburggefäß. Ges. Glykol. = Gesamtglykolyse. O = Ansatz ohne Mitochondrienzugabe

Wir konnten nachweisen, daß durch strukturgeschädigte Mitochondrien oder Mikrosomen die Glykolyse eines hochtourigen Gewebsextrakts stark gesteigert wird (Abb 6) (maximal um das 5—10 fache) [40]. Wir glauben, daß dieser Effekt vorwiegend auf die ATPase-Aktivität der strukturgeschädigten Zellorganellen zurückzuführen ist. In normalen Zellen ist die ATPase dieser Zellstrukturen völlig latent, womit der Glykolyse ein Riegel vorgeschoben wäre. Dagegen wird sie sehr schnell im Zuge der mannigfachen Strukturschädigungen aktiv,

und dies kann auch für eine Strukturschädigung innerhalb der Zelle in gleicher Weise wie in vitro angenommen werden. Auch die sogenannte Schädigungsglykolyse von normalen Geweben, die in wenigen Minuten nach erfolgter Schädigung einsetzt (z. B. nach kurzer Anaerobiose), dürfte z. T. durch eine Steigerung der intrazellulären ATPase-Aktivität infolge Strukturschädigung der Zellorganellen zustande kommen.

Eine zweite Möglichkeit bestünde darin, daß die erhöhte Glykolyse geschädigter Zellen auf eine erhöhte Glukosedurchlässigkeit der äußeren Zellmembran zurückzuführen ist. In diesem Fall müßte der gleiche Mechanismus auch für die Tumorglykolyse in Betracht gezogen werden und eine irreversible Strukturschädigung der äußeren Membran der Tumorzelle als wesentliches Element der Malignität angenommen werden. Die vorausgehend postulierte strukturelle Minderwertigkeit der Tumorzelle infolge einer abnormen Nukleinsäure wäre also auf die Zellmembran auszudehnen, was keinerlei gedankliche Schwierigkeiten bereiten dürfte, da die äußere semipermeable Zellmembran wahrscheinlich einen den inneren cytoplasmatischen Membranen sehr ähnlichen chemischen und feinstrukturellen Aufbau haben dürfte (evtl. ebenfalls Mosaik aus Lipoiden und Nukleoproteiden).

Von der autonomen Glykolyse der Tumorzelle aus ist es nun relativ leicht, die verschiedenen Stoffwechsel- und Wachstumsqualitäten derselben verständlich zu machen [41, 42]. Durch das Mißverhältnis zwischen Atmung und Glykolyse muß es zwangsläufig

1. zu einer starken Stauung von halb oxydierten Zwischenprodukten des Citronensäurezyklus (Oxy- und Ketosäuren) kommen, so daß ein hoher Überschuß an Bausteinen für die Eiweiß-, Nukleinsäure- und Lipoidsynthese zur Verfügung steht, woraus ein starker Wachstumsdruck resultieren muß [43, 44].

2. Das stark erhöhte Reduktionspotential, das durch das Übergewicht der Gärung bedingt wird (sichtbarer Ausdruck dieser Situation ist die Tatsache der Milchsäurebildung, d. h. die Brenztraubensäure wird selber zum Akzeptor für den von der Atmung nicht mehr zu bewältigenden Substrat-Wasserstoff), dürfte wesentlich dazu beitragen, daß a) die Aminosäurebildung aus Oxysäuren auf dem Wege der reduktiven Aminierung gefördert wird, b) das Gleichgewicht zwischen Ribose und Desoxyribose zugunsten der letzteren verschoben wird, womit die Synthese der DNS und damit der das Wachstum wahrscheinlich limitierenden Zellsubstanz aktiviert wird [42].

3. dürften meiner Meinung nach eventuell auch gewisse Besonderheiten des Gärungs-ATP gegenüber dem Atmungs-ATP für das spezielle Verhalten der Tumorzelle von Bedeutung sein [42]. Während das ATP der Atmung, das durch oxydative Phosphorylierung innerhalb der Mitochondrien gebildet wird (strukturgebundenes ATP nach WARBURG), nur begrenzte Beweglichkeit hat, da es zum großen Teil innerhalb der Membranen dieser Zellorganellen festgehalten und für intramitochondriale Funktionen und Synthesen verbraucht wird, ist das im strukturlosen Grundplasma durch die Glykolyse entstehende ATP durch Diffusion völlig frei beweglich. Wir glauben, daß damit eine günstigere Versorgung des Zellkerns mit diesem Energiematerial verbunden sein könnte und damit eine Förderung der innerhalb des Kerns sich abspielenden

synthetischen (Wachstum) und Bewegungsfunktionen (Mitose etc.) erfolgt. Außerdem dürften auch die verschiedensten Bewegungsvorgänge im Cytoplasma (amöboide Bewegung beim infiltrativen und destruktiven Wachstum, Zellteilung) eine positive Beeinflussung erfahren, da ja auch hierfür leicht diffusibles, nicht strukturgebundenes ATP für die kontraktilen Elemente (Proteine) des Grundplasmas erforderlich ist. Auch bei den sich sehr intensiv bewegenden Leukozyten und Makrophagen findet man eine hohe Glykolyse, desgleichen bei der sich kontrahierenden Muskelzelle!

Schließlich kann auf Grund neuester Untersuchungen von SCHEID [45] angenommen werden, daß der Milchsäure, die bei der Gärung im Tumor entsteht, eine besondere Bedeutung für die Bereitung günstiger Ernährungsbedingungen für die Geschwulstzellen zukommt, indem durch sie in spezifischer Weise das lokale Gefäßnetz im Sinne einer günstigen Nahrungszufuhr beeinflußt wird. Damit würden durch die autonome Glykolyse des Tumors praktisch alle intra- und extrazellulären Bedingungen geschaffen werden, die für ein autonomes und gesteigertes Wachstum erforderlich sind.

Auf den zunächst rein hypothetischen Charakter dieser Betrachtungen über eine mögliche Wirkungsweise von onkogenen Viren und chemischen und physikalischen Cancerogenen möchte ich jedoch abschließend nochmals ausdrücklich hinweisen.

Anmerkung: In der letzten Zeit ist uns eine Züchtung des Virus auf Trypsinkulturen von Mäuseembryo gelungen (Graffi, Gimmy, u. Krause, Naturwiss. 1959. 330.). Die zellfreie Kulturflüssigkeit erzeugt bei Ratten in 4—8 Wochen in sehr grosser Zahl Nieren- und Knochensarkome. Im Gegensatz zum Polyoma-Virus von Stewart und Eddy, gibt unser polyvalentes Sa-Virus einen negativen Hämagglutinationstest. In der Kultur findet man cytoplasmatische Einschlusskörperchen und einen starken cytopathogenen Effekt.

Zusammenfassung

Ähnlich wie L. GROSS und BERGOLZ gelang dem Vortragenden und seinen Mitarbeitern die zellfreie Übertragung bestimmter Mäuseleukämien. Das Virus wurde in verschiedenen transplantablen Mäusetumoren und in den Organen, speziell den Lymphknoten leukämiekranker Tiere nachgewiesen. Die zellfreien Filtrate wurden sowohl an neugeborene als auch erwachsene Tiere mit Erfolg appliziert. Bei den Leukämien handelt es sich ausschließlich um myeloische Formen. Die Filtrate sind auch bei der Ratte, also heterolog wirksam. Durch Splenektomie wird die Wirkung des leukämogenen Virus fast völlig aufgehoben. Die Isolierung dieses wahrscheinlich humoralen Milzfaktors wurde in Angriff genommen. Das Virus hat spezifische Antigeneigenschaften und wird durch ein heterologes Antiserum inaktiviert. Es wird von den Leukämiezellen auch in der Gewebekultur laufend produziert, da die filtrierte Nährlösung starke leukämogene Wirkung besitzt. — Außerdem gelang die Züchtung des Virus auf der Chorio-allantois des Hühnereies. Das Virus ist sehr empfindlich gegen höhere Temperaturen (65°), Formalin, Äther, Desoxycholsäure; weniger empfindlich gegen Trypsin, Glycerin und UV-Strahlen und weitgehend resistent gegen DN-ase, RN-ase und Lipase. RNS und DNS aus dem leukämischen Gewebe sind völlig unwirksam. Das Virus konnte elektronenoptisch in ultradünnen Schnitten leukämischer Lymphknoten in Form runder Partikel von 60—90 mμ Durchmesser mit charakteristischer Innenstruktur nachgewiesen werden.

Es wird der Versuch unternommen eine einheitliche Konzeption der Onkogenese zu entwerfen. Dabei wird als Generalnenner das Auftreten einer neuen genetisch wirksamen Nukleinsäure (RNS oder DNS) in einzelnen Zellen angenommen. Dieser Zustand kann entweder auf dem Wege einer Mutation durch ein chemisches oder physikalisches Cancerogen oder durch die zelluläre Infektion mit einem Virus zustande kommen. Die abnorme Nukleinsäure vermindert die normale Ansprechbarkeit der Zellen auf die korrelativen Wachstums-

kräfte und führt zur Autonomie. Außerdem wird durch das abnorme genetische Substrat eine Minderwertigkeit und Hinfälligkeit der morphologischen Feinstruktur mit erblichem Charakter bedingt. Als Folge dieser strukturellen Labilität speziell der cytoplasmatischen Doppelmembranen (Mitochondrien, Mikrosomen, Ergastoplasma, etc.) kann eine gesteigerte aktuelle ATPase-Aktivität in der Zelle angenommen werden, durch welche eine irreversible Steigerung der Glykolyse hervorgerufen wird. Die gesteigerte Glykolyse schafft alle weiteren wichtigen Voraussetzungen für die gesteigerte Wachstumstätigkeit und Zellvermehrung.

LITERATUR

1. Graffi, A., H. Bielka, F. Fey, F. Scharsach und R. Weiss: (1954) Gehäuftes Auftreten von Leukämien nach Injektion von Sarkomfiltraten. Naturwiss. *41*, 503; (1954) Wiener med. Wschr. *105*, 61. — 2. Graffi, A., H. Bielka und F. Fey: (1956) Leukämieerzeugung durch ein filtrierbares Agens aus malignen Tumoren. Acta haematol. *15*, 145. — Graffi, A., F. Fey und H. Bielka: (1956) Experimentelle Leukämieerzeugung durch zellfreie Geschwulstfiltrate. Klin. Wschr. *34*, 15. — Graffi, A.: (1957) Vortrag auf dem VI. Hämatologen-Kongreß Kopenhagen. — 3. Graffi, A. und F. Schmidt: (1954) Methodische Versuche zur Frage einer subzellulären Übertragung von Mäusetumoren. Dtsch. Gesundheitswes. *9*, 1309. — 4. Schmidt, F.: (1954) Über die Entstehung von lymphoiden Tumoren bei Experimenten auf der Basis der Induktionstheorie der Krebsentstehung. Naturwiss. *41*, 504. — 5. Gross, L.: (1954) "Spontaneous" leukemia developing in C3H mice following inoculation in infancy with AK-leukemic extracts or AK embryos. Proc. Soc. exp. Biol. Med. *76*, 27 (1951); Biological properties of the mouse leukemia agent. Cancer *6*, 153 (1953); Transmission of Ak leukemic agent into newborn mice of the 657 brown/cd inbred line. Proc. Soc. exp. Biol. Med. *86*, 734. — 6. Graffi, A., F. Fey und H. Bielka: (1956) Induction of leukemia in mice by cell-free filtrates of sarcomas and carcinomas. The Alexandria med. J. *2*, 167. — 7. Krischke, W., A. Graffi und E. Krischke: (1957) Untersuchungen über eine Anreicherung des leukämogenen Agens aus Mäusetumoren im Gehirn (16. Mitt.). Naturwiss. *44*, 400. — 8. Krischke, W., A. Graffi und E. Heyer: (1956) Untersuchungen über die Ansprechbarkeit genetisch verschiedener Mäusestämme auf zellfreie Filtrate maligner Tumoren. Naturwiss. *43*, 332 — 9. Gimmy, J., W. Krischke und A. Graffi: (1956) Über die leukämieerzeugende Wirkung zellfreier Tumorfiltrate nach Injektion in erwachsenen Mäusen. Naturwiss. *43*, 305. — 10. Graffi, A. und J. Gimmy: (1958) Erzeugung von Leukosen bei der Ratte durch ein leukämogenes Agens der Maus (17. Mitt.). Naturwiss. *44*, 518. (1957); Über die Wirkung des Virus der myeloischen Leukämie der Maus bei der Ratte. Z. ges. inn. Med. Grenzgebiete *13*, 881. — 11. Fey, F. und A Graffi: (1958) Beeinflussung der myeloischen Filtratleukämien der Maus durch Splenektomie. Naturwiss. *45*, 471. — 12. Graffi, A., H. Bielka, F. Fey und U. Heine: (1955) Untersuchungen zur weiteren Charakterisierung des leukämieerzeugenden Agens in zellfreien Sarkomfiltraten der Maus. Naturwiss. *42*, 421. — Graffi, A., F. Fey, H. Bielka, U. Heine und F. Hoffmann: (1956) Weitere Untersuchungen zur Charakterisierung des leukämierzeugenden Agens aus Mäusetumoren: Naturwiss. *43*, 63. — Bielka, H., A. Graffi und W. Krischke: (1957) Zur Frage der Beteiligung von Nucleinsäuren an der chemischen Zusammensetzung des leukämogenen Agens aus filtrierbaren Mäusetumoren (14. Mitt.). Naturwiss. *44*, 381. — Graffi, A. und H. Bielka: (1957) Zum Verhalten des leukämogenen Agens aus filtrierbaren Mäusetumoren gegenüber Glycerin und Gefriertrocknung (15. Mitt.). Naturwiss. *44*, 382. — Graffi, A.: (1957) Chloroleukemia of mice. Ann. N. Y. Acad. Sci. *68*, 540. — Bielka, H.: (1957) Über die onkogene Wirkung zellfreier Filtrate transplantabler Mäusetumoren und einige Versuche zur Charakterisierung des wirksamen Agens. Sonderbd. 37 zur Strahlentherapie: Krebsforsch. u. Krebsbekämpfung, *2*, 111. — 13. Graffi, A. und F. Fey: (1955) Untersuchungen über die Antigen-Eigenschaften des leukämieerzeugenden Faktors aus dem Mäusetumor Sa I. Naturwiss. *42*, 652. — Fey, F.: (1956) Beiträge zur Charakterisierung und Genese der nach Injektion zellfreier Tumorfiltrate auftretenden Leukämien der Maus. Dissertation, Jena. — Graffi, A., F. Fey, F. Hoffmann und W. Krischke: (1957) Inaktivierung des leukämieerzeugenden filtrierbaren Agens aus Mäusetumoren durch heterologe Immunseren. Klin. Wschr. *35*, 465. — 14. Graffi, A., F. Fey und F. Hoffmann: (1956) Weitere Untersuchungen zur immunologischen Charakterisierung des Agens der myeloischen Leukämie der Maus. Naturwiss. *45*, 471. — 15. Graffi, A., F. Fey, H. Bielka, U. Heine und F. Hoffmann: (1956) Weitere Untersuchungen zur Charakterisierung des leukämieerzeugenden Agens aus Mäusetumoren. Naturwiss. *43*, 63. — Graffi, A.: (1958) Experimentelle Untersuchungen zur Ätiologie der Leukämien. Z. ges. inn. Med. Grenzgebiete, *13*, 961. — 16. Graffi, A., U. Heine, L. Krause und L. Krüger: unveröffentlicht. — 17. Graffi, A.: (1957) Experimentelle Cancerogenese. Abhandl. Dtsch. Akad. Wiss. Bln., Kl. f. Med., Jahrg. 1955, Nr. 1. — 18. Graffi, A., F. Fey und H. Bielka:

(1956) Induction of leukemia in mice by cell-free filtrates of sarcomas and carcinomas. The Alexandria med. J. *2*, 167. — 19. HEINE, U., A. GRAFFI, J.—G. HELMCKE und A. RANDT: (1957) Virusartige Partikeln in zellfrei übertragbaren Mäuseleukämien (13. Mitt.). Naturwiss. *44*, 449. — GRAFFI, A.: (1958) Zur Virusätiologie verschiedener Mäuseleukämien. Acta haematol. *20*, 49. — 20. BERNHARD, W., M. GUÉRIN und CH. OBERLING: (1956) Mise en évidence de corpuscules d'aspect virusal dans différentes souches de cancers mammaires de la souris. Étude au microscope électronique. Acta univ. intern. cancr. *12*, 544. — 21. BORREL, A.: (1954) zit. von Ch. Oberling und M. Guérin. in: Adv. Cancer Res. *2*, 353. — 22. ROUS, P.: (1936) The virus tumor and the tumor problem. Amer. J. Cancer, *28*, 233. — 23. OBERLING, CH. und M. GUÉRIN: (1954) The role of viruses in the production of cancer. Adv. Cancer Res. *2*, 353. — 24. GYE, W. E. und W. J. PURDY: (1931) The cause of cancer. Cassell & Co., London. — 25. BITTNER, J. J.: (1945) Inciting influences in the aetiology of mammary cancer in mice. A. A. A. S., Res. Conference on Cancer 1944, Lancaster, Pa. Science Press Publ. Co. pp. 63—96. — 26. ЗИЛЬБЕР, Л. А.: (1954) Об этиологии и патогенезе раковой болезни в свете вирусологического и иммунологического эксперимента. Клин. Мед. СССР. *32*, (3), 9. — 27. STANLEY, W. M.: (1957) Beziehungen zwischen Viren und Krebs. Naturwiss. Rdsch. *10*, 401. — 28. GRAFFI, A.: (1958) Experimentelle Untersuchungen zur Ätiologie der Leukämien. Z. ges. inn. Med. Grenzgebiete, *13*, 961. — 29. CLAUDE, A.: Particulate components of normal and tumor cells. Science (New York), *1940*. 77. — 30. BEARD, J. W. und Mitarb.: (1958) persönliche Mitteilung. — 31. BATHER, R.: (1957) The nucleic acid of partially purified Rous No. 1 sarcoma virus. Brit. J. Cancer, *11*, 611. — 32. GIERER, A. und G. SCHRAMM: (1956) Die Infektiosität der Nucleinsäure aus Tabakmosaikvirus. Z. Naturforsch. *11b*, 138. — 33. FRAENKEL—CONRAT, H.: (1956) The role of the nucleic acid in the reconstitution of active tobacco mosaic virus. J. Amer. chem. Soc. *78*, 882. — 34. BAUER, K. H.: (1949) Das Krebsproblem. Springer-Verlag. — 35. GRAFFI, A.: (1939, 1940, 1941) Zelluläre Speicherung cancerogener Kohlenwasserstoffe. Vorl. Mitt. Z. Krebsforsch. *49*, 477. Intrazelluläre Benzpyrenspeicherung in lebenden Normal- und Tumorzellen. 2. Mitt. Z. Krebs. forsch. *50*, 196.; Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Mäusehaut nach Pinselung mit Benzpyren-Benzollösungen. Z. Krebsforsch. *52*, 165. — 36. OBERLING, CH., W. BERNHARD, A. GAUTIER und F. HAGUENAU: (1953) Les structures basophiles du cytoplasme et leurs rapports avec les cancers. Étude au microscope électronique. Presse méd. *61*, 719. — 37; HOWATSON, A. F. und A. W. HAM: (1955) Electron microscope study of sections of two rat liver tumors. Cancer Res. *15*, 62. — 38. MELLORS, R. C.: (1958) Viruses, genes, and cancer. Federation Proc. *17*, 714. — 39. GRAFFI, A.: (1956,) Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Beziehungen zwischen Virus und Geschwulstbildung. Berliner Med. *7*, 418. — (1957) Über Beziehungen zwischen Virus und Geschwulstbildung. Strahlentherapie *104*, 197.; — (1957) Chloroleukemia of mice. Ann. New York Acad. Sci. *68*, 540. — 40. GRAFFI, A. und E. J. SCHNEIDER: (1956, 1956) Die Mitochondrien als wichtige Regulatoren der anaeroben Glykolyse. Z. ärztl. Fortbild. *50*, 760. — Über die Beziehungen der Mitochondrien zur anaeroben Glykolyse. Naturwiss. *43*, 376. — GRAFFI, A., E. J. SCHNEIDER und G. SYDOW: (1956) Stimulierung der anaeroben Glykolyse durch das Virus der Hühnermyeloblastose. Naturwiss. *43*, 472. — 41. GRAFFI, A., E. J. SCHNEIDER und G. SYDOW: (1956) Über die mögliche Bedeutung der strukturgebundenen ATPase bei regenerativen Wachstumsvorgängen und der malignen Entartung. Z. ärztl. Fortbild. *50*, 1026. — 42. GRAFFI, A.: (1958) Wirusy i powstawanie nowotworów (Viren und Entstehung von Neoplasmen). Nowotwory (Polen), *8*, 159. — 43. POTTER, V. R.: (1951) Studies on the reaction of the Krebs citric acid cycle in tumor, with homogenates, slices, and in vivo technics. Cancer Res. *11*, 565. — 44. LETTRÉ, H.: (1953) Der Stand der Krebsforschung. Die Medizinische, *1953*, 897. — 45. SCHEID, P.: (1958) persönliche Mitteilung.

ВИРУС, КАК ПРИЧИНА МИЭЛОИДНОЙ ЛЕЙКЕМИИ У МЫШЕЙ И КРЫС

А. ГРАФФИ

Автору и сотрудникам — подобно Л. Гроссу и Бергольцу — удалось провести бесклеточную передачу определенных лейкозов мышей. Вирус был выявлен в различных пересаживаемых опухолях мышей, также как и в органах страдающих лейкемией животных, в частности в лимфатических узлах. Бесклеточные фильтраты были успешно применены, как на новорожденных, так и на взрослых животных. Речь шла всегда о миэлоидных формах лейкемий. Фильтраты оказались эффективными также у крыс, значит они гетерологично эффективны. Удалением селезенки действие лейкогенного вируса было

почти совершенно прекращено. Авторы приступили к изоляции этого предположительно гуморального селезеночного фактора. Вирус имеет специфические антигенные свойства и инактивируется гетерологичной противосывороткой. Он постоянно производится лейкемическими клетками, также и в тканевых культурах, так как фильтрованный питательный раствор обладает сильным лейкемогенным действием. Кроме этого удалось выращивание этого вируса также на хорионаллантоидной мембране курийного яйца. Вирус весьма чувствителен в отношении более высоких температур (65° C), далее к формалину, эфиру и дезоксихолевой кислоте. Он менее чувствителен к трипсину, глицерину и ультрафиолетовым лучам, весьма резистентный в отношении дезоксинуклеазы, рибонуклеазы и липазы. Рибонуклеиновая кислота и дезоксинуклеиновая кислота лейкемической ткани совершенно неэффективны. Вирус был выявлен электронноптическим методом в ультратонких срезах лейкемических лимфатических узлов, в форме круглых частичек диаметром 60—90 $m\mu$ с характерной внутренней структурой.

Авторы попытались составить однородную формулировку онкогенеза. При этом они в качестве общего знаменателя принимают появление в отдельных клетках новой, генетически эффективной нуклеиновой кислоты (рибонуклеиновой кислоты или дезоксинулеиновой кислоты). Это состояние может возникнуть либо путем мутации посредством химического или физического канцерогенного вещества, либо путем вирусной инфекции клетки. Ненормальная нуклеиновая кислота снижает нормальную реактивную способность клеток в отношении коррелятивных сил роста и приводит к автономии. Кроме того ненормальный генетический субстрат обусловливает неполноценность и неустойчивость морфологической тонкой структуры с наследственным характером. Как следствие этой структурной неустойчивости, в частности цитоплазматических двойных мембран (митохондриев, микросомов, эргастроплазмы и т. д.), можно предполагать повышенную актуальную аденозинтрифосфатазную активность в клетке, обусловливающую необратимое повышение гликолиза. Повышенный гликолиз создает все дальнейшие важные предпосылки для повышенного процесса роста и для размножения клеток.

A VIRUS AS THE CAUSE OF MYELOID LEUCAEMIA IN THE MOUSE AND RAT

A. GRAFFI

Just like L. Gross and Bergolz, Graffi et al. succeeded in transferring certain kinds of mouse leucaemia with cell-free media. The virus was demonstrated in various transplantable mouse tumours and in the viscera, especially in the lymph nodes, of animals suffering from leucaemia. The cell-free filtrates proved to be effective in newborn and adult animals alike. The leucaemia was exclusively of the myeloid type. Since the filtrates cause disease also in the rat, the transfer is heterologous. Splenectomy almost completely inhibits the leucaemia-inducing activity of the virus. Attempts have been made to isolate this splenic factor of apparently humoral nature. The virus has specific antigenic properties and is inactivated by a heterologous antiserum. It is produced continually by the leucaemic cells even in tissue cultures, because the filtered culture medium is highly leucaemogenic. Moreover, the virus was successfully grown on the chorio-allantoic membrane of the embryonated hen's egg. The virus is very sensitive to high temperature (65° C), formalin, ether, desoxycholic acid, and less sensitive to trypsin, glycerol and ultraviolet rays. It is greatly resistant to DN-ase, RN-ase and lipase. RNA and DNA from leucaemic tissue are wholly inactive. The virus could be demonstrated by electron microscopy in ultra-thin sections of leucaemic lymph nodes, as round particles 60 to 90 mμ in diameter, with characteristic inner structure.

Attempts have been made to offer a uniform conception to explain oncogenesis. The appearance of a new genetically active nucleic acid (RNA or DNA) in certain cells is suggested as a factor. This may result either from mutation caused by a chemical or physical cancerogenic agent or from cellular infection with virus. The abnormal nucleic acid interferes with normal correlative cell growth and leads to autonomy. Moreover, the fine morphologic structure will become inferior in quality and this may be hereditary. This structural lability, particularly of the cytoplasmic double membranes (mitochondria, microsomes, ergastoplasm, etc.) may give rise to an increased ATP-ase activity in the cell, that in turn may result in an irreversible increase of glycolysis. The increased rate of glycolysis will then create all the other important criteria of increased growth and multiplication.

Prof. Dr Arnold Graffi, Berlin-Buch, Lindenberger Weg 70. D. D. R.

A kiadásért felel az Akadémiai Kiadó igazgatója Műszaki felelős: Farkas Sándor

A kézirat nyomdába érkezett: 1959. IV. 29. — Terjedelem: 11,50 (A/5) fv, 67 ábra

Akadémiai Nyomda, Budapest — 1959/48797 — Felelős vezető: Bernát György

The Acta Morphologica publish papers on experimental medical subjects in English German, French and Russian.

The Acta Morphologica appear in parts of varying size, making up volumes.

Manuscripts should be addressed to:

Acta Morphologica Budapest IX., Tűzoltó u. 58.

Correspondence with the editors and publishers should be sent to the same address.

The rate of subscription to the Acta Morphologica is 110 forint a volume. Orders may be placed with "Kultura" Foreign Trade Company for Books and Newspapers (Budapest VI. Népköztársaság útja 21. Account No. 43-790-057-181) or with representatives abroad.

Les Acta Morphologica paraissent en français, allemand, anglais et russe et publient des travaux du domaine des sciences médicales expérimentales.

Les Acta Morphologica sont publiés sous forme de fascicules qui seront réunis en volumes.

On est prié d'envoyer les manuscrits à l'adresse suivante:

Acta Morphologica, Budapest IX., Tűzoltó u. 58.

Toute correspondance doit être envoyée à cette même adresse.

Le prix de l'abonnement est de 110 forints par volume.

On peut s'abonner à l'Entreprise du Commerce Extérieur de Livres et Journaux «Kultura» (Budapest, VI., Népköztársaság útja 21. Compte-courant No. 43-790-057-181) ou à l'étranger chez tous les représentants ou dépositaires.

«Acta Morphologica» публикуют трактаты из области экспериментальных медицинских наук на русском, немецком, английском и французском языках.

«Acta Morphologica» выходят отдельными выпусками разного объема. Несколько выпусков составляют один том.

Предназначенные для публикации авторские рукописи следует направлять по адресу:

Acta Morphologica, Budapest IX., Tűzoltó u. 58.

По этому же адресу направлять всякую корреспонденцию для редакции и администрации.

Подписная цена «Acta Morphologica» — 110 форинтов за том. Заказы принимает предприятие по внешней торговле книг и газет «Kultura» (Budapest VI., Népköztársaság útja 21. Текущий счет № 43-790-057-181) или его заграничные представительства и уполномоченные.

INDEX

MORPHOLOGIA NORMALIS ET EXPERIMENTALIS

Rivenzon, A.—Condoïu, M.: Contributions à l'étude de la spermatogenèse. L'état plasmodial (multinucléé) des cellules séminales. — *А. Ривензон, М. Кондойу:* О созревании спермы. Плазмодиальное (многоядерное) состояние семенных клеток 1

Velican, C. — Velican, D.: Genesis of Elements Having the Appearance of Tissular Mast Cells. — *Ц. Великан, Д. Великан:* Генез тканевых тучных клеток 11

Horváth, L.: Some Data Concerning the Submicroscopic Morphology of Mast Cells. I. — *Л. Хорват:* Данные к субмикроскопической морфологии тучных клеток 35

Oláh, É.—Hadházy, Cs.—Kostenszky, K.: Untersuchungen über die Knorpelbildung. III. Hämoglobin- und Milchsäuregehalt regenerierenden Gelenkfläche in verschiedenen Regenerationsstadien. — *Э. Олах, Ч. Хадхази, К. Коштенски:* Исследования образования хрящей. III. Содержание гемоглобина и молочной кислоты в восстанавливающейся поверхности сустава в различных стадиях регенерации.... 45

Adler, P.—Adler-Hradecky, C.: Normal Variability of the Changing Dentition.— *П. Адлер, Ц. Адлер-Хрaдецки:* Нормальные вариации смены зубов..... 63

Dévényi, I.—Megyeri, L.: Functional Reactivity of Homotransplanted Rat Thyroid. — — *И. Девеньи, Л. Медьери:* Исследование функциональной способности к реакции гомотрансплантатов щитовидной железы крыс..... 73

E. Szabó, L.—Tompa, G.—Bakó, G.: Experimental Intrathoracic Oesophagoplasty with Skin Tube. — *Э. Сабо, Г. Томпа, Г. Бако:* Экспериментальная внутригрудная замена пищевода кожной трубкой..... 81

PATHOLOGIA

Sándor, I.: On the Role of the Reactivity of the Infected Organism in the Development of Tuberculosis. — *И. Шандор:* О проблеме реактивности зараженного организма в развитии туберкулеза 89

Beregi, E.—Haranghy, L.—Földes, I.: Wirkung von Adrenalin auf die Kaninchenniere. — *Э. Береги, Л. Харанги, Л. Фёлдеш:* Исследование действия адреналина на почки кроликов..... 105

ONCOLOGIA

Graffi, A.: Ein Virus als Ursache myeloischer Leukämien bei der Maus und der Ratte. — *А. Граффи:* Вирус, как причина миэлоидной лейкемии у мышей и крыс. 115

ACTA MORPHOLOGICA

ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE

ADIUVANTIBUS
J. BALÓ, K. FARKAS, L. HARANGHY, B. KELLNER, J. SZENTÁGOTHAI

REDIGIT
I. TÖRÖ

TOMUS IX FASCICULUS 2

AKADÉMIAI KIADÓ BUDAPEST

1960

ACTA MORPHOLOGICA

A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA ORVOSTUDOMÁNYI KÖZLEMÉNYEI

SZERKESZTŐSÉG ÉS KIADÓHIVATAL: BUDAPEST V., ALKOTMÁNY UTCA 21.

Technikai szerkesztők:
Dr. Kiszely György és Dr. Somogyi Endre

Az Acta Morphologica német, angol, francia és orosz nyelven közöl értekezéseket a kísérletes orvostudomány tárgyköréből.

Az Acta Morphologica változó terjedelmű füzetekben jelenik meg. Több füzet alkot egy kötetet.

A közlésre szánt kéziratok a következő címre küldendők:

Acta Morphologica, Budapest IX., Tűzoltó u. 58.

Ugyanerre a címre küldendő minden szerkesztőségi és kiadóhivatali levelezés.

Az Acta Morphologica előfizetési ára kötetenként belföldre 80, külföldre 110 Ft. Megrendelhető a belföld számára az Akadémiai Kiadónál (Budapest V., Alkotmány utca 21. Bankszámla 05-915-111-44), a külföld számára pedig a »Kultúra« Könyv- és Hírlap Külkereskedelmi Vállalatnál (Budapest VI., Népköztársaság útja 21. Bankszámla: 43-790-057-181), vagy annak külföldi képviseleteinél és bizományosainál.

Die Acta Morphologica veröffentlichen Abhandlungen aus dem Bereiche der experimental-medizinischen Wissenschaften in deutscher, englischer, französischer und russischer Sprache.

Die Acta Morphologica erscheinen in Heften wechselnden Umfanges. Mehrere Hefte bilden einen Band.

Die zur Veröffentlichung bestimmten Manuskripte sind an die folgende Adresse zu senden:

Acta Morphologica, Budapest IX., Tűzoltó u. 58.

An die gleiche Anschrift ist auch jede für die Schriftleitung und den Verlag bestimmte Korrespondenz zu richten.

Abonnementspreis pro Band: 110 Forint. Bestellbar bei dem Buch- und Zeitungs-Außenhandels-Unternehmen »Kultura« (Budapest VI., Népköztársaság útja 21. Bankkonto Nr: 43-790-057-181) oder bei seinen Auslandsvertretungen und Kommissionären.

Department of Histology (Head : Prof. I. I. GUTNER), Medical School of Yaroslav
(Director : Prof. N. E. YARIGIN)

CHANGES OF THE NERVE CELLS IN THE HUMAN FASCICULAR, GASSERIAN AND SPINAL CERVICAL GANGLIA IN THE EXTRAUTERINE LIFE, RELATED TO AGE

S. N. SMIRNOVA

(Received December 15, 1958)

While there are some special works dealing with the ontogenetic evolution of the nerve cells in the human spinal ganglia (GUTNER, 1937, NOVITSKY, 1940, 1956), concerning similar changes of the nervous elements in the fascicular and Gasserian ganglia, only fragmentary data are to be found in the literature (KÖRNER, 1937).

We have studied ganglia of 60 children and adults, ranging from newborn infants up to very old persons (80 years of age).

Selecting the material we have left out such cases in which the anamnesis or the clinical and pathological examinations revealed diseases of the nervous system, chronic infectious diseases or a neoplastic process. Ganglia were removed within 24 hours, but in the majority of cases within 18 hours after death.

Histological sections were stained by Nissl's and Mallory's method, with hematoxylin and eosin, iron hematoxylin, and Sudan ; the ganglia were impregnated by Cajal's, Cajal—Fawrowsky's and Foot's method. In addition, unstained preparations were examined too.

Judging by the preparations stained by Nissl's method, growth of the cells is going on after birth. At the moment of birth the largest elements in the Gasserian and especially in the fascicular ganglion are somewhat smaller than the corresponding elements of spinal ganglia (36—40 × 48—56 μ).

In adult age the size of the largest elements in the intervertebral ganglia is about 105 × 7, 115 × 75 μ, while in the Gasserian ganglion — 65 × 95 μ ; the biggest cells in the fascicular ganglion are somewhat smaller than in the latter.

The size differences of the cells within the same ganglion become more and more definite with the age, as a certain part of neurons — the number of which is constantly diminishing — practically does not grow and keeps its inital diameter of 10—11 μ. Consequently, in children, and especially in adults, some nervous elements can exceed other ones ten or even hundred times in size.

After birth the overwhelming majority of nerve cells in the investigated ganglia are unipolar. The process of the cell forms a pericellular glomerulus of various complexity and then divides into two branches. In early childhood a very small number of such cells with two processes or with one process

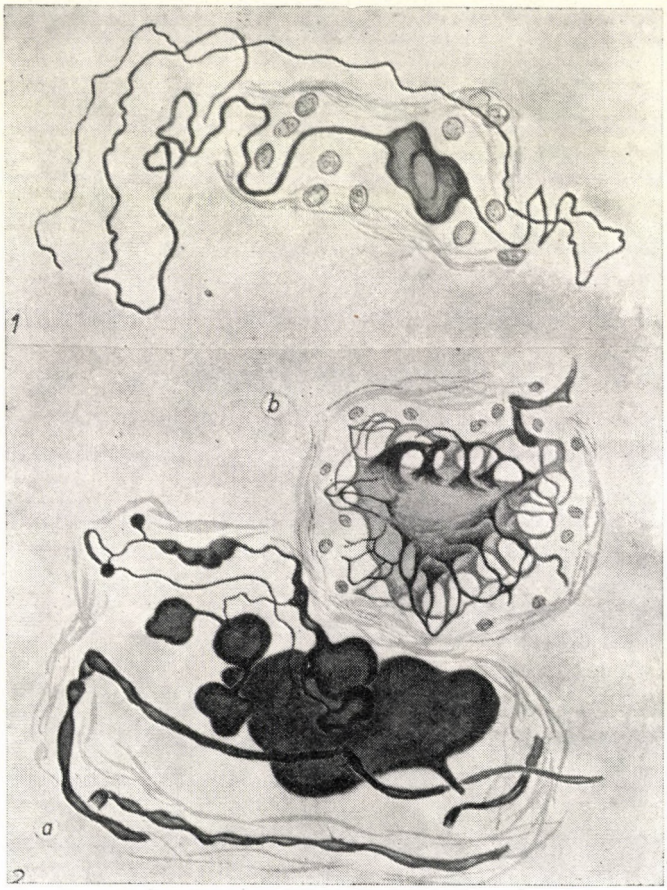


Fig. 1, 2

dividing into two branches on leaving the cell body can still be found ; later such elements are observed only exceptionally. Sometimes both processes of the bipolar cells form independent glomeruli at their beginning (Fig. 1). Bipolar elements in the fascicular ganglion are relatively more frequent.

Beside the pseudounipolar and very rare bipolar elements there are some other cellular forms too, named by us — as by DE CASTRO (1921) — "atypical" forms (Fig. 2). To this group belong the multipolar, the "complete" elements, cells with processes terminating in "end discs" a. oth.

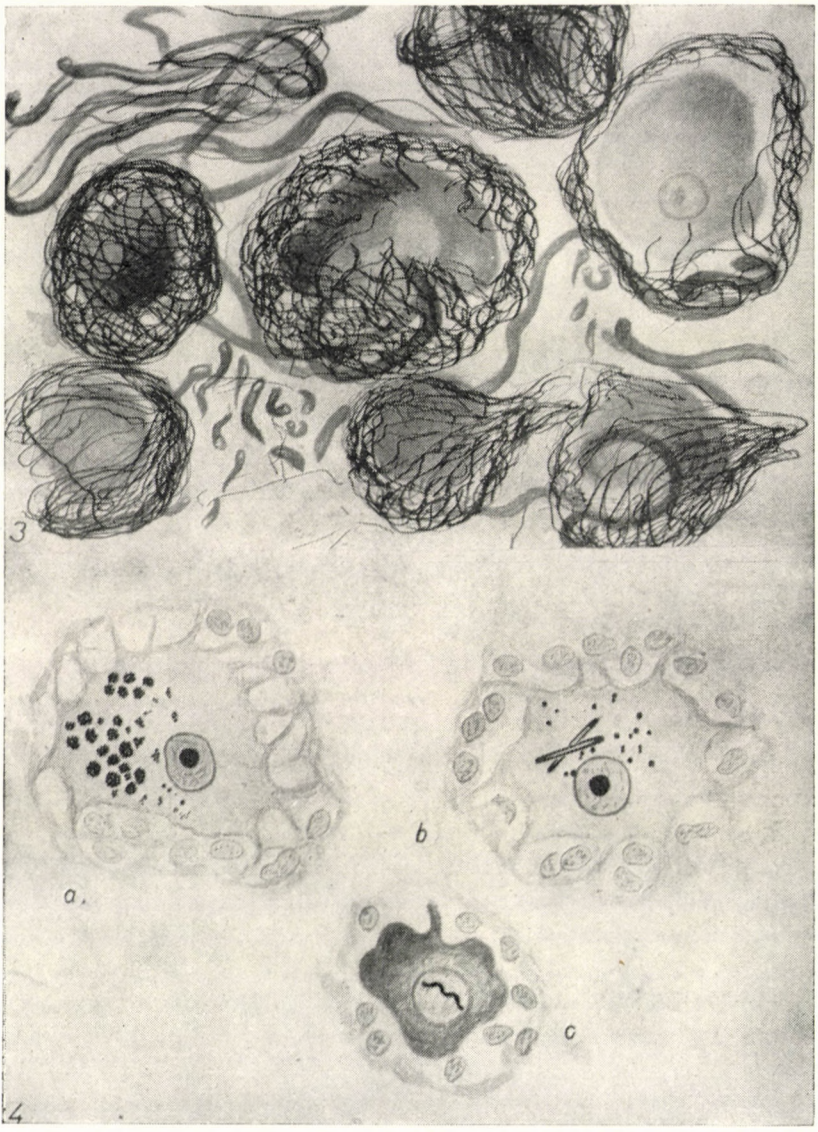


Fig. 3, 4

The number of such "atypical" forms, as well as of pericellular nets and intercellular glomeruli, with many individual variations, is undoubtedly growing with age ; and their structure becomes more and more complicated and variable. In age of about 60, groups of such formations begin to appear ; in old age fibers of one net pass into others (Fig. 3).

It is easy to recognize that the above forms correspond to several cellular types described by DOGIEL (1908). As the number of "atypical" neurons is increasing with age, and their structure becomes more and more complicated, one could suppose a progressive differentiation of special types of cells. In this case, pericellular nets and intercellular glomeruli should be regarded as gradually developing nerve endings. One should, however, be sceptical about the correctness of such an interpretation, as according to the data of several authors (NAGEOTTE, 1907, MARINESCO, 1909, LAVRENTIEV and LASAVSKY, 1931, LAVRENTIEV and FILATOVA, 1934, VEIL, 1935, 1937, PONOMAREVA, 1949, ZHABOTINSKY, 1951, 1958, MOTAVKIN, 1955), in pathologic and experimental conditions formation of accessory processes of nerve cells, appearance of "globular formations", complication and newformation of pericellular nets are to be observed inside the peripheral ganglia. Thus it seems to be more reasonable to suppose that the appearance of the above formations in the sensory ganglia, and the fact that they become more and more complicated with age is due to inadequate stimulation of the nervous system, especially of its peripheral part during life. STRUKOV and LAPIN (1956), KODOLAVA (1958), MITROFANOV (1958) a. oth. regard the appearance of such forms as compensatory adaptive changes.

Each nervous element of the investigated ganglia contains one centrically situated nucleus with an intensely staining nucleolus. In spite of the examination of many thousand preparations, we found two nuclei only in a very little number of cells, in complete agreement with the data of NOVITSKY (1940, 1956). Nuclei containing two nucleoli are observed also only exceptionally after birth. STRUKOV and LAPIN (1956), GASPARYAN (1957), KODOLOVA (1958), MITROFANOV (1958) in case of several diseases described in the sensory ganglia cells with two nuclei, and cells containing a nucleus with two or more nucleoli and regarded them as manifestations of regeneration. RAMPAN (1956) discriminates even three phases in the amitosis of nerve cells : binucleolated, binucleated and bicellular phases. On the other hand, ZHABOTINSKY (1958) questions such interpretations of the presence of two nuclei in one cell or of two nucleoli in one nucleus after birth. In our opinion, there is no convincing evidence against the assumption that both phenomena are of reminescent character, *i.e.* they occurred still in the intrauterine life. It relates especially to the multiplicity of nucleoli, what is a well-known typical sign of non-differentiated nervous elements.

Sometimes silver impregnation or staining by Mallory's method and with iron hematoxylin stains rod-like formations in the nuclei, which have been described by SMIRNOV in 1902 already, and since that time there was hardly anyone who would have mentioned them (Fig. 4). "Rods" have been observed in some few cells of the ganglia, independent of age. DE CASTRO (1922) found similar formations in the nuclei of some nerve cells of peripheral

vegetative ganglia. Discussing the frequently described and in shape somewhat similar structures of cerebral neurons, SNESAREV (1950) considered them folds of the nuclear membrane. But in contrast to the latters, the formations found by us intensively blackened by silver staining and took a bright pink colour when stained by Mallory's method. Apart from this, when using any of the above staining methods, a fusion of the "rods" with the nuclear membrane never occurred. We consider their intranuclear disposition unquestionable.

The body of nerve cells at the moment of birth is filled with Nissl's substance already. Only in a few cells of middle and small size is there an excentrically situated nucleus, and in such cells Nissl's substance is found only in the periphery; the number of such elements progressively diminishes with age.

In old age a great deal of cells appear in which staining by Nissl's method manifests massive clods in the peripheral parts and fine granules in the center ; particles of Nissl's substance are disperged and scattered, and in the same time they fuse to form large blocks around the nucleus and dislocate the latter to the periphery. With age the number of vacuolated elements increases ; they are to be seen most frequently in the fascicular ganglion. One must suppose that all these changes are of reactive and dystrophic origin.

With the years of life pigment granules of two types accumulate in the cells melanine and lipofuscine. Melanine shows the peculiar triad of features, characteristic to the pigment of the nerve cells of substantia nigra and locus coeruleus (LEVIKOVA, 1946, GUTNER and LEVIKOVA, 1949). Its granules are to be found in the neurons of intervertebral and Gasserian ganglia beginning from the age of 1 ¼ year. But the granules, from which later melanine is produced (premelanine) are to be shown by Cajal—Fawrowsky's impregnation in the first months after birth already. Accumulation of melanine in the cells progressively increases with age ; beginning from the age of 4—5 years, the pigment is disposed predominantly around the nucleus ; the number of melanine containing elements increases beginning from the later childhood insignificantly. This pigment is completely absent from the cells of the fascicular ganglion and from the largest cells of the spinal ganglia as well.

On the other hand, lipofuscine, more detailed characteristics of which are to be found in the works quoted above, in age of 9 years is accumulated in considerable quantity and is detectable in the peripheral part of several cells in all of the investigated ganglia. The number of lipofuscine containing elements, as well as the quantity of pigment in the single cells, is continually increasing.

In the first months after birth in some cells of the investigated ganglia where appears also fine granules stained with acid fuchsin, using Mallory's method. Accumulation of fuchsinophil granules progresses with age, and

sometimes the size of the single granules increases too. Distribution of the granules is disproportionate ; in some places they fuse to form blackberry-like groups (Fig. 4). The described granules appear during life in more and more nerve cells, and inside them the groups of granules themselves also become larger and larger. But we have to point out that these changes show very great individual variations. The tendency observed in earlier years, of

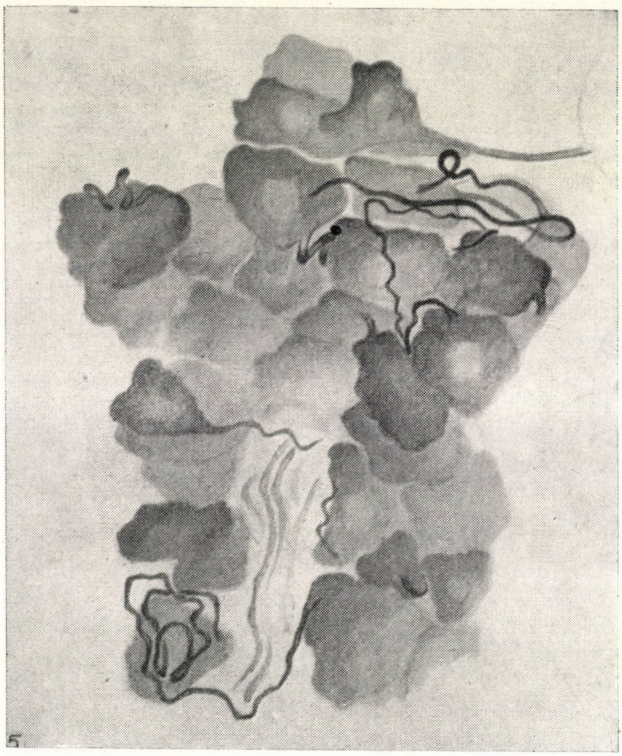


Fig. 5

the amount of the granules crease, is in old age apparently replaced by tendency to decrease. In fact, beginning from the age of about 40, and especially in very old persons, sometimes about the same quantity of granules is found as in the early childhood. Granules can occur without or together with melanine or lipofuscine. Considering this fact, the relation between pigment production and formation of fuchsinophil granules is to be questioned. Extraction of celloidine sections in a mixture of alcohol, chloroform and xylol for several days does not remove these granules, which further supports their protein nature. The fact that in the central nervous system these granules are characteristic only to certain formations (GUTNER and NOSOVA, 1951, 1952) gives

rise to the idea that the peripheral sensory neurons, containing this substance, have some specific features. An attentive study of the literature (OLMER, 1901, MARINESCO, 1909, ROUSSY and MOSINGER, 1935) leads to the conclusion that the above granules were detected originally in the brain and in the peripheral ganglia (MARINESCO, 1898).

Mallory's method and iron hematoxylin stain inside some cells of the Gasserian and intervertebral ganglia protoplasmatic structures, named by us "rods". These are usually straight or a slightly curved, long or short, thin or sometimes rabber wide ; in other cases they seem to be stuck together of such formations of smaller size. In the cells one can observe one, but sometimes two or more such structures (Fig. 4). In old persons rarely multiple "rods" are also met with. The methods used by us give no basis for any assumption about their role.

After birth all of the nerve cells in the investigated ganglia are incapsulated, and fixed by reticular fibres, the number of which is increasing with age.

In children (in the first year) we detected in some sporadic cases nerve cells tightly crammed together, such as had been described by SIBELIUS (1901), FARKAS (1942) a. oth. The elements belonging to them hardly could be regarded as neuroblasts, as it was stated by GASPARYAN (1957). They are of large size, have one curved process, their protoplasm is rich in Nissl's substance, the nucleus is situated in the center of the cell body and contains one single nucleolus (Fig. 5). Therefore it is hard to agree with the authors, who regard such cell-colonies as neurosymplasts occurring as a result of multiple incomplete amitosis (STRUKOV and LAPIN, 1956, GASPARYAN, 1957, MITROFANOV, 1958). It is not impossible that the sometimes indistinct cellular limits within these structures are due to the careless removal or preparation of the ganglia. The possibility of an artefact is supported also by the fact that a significant part of the cell bodies, constituting the colonies, is shrunken, and picnotic.

Within the capsule of the ganglia in adult, and especially in old age, there is a proliferation of nerve fibers of several calibre. This net is connected with a subcapsular net proliferating in the same time between the neighbouring nerve cells, outside the ganglion.

Summary

1. Nerve cells of the investigated ganglia after birth are unipolar and only some of them keep their bipolarity. Latter are to be met with more frequently in the ganglion nodosum.

2. In the investigated ganglia beside the pseudounipolar cells various "atypical" cells can be observed too. Their number, just like the number of peri- and intercellular nets of nerve fibres is increasing with age, and their structure becomes more and more complicated. It is to be supposed that they are of reactive origin.

3. Among the nerve cells of investigated ganglia both binuclear cells, and nuclei containing two nucleoli occur very rarely. There is no special evidence to consider either any of the above phenomena a manifestation of regeneration. In some of the neurons, the presence

of rod-like, undoubtedly intracellular formations is proved, which cannot be regarded as folds of the membrane.

4. In the nerve cells of the spinal and Gasserian ganglia two types of pigments — — melanine and lipofuscine — are detected. Accumulation of melanine takes place on the basis of premelanine granules. In the nerve cells of the fascicular ganglion only lipofuscine is to be found.

5. In some few cells of the investigated ganglia fine fuchsinophil granules are observed. They appear after birth, their accumulation increases with age, but in the age of about 40 it apparently begins to decrease.

6. In the protoplasma of nervous elements infrequently fibre-like or rod-like formations can also be found, staining with acid fuchsin using Mallory's method and with iron hematoxylin.

7. The so-called cellular "colonies" observed in sensory ganglia, consist by no means of neuroblasts and possibly occur as a result of inadequate preparation.

REFERENCES

1. DE CASTRO, F.: (1921) Estudios sobre los ganglios sensitivos del hombre en estado normal y patologico. Formas celularis tipicas y atipicas. Trab. del Labor. de invest. biol. de l'Univ. de Madrid. *19*. — 2. DE CASTRO, F.: (1922) Evolucion de los ganglios sympaticos vertebrales y prevertebrales. Trab. del Labor. de invest. biol. de l'Univ. de Madrid. *20*. — 3. Д гель А. С.: (1908) Der Bau der Spinalganglien des Menschen und der Säugetiere. Fischer. Jena. — 4. FARKAS, K.: (1940) Rückwirkungen von andauernden peripheren Reizimpulsen an den Ganglienzellen. Virchow's Arch. *309*, 780. — 5. Гаспарян, Э. И.: (1957) К морфологии процессов размножения и роста в периферических ганглиях детей, умерших от пневмонии. Архив патологии № *12*, 66. — 6. Гутнер, И. И.: (1937) О возрастных изменениях нервных элементов спинномозговых узлов. Сборник трудов, посв. 40-летию деятельности проф. Тонкова, 358. Медгиз. — 7. Гутнер, И. И. и Левикова, А. М.: (1949) О меланинсодержащих нервных клетках мозга человека. Доклады Академии Наук СССР. 68. — 8. Гутнер, И. И. и Носова, Г. Д.: (1951) Об особой зернистости в нервных клетках мозга человека. Доклады Академии Наук СССР. *77*. № 1. — 9. Гутнер, И. И. и Носова, Г. Д.: (1952) О возрастных изменениях особой «функциональной» зернистости нервных клеток мозга человека. Доклады Академии Наук СССР. *85*. № 1. — 10. Кодолова, М. М.: (1958) Сравнительная оценка изменений различных отделов нервной системы при некоторых заболеваниях легких. Архив патологии № *2*. *34*. — 11. KÖRNER, F.: (1937) Variationsstatistische Untersuchungen über die Grösse der Kerne und des Kernkörperchens menschlicher Nervenzellen. Zeitschr. f. mikr. anat. Forsch. *42*, 81. — 12. LAWRENTIEV, B. I.—LASAWSKIJ, I. M.: (1931) Ueber die Reizerscheinungen im autonomen Nervensystem. Die Natur des sogenannten »Kugelphaenomens«. Zeitschrift f. die ges. Neur. u. Ps. *131*, 589. — 13. Лаврентьев, Б. И. и Филатова, А. Г.: (1934) Патологическая гистология нервных окончаний при туберкулёзе. Бюллетень ВИЭМ № 10. 11. — 14. Левикова, А. М.: (1946) О возрастных изменениях пигментированных нервных элементов substantiae nigrae, loci coerulei и areae cinereae, Архив патологии 8, № *4*. — 15. MARINESCO, G.: (1904) La cellule nerveuse. — 16. Митрофанов, В. С.: (1958) Изменения некоторых отделов периферической нервной системы при экспериментальной почечной гипертонии. Архив патологии № *2*. 21. — 17. Митрофанов, В. С.: (1958) Компенсаторные изменения нейронов узловатых ганглиев при гипертонической болезни. Архив патологии № *5*, 33. — 18. Мотавкин, П. А.: (1955) Гистологические изменения нервных элементов поясничных и крестцовых спинномозговых узлов при травме седалищного нерва. Дисс. Ярославль. — 19. NAGEOTTE, J.: (1907) A propos de l'influence de la pression osmotique sur le développement des prolongements nerveux dans les greffes ganglionnaires. C. Rend. Soc. Biol. *63*, 71. — 20. Новицкий, И. С.: (1940) О возрастных изменениях периферической нервной системы спинальных ганглиев, корешков и седалищного нерва. Труды Омского мед. института, № *7*. 50. — 21. Новицкий, И. С.: (1956) О возвратной морфологии спинальных ганглиев человека. Реф. научн. работ об-ва анатомов, гистологов, эмбриологов Омского отд. — 22. OLMER, C.: (1901) Recherches sur les granulations de la cellule nerveuse. Lyon. — 23. Пономарева, В. Н.: (1949) Превращение межпозвоночных узлов зародышей человека в условиях тканевых культур. Доклады Академии Наук СССР. — 24. Рамшан, И. И.: (1956) О делении нервных клеток. Проблемы морфологии нервной системы. Медгиз. — 25. ROUSSY, G. et M. MOSINGER: (1935) Sur la neuro-

nolyse physiologique dans l'hypothalamus des mammiféres. C. R. Soc. Biol. *118*. 414. — 26. Roussy G. et M. Mosinger: (1946) Traité de Neuroendocrinologie. Paris. — 27. Sibelius, C.: (1901) Zur Kenntnis der Entwicklungsstörungen der Spinalganglien bei hereditaer luetischen, missbildeten und anscheinend normalen Neugeborenen. Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde, *20*, NI—2, 35—64. — 28. Смирнова, А. С.: (1902) О строении нервных клеток спинальных узлов у четырёхмесячного эмбриона человека. Журнал нерв. и псих. № 3. — 29. Струков, А. И. и Лапин, С. К.: (1956) Морфология компенсаторно-приспособительных процессов в нервной системе. Архив патологии № *8*. 21. — 30. Вайль, С. С.: (1935) О поражениях спинного мозга и межпозвоночных узлов при сепсисе. Архив пат. анат. и пат. физ. *1*. 58. — 31. Вайль, С. С.: (1937) Изменения нервного аппарата желудка и кишок при туберкулёзе. Архив пат. анат. и пат. физ. *3*. 34. — 32. Жаботинский, Ю. М.: (1951) О ретроградных изменениях в нервных клетках чувствительных ганглиев. Доклады Академии Наук СССР. *80*, № 1 и № 2. — 33. Жаботинский, Ю. М.: (1953) Нормальная и патологическая морфология вегетативных ганглиев. И-во Ак. Мед. Наук СССР. М. (1953). — 34. Жаботинский, Ю. М.: (1958) О делении нервных клеток в центральной нервной системе человека и млекопитающих. Архив анат., гист. и эмбриол. 35, № *3*. 19.

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ НЕРВНЫХ КЛЕТОК ПУЧКОВИДНОГО, ГАССЕРОВА И ШЕЙНЫХ СПИННОМОЗГОВЫХ УЗЛОВ У ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ РОЖДЕНИЯ

С. Н. СМИРНОВА

1. Нервные клетки исследованных узлов после рождения одноотростчаты, и лишь единичные сохраняют биполярность. Последние чаще наблюдаются в g. nodosum.

2. Кроме псевдоуниполярных, в исследованных ганглиях наблюдаются разнообразные «атипичные» клетки. Содержание их, как и около- и межклеточных сплетений нервных волокон с возрастом увеличивается, а строение усложняется. Можно предполагать их реактивное происхождение.

3. В ядрах нервных клеток исследованных узлов двуядерность наблюдается исключительно редко, а наличие двух ядрышек весьма редко. Считать то и другое проявлением регенерации особых оснований нет. В единичных нейронах можно наблюдать присутствие несомненно внутриядерных образований палочковидной формы, которые нельзя рассматривать как складку оболочки.

4. В нервных клетках спинномозговых и Гассерова узлов замечается пигмент двух родов — меланин и липофусцин. Меланин откладывается на основе зерен премеланина. В нервных клетках пучковидного узла обнаруживается только липофусцин.

5. В небольшом числе клеток исследованных узлов замечается отложение «фуксинофильной» зернистости. Она появляется после рождения, накопление её с возрастом увеличивается, а с сорока примерно лет начинает, видимо, убывать.

6. У редких нервных элементов в протоплазме могут быть найдены нитовидные или «палочковидные» образования, красящиеся кислым фуксином по Маллори и железным гематоксилином.

7. Наблюдаемые в чувствительных узлах так называемые клеточные «колонии» отнюдь не состоят из невробластов и, возможно, возникают в результате инадекватной обработки.

VERÄNDERUNGEN IM LAUFE DES LEBENS VON NERVENZELLEN BÜNDELARTIGER, GASSER- UND HALS-SPINALGANGLIEN BEIM MENSCHEN NACH DER GEBURT

L. N. SMIRNOWA

1. Die Nervenzellen der untersuchten Ganglien weisen nach der Geburt nur einen Fortsatz auf und bloß einzelne Zellen bewahren ihre Bipolarität. Die letzteren sind öfters im G. nodosum zu beobachten.

2. In den untersuchten Ganglien konnten außer den pseudounipolaren verschiedenartige »atypische« Zellen beobachtet werden. Ihr Vorkommen, sowie auch dasjenige der para- und interzellulären Nervengeflechte nimmt mit dem Alter zu, ihre Struktur wird komplizierter. Ihre Entstehung erfolgt vermutlich reaktiv.

3. In den Zellkernen der untersuchten Ganglien sind außerordentlich selten zwei Kerne zu beobachten, das Vorhandensein von zwei Kleinkernen ist höchst selten. Wir haben keine Ursache die eine oder die andere Erscheinung als Regeneration anzusehen. In einzelnen Neuronen kann das Vorhandensein von stäbchenförmigen Bildungen unzweideutig im Kerninneren beobachtet werden, die nicht als Membranfalten angesehen werden können.

4. In den Nervenzellen der G. spinalia und G. Gasseri sind zweierlei Pigmente zu bemerken — Melanine und Lipofuscin. Melanine lagern sich am Grund der Prämelaninekörnchen ab. In den Zellen der bündelartigen Ganglien ist nur Lipofuscin vorhanden.

5. In einer geringen Anzahl von Zellen der untersuchten Ganglien ist die Ablagerung »fuchsinophiler« Körnung zu beobachten. Sie tritt nach der Geburt in Erscheinung, ihre Anhäufung nimmt mit dem Alter zu, und im Alter von ung. 40 Jahren beginnt sie sich anscheinend zu verringern.

6. Bei einigen seltenen Nervenelementen können im Protoplasma fäden- oder »stäbchenförmige« Bildungen gefunden werden, die mit sauerem Mallory-Fuchsin und Eisenhämatoxylin gefärbt werden können.

7. Die in den Gefühlsganglien wahrnehmbaren sog. »Zellenkolonien« bestehen keineswegs aus Neuroblasten und entstehen vermutlich infolge einer inadäquaten Bearbeitung.

С. Н. СМИРНОВА, СССР. Ярославль, Революционная ул., Д. 5.

Lehrstuhl für Anatomie (Inhaber: Prof. I. M. AISENSTEIN) des Medizinischen Institutes (Direktor: Prof. I. W. SIDORENKOW) Orenburg (SSSR)

DER DUCTUS THYREOGLOSSUS UND SEINE DERIVATE IN DER POSTNATALEN PERIODE (ANATOMIE UND SYNTOPIE)

K. P. BOGDANOW

(Eingegangen am 29. Dezember 1958)

Einleitung

Sehr viele Arbeiten beschäftigen sich mit dem Ductus thyreoglossus, doch ihre Mehrzahle hat einen klinischen Charakter. Anatomische Untersuchungen gelangten nur in geringer Zahl zur Veröffentlichung.

HIS [8], STRECKEISEN [21], ERDHEIM [5], WENGLOWSKI [24, 25, 26], FISCHEL [6] und andere Verfasser untersuchten den Ductus thyreoglossus, und erbrachten den Nachweis, daß er im Laufe der Entwicklung des medialen Schilddrüsenlappens entsteht.

Gemäß den Untersuchungen von HIS [8] kann der obere Teil des Ductus thyreoglossus in Form eines aus dem Foramen coecum linguae in die Zunge in Richtung des Zungenbeins 2—2,5 cm tief eindringenden Kanals während des ganzen Lebens erhalten bleiben. OMBRÉDANNE [17], SULICKA [20] und andere nannten diesen Kanal nach dem Namen des ihn zum erstenmal beschreibenden Verfassers — Ductus excretorium linguae Bochdalek. HIS [8] nennt ihn Ductus lingualis.

WENGLOWSKI [25] ist der Ansicht, daß zwischen dem Ductus lingualis und dem Ductus thyreoglossus keinerlei Zusammenhang besteht, und daß der erstere sich in einer späteren Periode des embryonalen Lebens aus dem den Mundboden auskleidenden und in die Tiefe eindringenden Epithel entwickelt.

Hinsichtlich der weiteren Einzelheiten ist der gleiche Verfasser der Meinung [25], daß der Ductus thyreoglossus bei Menschen überhaupt nicht vorkommt, an seiner Stelle sei bloß ein Tractus ohne Lumen zu beobachten. Im späteren schloß sich zwar HIS [8] auch der Meinung WENGLOWSKI's an, doch blieb statt der richtigeren Benennung Tractus thyreoglossus, der Termin Ductus thyreoglossus im Gebrauch, und in der gegenwärtigen Arbeit wollen wir ihn auch beibehalten.

Gemäß FISCHEL [6] hat der Ductus thyreoglossus zu Beginn ein Lumen, doch beim 5 mm langen Embryo schließt sich das Lumen und es entsteht ein epithelialer Tractus. Beim 7 mm Embryo zerfällt dieser in einzelne Zellenstränge, und verschwindet größtenteils gänzlich. BILL [1] ist der Meinung,

daß der Ductus thyreoglossus solange ein Lumen habe, bis die Schilddrüse nicht seine normale Lage erreicht, wonach das Lumen sich schließe, doch könne es vorkommen, daß er auch weiterhin bis zu der Zungenwurzel offen bleibe.

Djakonow und Lysenkow [4], Wenglowski [24] und Tonkow [23] weisen (ohne Berufung auf eigenes Material) darauf hin, daß der Ductus thyreoglossus manchmal für das ganze Leben erhalten bleibt. In der Literatur fanden wir bloß die Beschreibung eines einzigen Falles, wonach Reste des Ductus thyreoglossus vom Foramen coecum linguae bis zum medialen Schilddrüsenlappen bei einem Neugeborenen beobachtet wurden (Erdheim [5]).

Hinsichtlich des Verhältnisses des Ductus thyreoglossus zum Zungenbein finden wir folgende Angaben.

His [8] nimmt an, daß der Ductus thyreoglossus entweder hinter dem Zungenbein liege, oder den Corpus ossis hyoidei durchdringe. Wenglowski [24, 25, 26] behauptete anfangs, daß der Ductus thyreoglossus niemals das Zungenbein durchdringe, doch später änderte er seine Ansicht. Streckeisen [21] und Raspopow [19] glauben, daß der Ductus thyreoglossus vor dem Corpus ossis hyoidei verläuft. Gemäß Bill [1] und Wildenberg [28] kann der Ductus thyreoglossus sowohl hinter, als auch vor dem Zungenbein verlaufen, bzw. denselben durchdringen.

Schließlich gelangte Kanthack [10] im Jahre 1891 bei der Untersuchung der Leichen von 100 Erwachsenen, sowie 60 Embryonen und Kinder (von zweieinhalb bis zu acht Monaten) zu der Feststellung, daß der Ductus thyreoglossus gar eine Rolle bei der Entwicklung der Schilddrüse spiele. Er ist der Ansicht, daß der Ductus thyreoglossus im Ergebnis von »pathologischen Zungengeschwülsten«, die aus den Schleimdrüsen der Zungenwurzel und des Zungenbeins ausgehen, entsteht.

Die Derivate des Ductus thyreoglossus wurden nur von einer geringen Anzahl von Verfassern untersucht, Wenglowski [24] führt bloß allgemeine Angaben an, und erwähnt, daß solche nur bei 1/3 der von ihm untersuchten Fällen vorkamen. Erdheim [5] und Wildenberg [28] sind der gleichen Ansicht. Hinsichtlich der Lagerung dieser Derivate, sowie ihres Lageverhältnisses zu den benachbarten anatomischen Organen fanden wir in der Literatur keine Hinweise.

Material und Methoden

Wir haben 100 Leichen (von 90 Erwachsenen und zehn Kindern [von zwei Monaten bis 7 Jahren]) untersucht. Das Material wurde in 10%-igem Formalin fixiert.

Die Untersuchungen wurden mit dem üblichen präparativen Verfahren zuerst mit freiem Auge danach mit dem makromikroskopischen Verfahren von *Worobjew* mit Hilfe des Stereomikroskops MBS—1 durchgeführt.

Die Schilddrüse, sowie die Vorderfläche des Schildknorpels und des Ligamentum hyothyreoideum medium, die Zungenbeingegend, ferner die Zungenwurzel bis zum Foramen coecum linguae wurden schichtweise herauspräpariert.

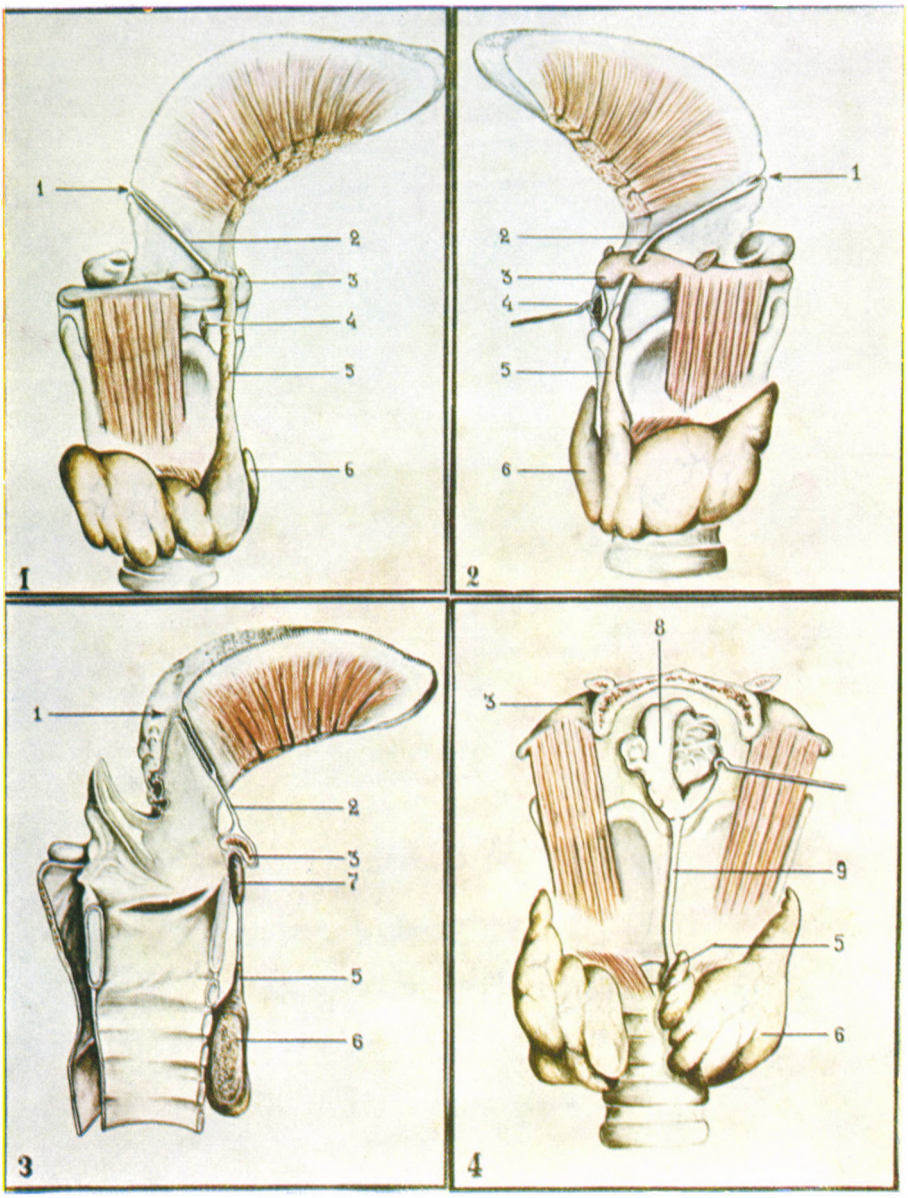


Abb. 1. Dem Zungenbeinkörper vorgelagerter Ductus thyreoglossus
Abb. 2. Den Zungenbeinkörper durchdringender Ductus thyreoglossus
Abb. 3. Vom Zungenbeinkörper und von der akzessorischen Schilddrüse unterbrochener Ductus thyreoglossus
Abb. 4. Zyste bei dem Ende des Ligamentum suspensorium processus pyramidalis
1. — Foramen coecum linguae ; 2. — Ductus thyreoglossus ; 3. — Os hyoideum ; 4. — Bursa retrohyoidea ; 5. — Processus pyramidalis glandulae thyreoideae ; 6. — Glandula thyreoidea ; 7. — akzessorische Schilddrüse ; 8. — Zyste (eröffnet) ; 9. — Ligamentum suspensorium processus pyramidalis.

Die Untersuchung von 20 Präparaten erfolgte an Querschnitten. Zur genauen Feststellung von Einzelheiten wurden an 43 der obigen Präparate auch histologische Untersuchungen vorgenommen.

Besprechung der Ergebnisse

Im vorhergehenden wurde bereits erwähnt, daß nur ERDHEIM [5] an einem neugeborenen Kinde persistierenden Ductus thyreoglossus feststellen konnte. Dank unseren eigenen Untersuchungen sind wir in der Lage hinsichtlich dieser Frage einige ergänzende Daten hinzuzufügen.

In einem Falle fanden wir einen runden, weißen, 2,7 cm langen, an seinen verschiedenen Teilen gemessen 2—3 mm breiten Strang. Er begann beim Foramen coecum linguae, und verlief in der Mittellinie zwischen den Musculi genioglossi. Der Strang war mit den letzteren nicht verwachsen, und konnte stumpf ohne Schwierigkeit ausgehoben werden. Unten war er mit der Spitze des Processus prymidalis glandulae thyreoideae fest zusammengewachsen und ging in die Scheide der Schilddrüse über. Der Processus pyramidalis begann bei dem Isthmus glandulae thyreoidae und verlief in der Mittellinie vor dem Corpus ossis hyoidei bis zum oberen Ende des letzteren (Abb. 1).

Eine in das Foramen coecum linguae eingeführte Sonde drang in einen 2 cm langen Kanal ein. Der Strang wurde längs aufgeschnitten. Im Stereomikroskop konnte bei verschiedenen Vergrößerungen festgestellt werden, daß der aborale Teil (0,7 cm) des 2,7 cm langen Stranges kein Lumen hat.

Im zweiten Fall fanden wir einen ähnlichen Strang, der bei dem Foramen coecum linguae begann, und in der Mittellinie nahe der Vorderfläche des Corpus ossis hyoidei den letzteren durchdrang und an der Spitze des Processus pyramidalis glandulae thyreoideae endete (Abb. 2). Letzterer befand sich auf dem Niveau des oberen Randes vom Schildknorpel. Der Strang war 4,9 cm lang. Die Länge des oberhalb des Zungenbeins verlaufenden Teiles betrug 3,9 cm, und des Teiles zwischen dem Zungenbein und der Spitze des Processus pyramidalis — 0,7 cm. Der innerhalb des Corpus ossis hyoidei verlaufende Teil war 3 mm lang. Der Strang war nirgends breiter, als 1,5 mm. Die in das Foramen coecum linguae eingeführte Sonde drang ungehindert in eine Tiefe von 4 mm ein. Unter dem Stereomikroskop konnte im unteren Abschnitt kein Lumen gefunden werden.

In unserem dritten Fall konnte der Verlauf eines ähnlichen Stranges vom Foramen coecum linguae bis zum oberen Rand des Corpus ossis hyoidei verfolgt werden, wo er mit dem Periost eng verwachsen war. Der Corpus ossis hyoidei wurde im Stereomikroskop untersucht, doch konnten innerhalb der Zungenbeins keine Elemente des Stranges nachgewiesen werden. Die Länge des Stranges betrug 2,6 cm, die Breite — 2 mm. Die in das Foramen coecum linguae eingeführte Sonde drang in eine Tiefe von 1 cm ein. Eng anliegend zur hinteren konkaven Fläche des Corpus ossis hyoidei war eine längliche

akzessorische Schilddrüse von 1,1—0,4 cm zu sehen. Sie befand sich auf den vorderen Oberflächen des Ligamentum hyothyreoideum medium, sowie des Schildknorpels in der Mittellinie, und endete 0,5 cm unter dem oberen Rand dieses Schildknorpels. Vom kaudalen Ende der akzessorischen Schilddrüse verlief abwärts ein 1,4 cm langer weißer Strang, der an der Spitze des Processus pyramidalis der Schilddrüse endete (Abb. 3).

In allen drei beschriebenen Fällen wurde demzufolge ein vom Foramen coecum linguae zum Processus pyramidalis thyreoideae führender Strang entdeckt.

Aus dem Verlauf, der Form dieser Stränge, ferner auf Grund ihres Zusammenhanges mit dem medialen Schilddrüsenlappen konnte festgestellt werden, daß diese Stränge dem persistierenden Ductus thyreoglossus entsprechen. Besonders überzeugend ist der Fall, in welchem der Strang durch die akzessorische Schilddrüse und durch das Zungenbein unterbrochen war. Im zweiten Fall durchdrang der Ductus thyreoglossus den Corpus ossis hyoidei, was dadurch erklärt werden kann, daß die Verknöcherung des Zungenbeins, das dem Abkömmling des zweiten visceralen Bogens entspricht, erst später, wenn der Ductus thyreoglossus sich bereits entwickelt hat, erfolgt, und daher im Verlauf der Verknöcherung der Knochen den letzteren periferisch umwächst.

In einem solchen Fall kann der Ductus thyreoglossus auf drei Teile geteilt werden: auf den Pars suprahyoidea — vom Foramen coecum linguae bis zum Zungenbein, auf den im inneren des Corpus ossis hyoidei verlaufenden Pars intrahyoidea, und auf den Pars infrahyoidea — vom Zungenbein bis zum Processus pyramidalis glandulae thyreoideae.

Die drei beschriebenen Fälle des persistierenden Ductus thyreoglossus widerlegen die Ansicht Wenglowskis [25], wonach der Ductus lingualis in keinem Zusammenhang mit dem Ductus thyreoglossus steht. Ferner widerlegen sie auch die Behauptung von Kanthack [10], der die Rolle des Ductus thyreoglossus in der Entstehung der Schilddrüse abstreitet. Das Vorhandensein des im anfänglichen Teil des Stranges gefundenen mehr oder weniger langen Lumens (1—2 cm) beweist, daß der Ductus thyreoglossus im Anfangsstadium der Entwicklung der Schilddrüse einen Hohlraum aufweist, dessen Obliteration nicht immer erfolgt, worauf auch manche Verfasser hinweisen, (Fischel [6], Bill [1] und andere), vielmehr kann er auch im postnatalen Leben seinen Hohlraum beibehalten.

Das folgende, im untersuchten Gebiet vorkommende Gebilde war der mediale Schilddrüsenlappen (Processus pyramidalis) der gleichfalls zu den Derivaten des Ductus thyreoglossus zugezählt werden kann. Die Mehrzahl der Verfasser ist der Ansicht, daß der Processus pyramidalis in 33% der Fälle vorkommt (Solotuchin [32], Tonkow [23], Lubocki [14] und andere). Tschaussow [30] konnte im Laufe seiner Untersuchungen in 50% der Fälle,

WENGLOWSKI [24] in 67%, LYSENKOW, BUSCHKOWITSCH und PRIWES [15] in »annährend« 75% der Fälle den Processus pyramidalis nachweisen.

Im Laufe unserer eigenen Untersuchungen fanden wir den Processus pyramidalis in 48% der Fälle. In 22 Fällen ging er aus dem linken Schilddrüsenlappen aus, in 15 — aus dem Isthmus und in 11 — aus dem rechten Lappen. Fast in sämtlichen Fällen wich er von der Mittellinie etwas ab, und endete in verschiedenen Höhen.

In 15 Fällen erreichte der Processus pyramidalis kein bedeutendes Ausmaß, seine Spitze befand sich 0,5—1—2 cm unter dem oberen Rand der Schildknorpel. In 19 Fällen erreichte er den oberen Rand des Schildknorpels und in 13 Fällen endete er hinter dem Zungenbein, enganliegend am Körper des Os hyoideum. In einem unserer oben beschriebenen Fälle verlief der Processus pyramidalis vor dem Corpus ossis hyoidei in der Mittellinie und seine Spitze befand sich auf der Höhe des oberen Randes vom Zungenbein (Abb. 1).

An der Vorderseite wurde der Processus pyramidalis glandulae thyreoideae vom Musculus sterno-hyoideus verdeckt. Dahinter befand sich der Schildknorpel, während in den Fällen, in denen der Fortsatz höher als der Schildknorpel verlief, hinter ihm das Ligamentum hyothyreoideum zu finden war.

Die Form, sowie die Größe des Processus pyramidalis waren verschieden. In einigen Fällen war er breit und flach, in anderen rund oder wies er Knoten und Einschnürungen auf.

In sämtlichen Fällen war der Processus pyramidalis mit dem Zungenbein verbunden. In den Fällen, wo die Spitze des Processus pyramidalis das Zungenbein nicht erreichte, wurde die Verbindung durch einen Strang hergestellt.

In der Literatur fanden wir die Beschreibung eines solchen Stranges, der seines Verlaufes entsprechend benannt wurde: Ligamentum zwischen den Spitzen des Processus pyramidalis glandulae thyreoideae und den Zungenbeinkörper (BRUCH [3] und WENGLOWSKI [25]). Dieser Strang entsprach dem von uns als Pars infrahyoidea bezeichneten Teil des Ductus thyreoglossus. Dieser Strang wird als das den Processus pyramidalis der Schilddrüse tragende Band (Ligamentum suspensorium processus pyramidalis, LEWIT [12]) genannt.

Es gelang uns dieses Band in 34 Fällen nachzuweisen. Es hatte das Aussehen eines dünnen (1—2 mm) weißen, runden Stranges. Seine Länge hing im allgemeinen von der Höhe des Processus pyramidalis der Schilddrüse ab.

In der Mehrzahl der Fälle (29%) erstreckte sich das Ligamentum suspensorium processus pyramidalis auf die hintere Fläche des Zungenbeins, und verlief dem Zungenbeinkörper eng anliegend der Mittellinie entlang, und war mit dem Periost verwachsen. In zwei Fällen wich der obere Teil des Bandes von der Mittellinie ab, u. zw. in dem einen Fall nach links, im zweiten

nach rechts, jedoch in beiden Fällen einen mit der konvexen Hälfte nach oben gerichteten Bogen bildend.

In 5 Fällen endete das Ligamentum suspensorium processus pyramidalis unter dem Zungenbein in einer Erweiterung, die gleichfalls der hinteren konkaven Fläche des Zungenbeins eng anlag. In der Erweiterung fanden wir eine Höhlung, die entweder eine durchsichtige geleeartige gelbliche Masse, oder eine dick flüssige, trübliche weiße Flüssigkeit enthielt.

Die Höhlenwände, deren Dicke 1 mm nicht überstieg, waren — den histologischen Untersuchungen entsprechend — in sämtlichen Fällen mit einem mehrschichtigen Plattenepithel ausgekleidet. Auf Grund dieser Feststellung kann die Höhlung zu den zystenartigen Gebilden zugezählt werden.

Die Form dieser Zysten war größtenteils oval, seltener rund. Ihr Durchmesser variierte gleichfalls von 5 mm bis zu 1,8 cm. Die Innenwände der Zysten waren in zwei Fällen glatt, in zwei anderen zeigten sie eine kleinere-größere Anzahl von Vertiefungen (Buchten) und Taschen (Abb. 4.). In einem Fall stellte die Zyste einen Haufen von unzähligen kleinen Fächern mit geleeartigem Inhalt dar.

Da die Zysten entlang der Mittellinie des Halses lagen, ferner infolge ihres engen Zusammenhanges mit dem Processus pyramidalis der Schilddrüse im Wege des Ligamentum suspensorium processus pyramidalis können wir sowohl die Zysten, als auch das Ligamentum suspensorium processus pyramidalis zu den Derivaten des Ductus thyreoglossus zuzählen.

Solche zystenähnliche Gebilde wurden nur von einigen Verfassern beschrieben (Wenglowski [25], Streckeisen [21], Bruch [3]). Doch finden wir in diesen Arbeiten keine ausführliche Darlegung ihrer Form, der Lage und des Verhältnisses zu den benachbarten anatomischen Gebilden.

In unserem Material fanden wir in einem Fall eine Zyste von 1,2 cm $\times$ 1,6 cm, die aus einem Haufen unzähliger kleiner Fächer bestand, und sich am unteren Rande des Zugenbeinkörpers in einer größeren Höhlung mit glatten mattfarbigen Wänden befand. Im Lumen derselben war wenig, klare Flüssigkeit vorhanden, welche die Zyste umspülte. Die hystologische Untersuchung der Höhlenwände zeigte das Vorhandensein von einem einschichtigen Plattenepithel. Auf Grund der Lage und der histologischen Untersuchungsergebnisse wurde festgestellt, daß diese Höhle dem Schleimbeutel des Zungenbeins — der Bursa retrohyoidea — entspricht.

In einem anderen Fall haftete die 1 $\times$ 1 cm große Zyste eng an der Vorderwand des Schleimbeutels vom Zungenbein und konnte nicht auf stumpfen Wege losgelöst werden.

Im dritten Fall fanden wir zwei nebeneinander liegende Zysten gleicher Größe (0,5 $\times$ 0,5 cm), die einerseits der hinteren Oberfläche des Zungenbeinkörpers der Mittellinie entsprechend, anderseits — der Vorderwand des Schleimbeutels eng anhafteten.

Neben den im vorhergehenden beschriebenen Beziehungen der zystenartigen Gebilde zum Schleimbeutel des Zungenbeins, zeigte der letztere auch einen engen Kontakt mit anderen anatomischen Gebilden, die gleichfalls Derivate des Ductus thyreoglossus darstellten. Dieser Zusammenhang konnte mit dem Ligamentum suspensorium processus pyramidalis in 29%, und mit dem Processus pyramidalis in 13% der Fälle nachgewiesen werden. Im letzteren Fall nur dann, wenn der Processus pyramidalis den Zungenbeinkörper erreichte (Abb. 1, und 2). Der Schleimbeutel des Zungenbeins befand sich in sämtlichen Fällen hinter diesen Gebilden und seine Vorderwand war mit den letzteren fest verwachsen.

In dem von uns untersuchten Gebiet hatten außerdem die manchmal nachweisbaren akzessorischen Schilddrüsen das Interesse der Forscher erweckt. Diese Gebilde können gleichfalls zu den Derivaten des Ductus thyreoglossus zugezählt werden. Die akzessorischen Schilddrüsen wurden von vielen Verfassern beschrieben (Testut und Jakob [22], Fischer [7], Wölfler [29], Luschka [13], Streckeisen [21] Zuckerkandl [33]). Gemäß der Beschreibung dieser Verfasser können die akzessorischen Schilddrüsen — beginnend vom Foramen coecum linguea bis zu den Schilddrüsen einschließlich auf jeder beliebigen Höhe vorkommen. Indessen findet man sie in der Mehrzahl der Fälle in der Nachbarschaft des Zungenbeins. Streckeisen [21] beschrieb akzessorische Schilddrüsen innerhalb des Zungenbeinkörpers (Glandula thyreoidea accessoria intrahyoidea).

In unserem Material gelang es uns in 9% der Fälle akzessorische Schilddrüsen nachzuweisen, die sich in der Regel an der vorderen Oberfläche der Membrana hyothyreoidea unter dem Zungenbein befanden, gelegentlich mit ihrem oberen Teil der hinteren Oberfläche des Zungenbeinkörpers eng anhaftend. In selteneren Fällen wurden sie der Mittellinie entlang, oder etwas lateral auf der Vorderfläche des Schildknorpels gefunden.

In 5 Fällen waren die akzessorischen Schilddrüsen mit Hilfe eines dünnen weißen Stranges mit dem Processus pyramidalis verbunden.

In 8 Fällen wiesen diese Drüsen einen engen Kontakt mit dem Schleimbeutel des Zungenbeins auf und hafteten an seiner Vorderwand.

Die oben beschriebenen Beziehungen der Derivate des Ductus thyreoglossus (Processus pyramidalis glandulae thyreoideae, Ligamentum suspensorium processus pyramidalis, Zysten, akzessorische Schilddrüsen) zum Schleimbeutel veranlaßten uns zur Untersuchung des letzteren.

Wir studierten die diesbezügliche Literatur und fanden nur bei einigen, sich mit der Untersuchung dieses Beutels befassenden Verfassern entsprechende Hinweise. In der uns zugänglichen Literatur fanden wir keine ausführliche Beschreibung der Anatomie, Topographie und der Variationen der Bursa retrohyoidea, ausgenommen die Feststellung, daß dieser Schleimbeutel ein- oder mehrfächerig vorkommt (Tschaussow [30], Fischer [7] und andere), ferner, daß

der in der Gegend des Zungenbeins befindliche Schleimbeutel eine zystöse Umwandlung aufweisen kann (VERNEUIL [27], TSCHAUSSOW [30], LUSCHKA [13], JORDAN [9], SCHWARTZ [31], BLANKSTEIN [2]).

An Hand unserer Präparate fanden wir die Bursa retrohyoidea in 75 Fällen. Sie befand sich zwischen dem Ligamentum hyothyreoideum medium und dem Zungenbeinkörper. Das erstere befand sich hinter, der letztere vor der Bursa. In der Mehrzahl der Fälle erreichte der untere Rand des Schleimbeutels den oberen Rand des Schildknorpels, und hie und da lagerte die Bursa sogar auf der vorderen Fläche des Schildknorpels.

In der Mehrzahl der Fälle war der Schleimbeutel rund und in anteroposteriorer Richtung erschien er in Form einer schmalen Spalte. Der Querschnitt schwankte zwischen 0,5 bis 2,5 cm. Wir möchten bemerken, daß diese Maße möglicherweise kleiner sind als in der Wirklichkeit, da die Messungen an formalinfixierten Präparaten erfolgten.

Im Laufe unserer Untersuchungen wurden die folgenden Typen der Bursa retrohyoidea festgestellt:

1. In 66 Fällen erwies sich die Bursa als eine größtenteils asymmetrische solitäre Höhle, von ovaler Form mit längerem Vertikaldurchmesser.

2. In 9 Fällen fanden wir nicht einen, sondern zwei oder mehrere (bis zu 6) Schleimbeutel verschiedener Größen, asymmetrisch gelagert und vollkommen unabhängig voneinander.

3. Der innere Aufbau der Bursa zeigte gleichfalls verschiedene Typen;

a) in sechsundzwanzig Fällen waren die Innenwände glatt und gleichmäßig;

b) in 6 Fällen hingen von der Innenwand der Bursa einzelne Zotten frei in die Höhle der Bursa herab, in verschiedener Menge und in unterschiedlicher Form. In einzelnen Fällen waren sie mit freiem Auge zu sehen, in anderen — nur bei verschiedener Vergrößerung im Stereomikroskop.

c) in 43 Fällen befand sich im Inneren der Bursa retrohyoidea eine größere oder geringere Anzahl (von 2—3 bis zu 15 und sogar mehr) verschieden langer (von 0,2 bis 1,5 cm) weißer Fäden (Trabeculae) von verschiedener Dicke, die von der hinteren und unteren Wand ausgehend in Richtung zur vorderen und oberen Wand verliefen.

Außer den vorangehend beschriebenen Gebilden fanden wir in der untersuchten Region in 6 Fällen zystische Gebilde, die in keinerlei Zusammenhang weder mit dem Ductus thyreoglossus oder dessen Derivaten, noch mit dem Schleimbeutel standen. Von den 6 Fällen fanden wir in zwei Fällen eine Zyste vor dem Zungenbeinkörper in der Mittellinie, sie war mit der Knochenhaut eng verwachsen. In einem Fall sahen wir eine runde 0,6 × 0,5 cm große Zyste, die 0,4 cm über dem Zungenbeinkörper in der Mittellinie zwischen den Musculi geniohyoidei lag. Charakteristisch für diese Zyste war ihre Verbindung mit dem Zugenbeinkörper durch einen bis zu 1 mm dicken und 4 mm langen

weißen Strang. Dieser Strang war mit dem Periost des Zungenbeins eng verwachsen. In zwei Fällen lag die 0,5 × 0,3 cm große Zyste im Fettgewebe eingebettet 1,2 cm hinter dem Zungenbeinkörper. In einem Fall wurde die 0,6 × 0,8 cm große Zyste an der Stelle der fehlenden Bursa retrohyoidea nachgewiesen.

In drei Fällen wurde ein neben dem Processus pyramidalis glandulae thyreoideae und dem Ligamentum suspensorium processus pyramidalis parallel verlaufender Muskel nachgewiesen, welcher diesen Gebilden eng anlag. Der Muskel ging vom Isthmus glandulae thyreoideae aus und endete hinter dem Zungenbeinkörper im Bindegewebe entlang der Mittellinie. Die Länge des Muskels betrug in einem Fall 5 cm, in zwei Fällen 4,5 cm, die Dicke jedoch überstieg in keinem Fall 4 mm.

Auch in der Literatur finden wir Hinweise auf das Vorhandensein eines solchen Muskels (Luschka [13], Wenglowski [25], Tonkow [23]).

Die Untersuchung des Ductus thyreoglossus ist von großem praktischen Interesse, da viele Verfasser die Entstehung der medialen Zysten und der Halsfisteln einer Störung der Involution des Ductus thyreoglossus zuschreiben.

Unsere Untersuchungen lassen die Ergänzung und die Klärung einiger Fragen hinsichtlich der Anatomie und der Topographie des Ductus thyreoglossus zu.

Die durch uns an Erwachsenen nachgewiesenen persistierenden Ducti thyreoglossi, das Vorhandensein von Hohlräumen in ihrem Inneren, die Untersuchung des Ligamentum suspensorium processus pyramidalis, ferner der zystischen Gebilde auf dem Ligamentum, sowie der akzessorischen Schilddrüsen haben eine große Bedeutung für die praktische Medizin.

Nicht minder wichtig sind die von uns beschriebenen zystogenen und fistulogenen Gebilde: der Schleimbeutel des Zungenbeins und die weder mit der Involution des Ductus thyreoglossus, noch mit den Derivaten des letzteren zusammenhängenden Zysten.

Endlich sind die festgestellten Zusammenhänge des Ductus thyreoglossus und seiner Derivate mit dem Schleimbeutel des Zungenbeins auch aus dem Grunde wichtig, weil einige Verfasser (Verneuil [27], Luschka [13], Jordan [9], Tschaussow [30], Schwartz [31], Blankstein [2] und andere) die Entstehung der medialen Zysten des Halses mit den pathologischen Prozessen der Bursa retrohyoidea in Verbindung brachten. Eine Entzündung der Bursa selbst jedoch kann das Entstehen einer nicht verheilenden Fistel bedingen (Machow [16]).

Zusammenfassung

Es wurde die Untersuchung des Ductus thyreoglossus und seiner Derivate an Leichen von 100 Erwachsenen und Kindern im Wege des üblichen präparativen Verfahrens an Querschnitten durchgeführt, sowie auch mit Hilfe des Stereomikroskops. Ferner wurde auch eine histologische Untersuchung vorgenommen.

In drei Fällen konnte ein Ductus thyreoglossus, der keiner Rückbildung unterlag, beobachtet werden.

In 48 Fällen wurde ein Processus pyramidalis der Schilddrüse beobachtet. Er war mit dem Zungenbeinkörper entweder durch seine Spitze oder mit Hilfe eines den Processus pyramidalis der Schilddrüse tragenden Bandes bzw. Stranges (Ligamentum suspensorium processus pyramidalis) verbunden. Diese Band wurde in 34 Fällen nachgewiesen. In 5 Fällen endete dieser Strang mit einem zystenartigen Gebilde, was auch histologisch bewiesen wurde.

In 9 Fällen wurden akzessorische Schilddrüsen gefunden.

Alle obenbeschriebenen anatomischen Gebilde sind in der Mehrzahl der Fälle mit dem Schleimbeutel des Zungenbeins (bursa retrohyoidea) verbunden. Letzterer wurde detailliert untersucht. Er konnte in 75% der Fälle beobachtet werden. Seine Form, sowie auch seine innere Struktur wiesen viele Varianten auf.

In 6 Fällen kamen zytische Gebilde vor, die in keinerlei Zusammenhang weder mit den Derivaten des Ductus thyreoglossus, noch mit dem Schleimbeutel des Zungenbeins standen.

Die angeführten anatomischen Tatsachen ergänzen und ändern einige Auffassungen der Lehren über die Entstehung der medianen Zysten und Fisteln des Halses.

LITERATUR

1. Bill, A. H.: (1956) Cysts and Sinuses of the neck of thyroglossal and branchial origin. The Surg. clin. of America, *36*, No. 6. 1599—1600. — 2. Бланкштейн, В. Г. (1935): К вопросу о кистах слизистой сумки подродъязычной области. Журн. ушн. нос. и гор. бол. *12* № 4, 436—439. — 3. Bruch: (1852) Cit. Pokryschkin (18). — 4. Дьяконов, П. И.—Лысенков, Н. К.: (1902) Болезни шеи. Русская хирургия отд. *20*, 11. — 5. Erdheim, I.: (1904) Cit. Leegaard. (11). — 6. Fischel, A.: (1929) Lehrbuch der Entwicklung des Menschen. Wien und Berlin, 321. — 7. Фишер, Г.: (1880) Болезни шеи, отд. *44*, 7. — 8. His, W.: (1891) Der Tractus thyreoglossus und seine Beziehungen zum Zungenbein. Arch. Anat. und Entw. *17*, 26—32. — 9. Jordan: Cit. Blankstein (2). — 10. Kanthack, A.: (1891) Cit. His, (8), Wenglowski (25). — 11. Leegaard, F.: (1912) Über angeborene Halsfisteln und einige mit diesen verwandte Anomalien. Arch. f. Laryng. *26*, 174, 219. — 12. Левит, В.: (1936) Большая мед. энциклопедия. 134. — 13. Luschka, H.: (1862) Die Anatomie des Menschen in Rücksicht auf die Bedürfnisse der praktischen Heilkunde, *1*. 296. — 14. Лубоцкий, Д. Н.: (1953) Основы топографической анатомии, 354. — 15. Лысенков, Н. К.—Бушкович, В. И.—Пригес, М. Г.: (1958) Учебник нормальной анатомии человека. 764. — 16. Махов, Н.: (1934) Большая мед. энциклопедия, 791. — 17. Ombrédanne: (1925) Fistules congenitales du cou. Précis clinique et opératoire de chir. infantile. 287. — 18. Покрышкин, Л. И.: (1924) О зародышевых эпителиальных кистах и свищах шеи. Известия Томского гос. ун-та *72*, 262. — 19. Расцопов, А. П.: (1929) К вопросу о срединных свищах шеи. Жур. ушн. нос. и горл. бол. *6*: № 5—6, 336. — 20. Sulicka, M.: (1894) Des fistules et kystes congenitaux de kystes et fistules du canal de Bochdalek, Paris, 25. — 21. Streckeisen, A.: (1886) Cit. His. (8), Wenglowski (25). 22. Тестю, Л.—Жаков, О.: (1929) Топографическая анатомия 3, № 11. 132. — 23. Тонков, В. Н.: (1953) Учебник анатомии человека, *2*, 261—262. — 24. Венгловский, Р. И.: (1906—1907) О срединных свищах и кистах шеи. VI. съезд российских хирургов, 164, 166, 168. — 25. Венгловский, Р. И.: (1909) О свищах и кистах шеи в связи с учением о развитии и строении жаберного аппарата, языка, шитовидной и зобной желёз. 41—43, 48, 67, 81, 210, 211. — 26. Венгловский, Р. И.: (1917) Оперативная хирургия. Изд. *2*. 166. — 27. Verneuil, V.: (1853) Cit. Wenglowski (25), Pokryschkin (18). — 28. Van den Wildenberg: (1926) Fistules congénitales du cou. Annales des malad. de l'oreille, *45*. No. 7. 677 a 685. — 29. Wölfler, A.: (1880) Cit. Wenglowski (25). — 30. Чаусов, М. Д.: (1876) Анатомия шеи, вып. I. Варшава, 57. 77. — 31. Шварц, Н. В.: (1937) Хирургия детского возраста. изд. *2*, 104. — 32. Золотухин, А. С.: (1930) Пособие к практич. занятиям на трупе, 156—157. — 33. Zuckerkandl, E.: (1879) Cit. Lewit (12), Wenglowski (25).

DUCTUS THYREOGLOSSUS И ЕГО ДЕРИВАТЫ В ПОСТНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ (АНАТОМИЯ И СИНТОПИЯ)

К. П. БОГДАНОВ

Проведено исследование **ductus thyreoglossus** и его дериватов на 100 трупах взрослых и детей путём обычного препарирования, на поперечных срезах, а также с помощью стереоскопического микроскопа и гистологически.

В трёх случаях был обнаружен **ductus thyreoglossus**, не подвергшийся обратному развитию.

В 48 случаях имелся пирамидальный отросток щитовидной железы. Он был связан с телом подъязычной кости или своей верхушкой, или с помощью тяжа — связки, подвешивающей пирамидальный отросток щитовидной железы. Последняя имелась в 34%. В 5 случаях эта связка заканчивалась кистовидным образованием, что доказано гистологически.

В 9 случаях были найдены добавочные щитовидные железы.

Все вышеописанные анатомические образования в большинстве случаев имели тесную связь со слизистой сумкой подъязычной кости (**bursa retrohyoidea**). Последняя была детально исследована. Она встретилась в 75%. Как форма, так и её внутреннее строение сильно варьировали.

В 6 случаях были выявлены кистовидные образования, не связанные ни с дериватами **ductus thyreoglossus**, ни со слизистой сумкой подъязычной кости.

Приведенные анатомические факты вносят некоторые изменения в учение о возникновении срединных кист и свищей шеи.

THE THYROGLOSSAL DUCT AND ITS DERIVATES IN THE POSTNATAL LIFE (ANATOMY AND SYNTOPY)

K. P. BOGDANOV

A study was performed on the thyroglossal duct and its derivates in 100 cadavers of children and grown-up persons by usual preparation, on cross sections and by means of stereoscopic microscope and histological technique.

In three cases non-involuted thyroglossal ducts have been observed.

In 48 cases a pyramidal process of the thyroid gland has been found. It was connected with the body of the hyoid by its apex or by the suspensory ligament of the pyramidal process. The latter existed in 34% of the cases. In 5 cases this ligament terminated in a cystoid formation, proved by histological examination.

In 9 cases supplementary thyroid glands have been found.

In the majority of cases all of the above anatomical formations were in close connection with the retrohyoid bursa. The latter was investigated in details. It was to be met with in 75% of the examined cases. Its form, as well as its internal structure showed great variations.

In six cases cystoid formations were found, having no connection with the derivates of the thyroglossal duct or with the retrohyoid bursa.

The above anatomical facts lead us to make new assumptions about the origin of the median cysts and fistulas of the neck.

К. П. Богданов, СССР. Оренбург, Советская ул. 2, № 3.

Institut für Anatomie der medizinischen Universität, Pécs (Vorstand: Prof. J. SZENTÁGOTHAI)

GEWEBSREAKTIONEN UND FUNKTIONSÄNDERUNGEN DES HYPOPHYSENMITTELLAPPENS DER ALBINORATTE NACH HYPOTHALAMUS- UND HYPOPHYSENSTIELLÄSION

J. HÁMORI

(Eingegangen am 15. Januar, 1959)

Einleitung

Über die nervöse Steuerung der Funktion des Hypophysenmittellappens ist wenig bekannt. Man nimmt jedoch allgemein an, daß der Hypothalamus einen hemmenden Einfluß auf die Sekretion des Melanophorenhormons ausübt. Hierfür spricht einesteils die Beobachtung an Amphibien (ETKIN [2]), daß Unterbrechung des Hypophysenstiels, oder auch Transplantation der Hypophyse eine Ausbreitung der Melanophoren des Tieres hervorruft. Gleichzeitig wurde auch eine Hypertrophie des Mittellappens beobachtet. — Auch an Säugern, vornehmlich der Albinoratte wird vielfach von einer erhöhten mitotischen Aktivität und Hypertrophie des Mittellappens nach Hypotahalamus- und Hypophysenstielläsionen berichtet (BOGDANOVE, SPIRTOS, HALMI [1]), dasselbe wurde auch in unserem Institute beobachtet. Die vorliegende Versuchsserie setzt sich zum Ziel, festzustellen, welcher Art die Hypertrophie des Mittellappens der Albinoratte ist und gleichzeitig wie sich dessen Gehalt an Melanophorenhormon nach Hypophysenstielläsionen gestaltet.

Untersuchungsmaterial und Methoden

An 38 Albinoratten männlichen Geschlechts und von 200—220 gr. Körpergewicht eines in unserem Institut gezüchteten Stammes (Wistar), dessen innersekretorische Organe seit Jahren unter ständiger Kontrolle mittels der verschiedensten quantitativ-histologischer und biologischer Untersuchungsmethoden stehen, wurde mittels der Horsley-Clarkeschen Zieltechnik elektrolytische Zerstörung des Hypophysenstiels vorgenommen. Tiere (Nr. 9 und 35) gingen bald nach dem Eingriff ein, die übrigen wurden wegen der Störung der Temperaturregulation in einem Therm sthaten von 26° ± 1 C während 17 Tagen am Leben erhalten, besonders in der ersten Zeit wurde für genügende Flüssigkeitszufuhr gesorgt. 9 unbehandelte Kontrollen wurden unter gleichen Umweltsbedingungen gehalten.

Die Tiere wurden mittels Dekapitation getötet, die Hypophysen sogleich entnommen und wie folgt weiterbehandelt. Beim ersten Teil der Versuchsserie (Nr. 1—30) wurde die Hypophyse in Vorder- und Mittel-Hinterlappen zerteilt und der Hinterlappen aller Versuchsserie gesondert in absolutem Aceton aufbewahrt. — Die Hypophysen der Tiere beim zweiten Teil der Versuchsserie (Nr. 31—38) wurden im ganzen im Gemisch »Susa« fixiert und histologisch aufgearbeitet. —

Das Zwischenhirn aller Versuchstiere wurde nach Formol Fixierung zwecks genauer histologischer Feststellung der Lokalisation und Ausbreitung des Läsionsherdes in Schnittserien zerlegt und nach Hämatoxylin-Eosinfärbung untersucht. Auf Grund der Läsionsherde wurde die Serie in zwei Kategorien geteilt: In eine kamen alle Fälle mit geringfügiger Läsion

des Hypophysenstiels aber meist vorhandener Hypothalamusläsion, in die zweite alle Tiere mit vollständiger Unterbrechung des Hypophysenstiels. Alle Versuchstiere, bei denen die Hypophyse bei Herausnahme unter dem Präpariermikroskop durch die Elektrolyse beschädigt erschien, wurden aus der weiteren Untersuchung ausgeschieden (Nr. 2, 5, 7, 10, 20, 30).

Der Melanophorenhormongehalt der Hypophysen wurde beim ersten Teil der Versuchsserie (Nr. 1—30) und 6 Kontrollen nach dem von ZONDEK und KROHN [5] ausgearbeiteten Verfahren mittels biologischer Titration an den Erytrophoren der Elritze *(Phoxinus laevis)* bestimmt. Die Extraktion erfolgte ebenfalls nach ZONDEK und KROHN [6] mittels Kochen mit 0,25%-iger Essigsäure. Der Hormongehalt eines Mittellappen-Hinterlappenkomplexus wurde in 1 ml. Essigsäure aufgenommen. Von dieser Stammlösung wurden drei Verdünnungen hergestellt (5×, 10×, 50×) und von allen vier Lösungen 0,05 ml. je 4 Exemplaren (also von einem Hinterlappen je 16 Exemplaren) *Phoxinus laevis* injiziert. — Zur Auswertung der Reaktion wurde jedoch nicht die von ZONDEK angegebene Phoxinus-Einheit angenommen, sondern die Formel von KÄRBER [4] angewandt.

Der zweite Teil der Versuchsserie (Nr. 31—38) und 3 Kontrollen wurden zur histologischen Untersuchung der Veränderungen des Mittellappens verwendet. Lückenlose Serien der ganzen Hypophyse wurden nach MANN gefärbt und das Volumen des Mittellappens mittels der Papiergewichtsmethode, sowie die Kerngröße im Mittellappen mittels der variationsstatistischen Methode von JACOBJ [3] bestimmt. Je Mittellappen wurde die Kerngröße von 200 Zellkernen bestimmt.

Untersuchungsergebnisse

Tabelle I zeigt die Ergebnisse der Titration des Gehaltes der Mittellappen-Hinterlappenkomplexe an Melanophorenhormon. Der »K«-Wert gibt die 50%-ige Schwellenwirksamkeit auf ml. der Ausgangs- (Stamm-) Lösung bezogen an, je kleiner also der »K«-Wert, umso größer die Wirksamkeit der Lösung. Die Wirksamkeit der Extrakte von Kontrolltieren erwies sich als ziemlich gleichmäßig. In der Kategorie der hypothalamuslädierten Tiere (in dieser Serie meist in der hinteren Tuberalregion) mit unversehrtem oder geringfügig lädiertem Hypophysenstiel war die Aktivität des Extraktes etwa um die Hälfte herabgesetzt. — In der Kategorie der Tiere mit vollständiger Unterbrechung des Hypophysenstiels war abgesehen von 3 Fällen auch in der Stammlösung kein Melanophoren-(Erythrophoren-)aktiver Stoff nachweisbar. (Der »K«-Wert lag also über 0,0500). Ein Mittelwert konnte deshalb nicht berechnet werden.

Tabelle II zeigt das Ergebnis der histologischen Auswertung. Es geht klar hervor, daß der Mittelwert des Kernvolumens bei den drei Kontrollfällen 189 μ^3, 171 μ^3, 201 μ^3, also im Durchschnitt 187 μ^3 beträgt, bei einem Falle mit Hypothalamusläsion doch unbeschädigtem Stiel (Nr. 31) 153 μ^3, bei 6 Fällen mit totaler Unterbrechung des Hypophysenstiels sank das mittlere Kernvolumen im Durchschnitt auf 96 μ^3, also ziemlich genau auf die Hälfte des Kontrollwertes herab. Genauer zeigt dies Abb. 1, wo die empirischen Wariationskurven der verschiedenen Versuchstiere dargestellt sind und die Herabsetzung des Kernvolumens auf die nächst untere Regelklasse deutlich zu erkennen ist.

Ebenso deutlich ist bei denselben Fällen die Vergrößerung des Mittellappens ausgeprägt. Die gesamte Schnittoberfläche des Mittellappens hat sich im Durchschnitt etwa auf das doppelte des normalen erhöht.

Tabelle I

Erythrophorenaktivität »Phoxinus laevis« der Mittelappenextrakte von Kontrolltieren nach Hypothalamusläsion und nach Unterbrechung des Hypophysenstiels

Hochgradige Verringerung des erythrophorenaktiven Stoffes (MSH) nach Hypophysenstielunterbrechung

Kontrollen		Läsion der tuberalen Gegend, geringfügige Läsion des Hypophysenstiels		Vollständige Unterbrechnug des Hypophysenstiels	
Tier Nr.	»K« ml	Tier Nr.	»K« ml	Tier Nr.	»K« ml
1	0,0050	3	0,0040	1	—
2	0,0037	15	0,0119	4	—
3	0,0040	18	0,0069	6	—
4	0,0036	19	0,0069	8	—
5	0,0050	24	0,0098	11	—
6	0,0056	26	0,0094	12	—
		27	0,0053	13	—
		28	0,0113	14	0,0250
		29	0,0072	16	0,0119
				17	—
				21	—
				22	—
				23	—
				25	0,0250
Mittel	0,0044		0,0080		

Besprechung der Befunde

Aus den dargelegten Befunden geht eindeutlich hervor, daß die Zerstörung des Hypophysenstiels zu einer ausgesprochenen Vergrößerung des Hypophysenmittellappens führt. Auf Grund des Gesetzes der rhythmischen Verdoppelung des Kernvolumens muß man aus dem Erscheinen einer neuen Kernklasse von halben Volumen der normalen Kerngröße auf das gehäufte Auftreten von Kernteilungen schliessen. Obwohl wie es aus Tabelle II erhellt (z. B. beim Vergleich der Versuchstiere Nr. 32—33) Kernverkleinerung und Volumvergrößerung des Mittellappens keineswegs streng parallel einhergehen, ist die Vergrößerung immerhin als echte Hyperplasie zu betrachten.

Eigentümlicherweise ist demgegenüber der Melanophorhormongehalt des hyperplastischen Mittellappens keineswegs erhöht, sondern hochgradig vermindert. Bei den meisten Versuchstieren mit vollkommen unterbrochenem

Tabelle II

Kerngröße und Volumen des Mittelappens bei Kontrollen, nach Hypothalamusläsion und Unterbrechung des Hypophysenstiels

Tier Nr.	Lokalisation der Läsion	Kerngröße im Hypophysenmittellappen			Volumen des Mittellappens Planimetrisch	
		Mittelw. d. Kerndurchmesser in μ	Kernvolumen in μ^3	Gruppen Durchschnitt	Bestimmte Gesamtschnittfläche in arbitr. Fl. Einheiten	Gruppen Durchschnitt
1	Kontrollen	7,140	189	187	486	477
2		6,817	171		500	
3		7,250	201		445	
31	Verletzung der Tuberregion, Hypophysenstiel intakt	6,652	153		473	
32	Vollkommene Unterbrechung des Hypophysenstiels	5,260	77	96	629	930
33		6,210	126		1068	
34		5,262	77		913	
36		5,470	86		808	
37		5,457	84		1032	
38		6,280	129		932	

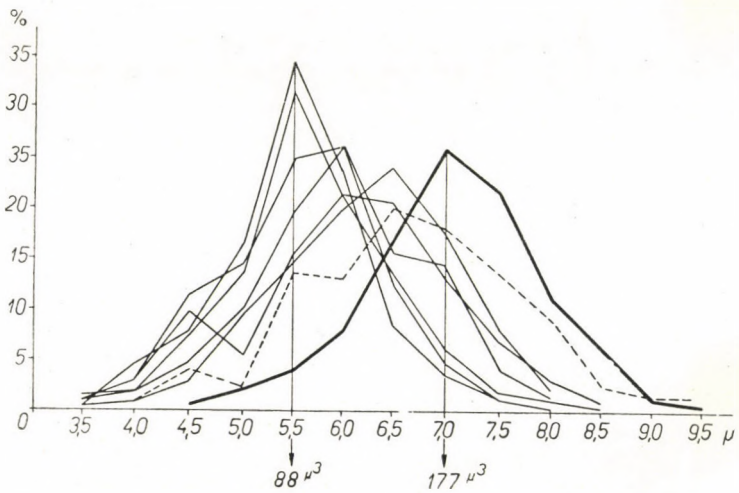


Abb. 1. Empirische Variationskurven der Kerngröße im Hypophysenmittellappen bei Kontrollen (dick ausgezogene Linie ; Sammelkurve von 3 Fällen), bei Hypothalamusläsion (unterbrochene Linie ; ein Fall) und nach Hypophysenstielunterbrechung (dünne Linien ; 6 Einzellfälle.) Die Volumina der Klassen mit größter Häufigkeit verhalten sich wie 1 : 2

Hypophysenstiel konnte sogar überhaupt kein Melanophorenhormon nachgewiesen werden.

Dieser Befund könnte allerdings dahin ausgelegt werden, daß obwohl ebensoviel oder gar mehr Melanophorenhormon produziert werden mag, dasselbe bei Zerstörung des Hypophysenstieles nicht im Mittellappen gespeichert werden kann. In diesem Falle müßte das Hormon durch die Niere ausgeschieden werden. Wir untersuchten in einigen Fällen den Gehalt des Harns an erythrophorenaktivierenden Stoffen, konnten aber den Kontrollen gegenüber keine Erhöhung nachweisen, was dieser Hypothese widerspricht. (Der für die Melanophorenhormonaktivität im Harn charakteristische »K«-Wert ergab sich bei zwei Kontrolltieren gleicherweise als 0,025 ml., bei zwei Tieren mit Stielunterbrechung [Nr. 14 und 38] ebenfalls als 0,025 ml, bei zwei anderen der gleichen Gruppe [Nr. 17, 34] war jedoch überhaupt kein Melanophorenhormon im Harn nachzuweisen).

Ob dieser Effekt der Hypophysenstiellläsion als Ausschaltungseffekt einer normalerweise vorhandenen nervösen Steuerung gewertet werden kann, muß vorderhand noch dahingestellt werden, da die Hyperplasie und gleichzeitige Funktionsstörung des Mittellappens auch eine Folge der durch die Stiellläsion hervorgerufenen anoxyschen Störung der Hypophyse sein kann.

Zusammenfassung

Eine totale Unterbrechung des Hypophysenstiels führt bei der Albinoratte zu deutlicher Hyperplasie des Hypophysenmittellappens, unter gleichzeitiger hochgradiger Herabsetzung ihres Gehaltes an Melanophorenhormon. Läsion des Tuberalgebietes des Hypothalamus ohne Zerstörung des Hypophysenstiels verursacht nur eine geringfügigere Herabsetzung des Melanophorenhormongehalts.

LITERATUR

1. Bogdanove, E. M., Spirtos, B. N., Halmi, N. S.: (1955) Further observations on pituitary structure and function in rats bearing hypothalamic lesions. Endocrinology *57*. 302—315. — 2. Etkin, W.: (1941) On the control of growth and activity of the pars intermedia of the pituitary by the hypothalamus of the tadpole. J. exp. Zool. *86*. 113—139. — 3. Jacobj, W.: (1935) Die Zellkerngröße beim Menschen. Ein Beitrag zur quantitativen Cytologie. Z. mikr.-anat. Forsch. *38*. 161—218. — 4. Kärber, G.: (1931) Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Arch. exp. Path. Pharmak. *162*. 480—488. — 5. Zondek, B., Krohn, H.: (1932) Hormon des Zwischenlappens der Hypophyse (Intermedin). I. Die Rotfärbung der Elritze als Testobjekt. Klin. Wschr. *11*. 405—408. — 6. Zondek, B., Krohn, H.: (1932) Hormon des Zwischenlappens der Hypophyse (Intermedin). III. Zur Chemie, Darstellung und Biologie des Intermedins. Klin. Wschr. *11*. 1293—1298.

ТКАНЕВЫЕ РЕАКЦИИ И ИЗМЕНЕНИЯ ФУНКЦИИ СРЕДНЕЙ ДОЛИ ГИПОФИЗА У БЕЛЫХ КРЫС ПОСЛЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ ГИПОТАЛАМУСА И НОЖКИ ГИПОФИЗА

Й. ХАМОРИ

Полное прерывание ножки гипофиза у белых крыс имеет следствием выраженную гиперплазию средней доли гипофиза, при одновременном сильном снижении ее содержания меланофорного гормона.

Повреждение трубочной области гипоталамуса без прерывания ножки гипофиза, обусловливает только незначительное уменьшение содержания меланофорного гормона.

TISSUE REACTION AND FUNCTIONAL CHANGES FOLLOWING HYPOTHALAMIC AND HYPOPHYSEAL STALK LESION IN THE INTERMEDIATE LOBE OF ALBINO RAT

J. HÁMORI

Transection of the hypophyseal stalk in albino rats is followed by considerable hyperplasia of the intermediate lobe and a considerable loss of the melanophor hormone content. The lesions of the tuberal region of the hypothalamus — when the hypophyseal stalk is not damaged — cause only a slight hyperplastic reaction and a slight decrease of the melanophor hormone content of the intermediate lobe.

József HÁMORI, Pécs, Dischka Gy. u. 5. Ungarn.

(Institut für Anatomie der Staatlichen Veterinärhochschule, Kasan (SSSR)
(Vorstand: Prof. N. A. Vasnezow)

MORPHOLOGIE DES NERVUS VAGUS UND SEINER VERZWEIGUNGEN BEI WIEDERKÄUERN

J. Ch. Mindubajew

(Eingangen am 17. Februar, 1959)

Einleitung

Der Nervus vagus hat infolge seiner ursprünglichen Funktion, des Charakters seiner Struktur und seiner Topographie schon seit jeher die Aufmerksamkeit der Forscher auf sich gelenkt. Claudius Galenus (131—201) kannte bereits diesen Nerv und betrachtete ihn als einen Teil des VI. Gehirnnervenpaares. Thomas Willis (1664) bezeichnete ihn als einen Teil des VIII. Gehirnnervenpaares. Winslow (1732) nannte ihn Nervus sympathicus medius und Gall (1748) Nervus vocalis. Spätere Autoren betrachteten ihn als Nervus gastro-pulmonalis und als Wander-Nerv.

Dem Studium des Nervus vagus widmeten sich viele Autoren, u. a. Langebacher (1877), Veinzweig (1885), Boll, Dogiel, Holzmann (1910—1912), Sokolowa (1950), Kowschikowa (1952), Petrosjan (1954), Dolgo—Saburow (1941—1957), Klimontow (1957), Korotkow (1957), Ibragimow (1958) u. a. m.

Ungeachtet dessen ist der Nervus vagus der Wiederkäuern, insbesondere der Schafen und Ziegen bis heute unerforscht geblieben. Wir widmeten uns dem Studium des Nervus vagus von Schafen, Ziegen, Hornvieh und des Elentiers mit der Zielsetzung die Morphologie dieses Nervs bei Paarhufern zu klären.

Untersuchungsmethoden und -material

Das Untersuchungsmaterial haben wir vorsichtig und fein präpariert, und in einzelne Bündel aufgespaltet. Die Serienquerschnitten wurden nach Spielmeyer und Weigert gefärbt. Die Nervenfaser des Nervus vagus wurden nach Färbung mit Eisenalaun-Hämatoxylin untersucht.

Es wurden Schafen 2 Fetus, 4 neugeborene Lämmer, und 20 erwachsene Tiere, Ziegen (2 Fetus Tiere), 2 neugeborene Zicklein und 16 erwachsene fernere Hornviehe (2 Kälber, 2 Kühe und 1 Elentier) bearbeitet. Ausserdem wurde der Nervus vagus von 3 Schafen, 4 Ziegen und 2 Kühen mit der Methode der Fasernzerlegung untersucht.

Ergebnisse

Der Nervus vagus entspringt bei Schafen und Ziegen auf der ventrolateralen Oberfläche der Medulla oblongata mit einer großen Menge dünner

Nervenwurzel, die sich dann in 15—20 mehr oder weniger dicke Bündel zusammenschließen, um sodann vor ihrem Austritt aus dem Schädel einen einzigen Stamm zu bilden.

Nach seinem Austritt durch das Foramen lacerum aborale zieht der Nervus vagus in caudo-ventraler Richtung. Sein Durchmesser beträgt bei Schafen und Ziegen 0,3 cm, bei Kühen 0,4 cm und beim Elen 0,6 cm.

Der Ganglion jugulare stellt in den meisten Fällen kein kompaktes Gebilde dar, sondern besteht aus 2—3 Knötchen, die im Bestande des Nervus vagus beim Austrittsgebiet des letzteren durch das Foramen lacerum zu finden sind. Vom Ganglion jugulare geht ein dünner kleiner Zweig zum Canalis mastoideus ossis petrosi. Außerdem gibt der Ganglion jugulare noch weitere Zweige ab, uzw. einen zum IX. Gehirnnervenpaar, einen kleinen Zweig zum Plexus carotis und 2—3 kleine Zweige zur Dura mater des Gehirns. Unterhalb des Ganglion jugulare treten einige Bündel vom XI. Gehirnnervenpaar und ein Ast vom kranialen Ganglion des Halssymphaticus in den Nervus vagus ein.

Der Plexus reticularis nervi vagi stellt eine Verdickung des Stammes auf dem Niveau des Processus jugularis des Hinterhauptbeins dar. Die Behauptung von ELLENBERGER und BAUM über den ausgeprägten Ganglion reticulare der Schafe und Ziegen haben wir nicht bestätigt. Diese Tiere besitzen an Stelle eines kompakten Ganglions einen Plexus reticularis, der einen Abschnitt des Stammes mit kompliziert verflochtenen Nervenbündeln darstellt, zwischen denen sich kleine Ganglien befinden. Ausbreitung variiert bei Schafen und Ziegen im Durchmesser von 0,35 bis zu 4 cm und in der Länge von 0,8—1,2 cm. Beim Hornvieh beträgt der Durchmesser 0,6—0,7 cm und die Länge 1,2—1,5 cm beim Elen jedoch 0,7, bzw. 1,3 cm. Beim Hornvieh enthält der Plexus reticularis mehr Ganglien, auch ist er kompakter in der Struktur. Beim Elentier sind im Bestande des Plexus reticularis auch größere Ganglien vorhanden.

Das Vorhandensein komplizierter Nervenbündelverflechtungen und der bedeutenden Ganglienmasse auf dem Gebiet des Plexus reticularis und der nachfolgende parallele Ablauf der Bündel im Bestand des Nervus vagus lassen die Annahme berechtigt erscheinen, daß der Plexus reticularis ein wichtiges Umlagerungsgebiet der Bündel innerhalb des Stammes darstellt. Diese Bündel bilden dann im Kopfgebiet, im Halsteil und im kranialen Teil des Brustraumes die vom Nervus vagus entspringende Nerven.

Der Nervus laryngeus cranialis von Schafen und Ziegen (selten doppelt) geht vom Plexus reticularis ab, und nachdem er einen dünnen Verbindungszweig vom kranialen Sympathikusknoten des Halses aufgenommen hat, durchzieht er das Foramen thyreoideum unterhalb der Schildknorpel und spaltet in 2—3 Zweigen auf. Der kaudo-dorsale Zweig verzweigt sich seinerseits im Gebiet der Labia vocalia, anastomosiert mit den Zweigen des Nervus recurrens

und versorgt mit seinen Endverästelungen die Wand des Oesophagus und der Trachea (»Galenos Anastomose«). Der andere (kaudale) Zweig verzweigt sich in den kranialen Teilen des Musculus sterno-hyoideus, des Musculus sterno-thyreoideus und des Musculus thyreo-hyoideus. Der dorsale Zweig des Nervus laryngeus innerviert den Epiglottis und die Schleimhaut des Kehlkopfes.

Beim Elentier wird der Nervus laryngeus cranialis hauptsächlich von im Bestand des Nervus vagus ziehenden Nervenbündeln gebildet, die in der Brusthöhle aus dem Vagus austreten und weiter in kranialer Richtung verlaufen. Nur einen unbedeutenden Teil des Nervus laryngeus cranialis liefern die aus dem Plexus reticularis kommenden Bündel.

2—4 Rami pharyngei entspringen aus dem kranialen Teil des Plexus reticularis, kreuzen die Arteria carotis externa und zu der Raphe pharyngis gelangend nehmen sie gemeinsam mit den Zweigen der IX., XI., XII. Hirnnervenpaare und des Ganglion sympathicus cervicalis cranialis an der Bildung des Plexus pharyngeus teil.

Die 3—4 Rami oesophagei ziehen zum kranialen Teil des Oesophagus, wo sie sich auf der dorsalen Oberfläche desselben verzweigen.

Der Nervus depressor (Herznerv) entspringt mit einem Durchmesser von 0,5 mm aus dem Plexus reticularis und verläuft im Bestand des Nervus vagus in der Brusthöhle. Der Feststellung von Langebacher (1877), wonach der Nervus depressor in seinem Anfangsabschnitt isoliert vom Stamm des Nervus vagus verläuft, und erst später sich mit dem letzteren vereinigt, können wir nicht beipflichten. In unserem Material verlief in der Mehrzahl der Fälle der Nervus depressor von Anfang an im Bestande des Vagus bis zu seiner Abzweigung am kranialen Ende der Herzbasis. Nur bei zwei Ziegen verlief der Nervus depressor in seiner ganzen Länge, unabhängig vom Vagus, am dorsalen Rand der Arteria carotis. Wir teilen auch nicht die Meinung von Kreidmann (1878) und Viti (1884), die darauf hinweisen, daß bei Ziegen, Schafen und Kälbern der Nervus depressor links aus dem Nervus laryngeus cranialis, und auf der rechten Seite aus dem Nervus recurrens entspringt. Gleichzeitig jedoch bestätigen wir die Angaben von Tischer (1904) und Ibragimow (1958), die den Nervus depressor nur in vereinzelten Fällen isoliert fanden.

Nach der Abgabe der oben beschriebenen Zweige hat der Nervus vagus bei Schafen und Ziegen einen Durchmesser von 0,3 cm, bei Kühen 0,4 und bei Elen 0,5 cm. Auf dem C1 Niveau vereinigt er sich mit dem Halssympathikus und bildet mit ihm einen mit einer gemeinsamen Bindegewebsscheide umgebenen Nervus vago-symphaticus, der kaudal auf der dorso-lateralen Oberfläche der Trachea verläuft. Auf dem kaudalen Halsteil zieht er abwärts auf die laterale Oberfläche der Trachea, um sodann beim Eintritt in die Brusthöhle — auf der ventro-lateralen Oberfläche derselben zu verlaufen.

Im gemeinsamen Truncus vago-sympathicus ist die Masse der Vagusbündel wesentlich größer als die der Sympathikusbündel. Ihr Verhältnis ist bei erwachsenen Schafen 6 : 1, bei Ziegen 8 : 1. Dieses Verhältnis vergrößert sich mit zunehmendem Alter der Tiere. Im 2 Monate alten Fetus von Ziegen ist dieses Verhältnis 2 : 1, im neugeborenen Zicklein 4 : 1, bei 3 Monate alten Zicklein 5 : 1, bei erwachsenen Ziegen 8 : 1. Beim Hornvieh und bei Schafen kann eine gleiche Veränderung dieses Verhältnisses mit zunehmendem Alter

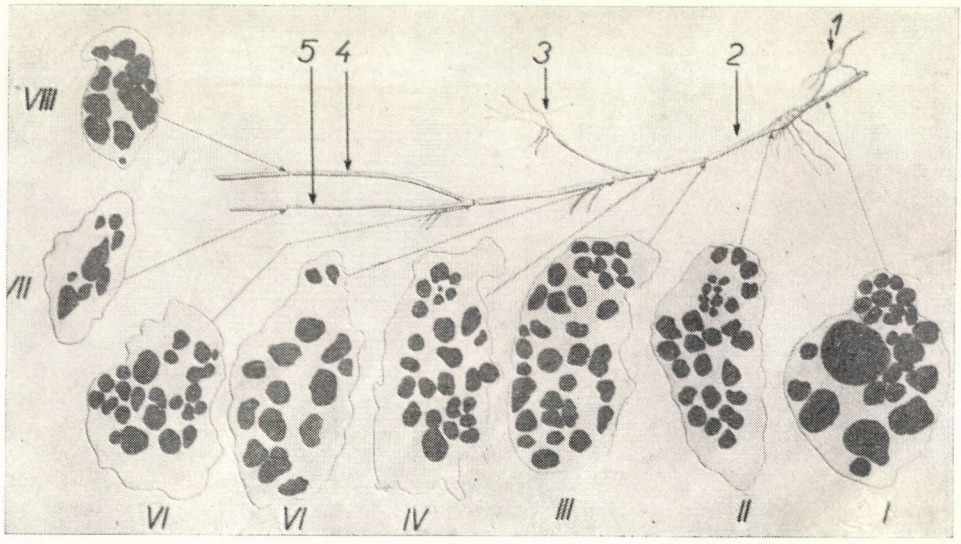


Abb. 1. Die innere Struktur des Nervus vagus in verschiedenen Niveaus
1. — Ganglion symphaticus cervicalis cranialis, 2. — Nervus vago-symphaticus, 3. — Ganglion stellatum, 4. — Truncus oesophageus dorsalis, 5. — Truncus oesophageus ventralis, I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII — auf verschiedenen Höhen hergestellte Querschnitte des Nervus vagus

der Tiere beobachtet werden. Im gemeinsamen Truncus vago-sympathicus verläuft der Nervus vagus auf der Höhe der C_2 dorsal, in der Halsmitte lateral und im kaudalen Drittel des Halses ventro-lateral im Verhältnis zum Truncus sympathicus cervicalis.

Wir haben den gemeinsamen Truncus vago-sympathicus in einzelne Bündel zerlegt, und festgestellt, daß die Vagusbündel innerhalb des Truncus vago-sympathicus nicht miteinander verflochten sind, es kann bloß ein Austausch von äußerst dünnen Nervenfasern wahrgenommen werden, sowohl zwischen den eigenen Bündeln, als auch zwischen den Bündeln des Vagus und des Sympathikus. Aus dem Halsteil des Truncus symphaticus treten einige Bündel in den Bestand des Nervus vagus ein, die in der Brusthöhle an der Bildung des Ramus cardiacus nervi vagi teilnehmen.

Bei drei Ziegen trat aus dem linken Ganglion stellatum ein Verbindungszweig heraus, der in den Vagus eintrat und im Bestand desselben verlaufend den Plexus pulmonalis erreichte und dann in den rechten Vagus überging um dort kranial bis zum Plexus reticularis zu ziehen. Vom Plexus reticularis geht dieser Zweig, aus dem Stamm des Vagus abzweigend, an die Arteria carotis communis heran, wo er sich verzweigt.

Bei der Untersuchung der Querschnittserien des Truncus vago-sympathicus konnte gleichfalls der Beweis erbracht werden, daß die Vagus- und Sympathikuskomponenten ihre Bündel miteinander austauschen.

Bei Schafen und Ziegen besteht der Nervus vagus vor der Abgabe des Nervus laryngeus und Nervus pharyngeus aus 15—18 dicken (500—1000 μ) und mittleren (250—500 μ) Bündeln. Der Truncus sympathicus cervicis in diesem Niveau besteht aus 8—10 Bündeln und ihr Durchmesser ist auch wesentlich geringer als die der Vagusbündel (Abb. 1, I).

Im Niveau der Halsmitte besteht der Nervus vagus aus 25—28 Bündeln mittleren und dünnen Kalibers (100—250 μ). Ihrer Masse nach sind sie nicht geringer als im Abschnitt vor der Entsendung des Nervus laryngeus und Nervus pharyngeus. Der Truncus sympathicus enthält 6—8 Bündel geringeren Kalibers (Abb. 1, III).

Auf der Höhe des C_6, im Abschnitt vor der Entsendung des Truncus sympathicus besteht der Nervus vagus aus 19—21 Bündeln mittleren und dünnen Kalibers. Ihre Masse ist etwas geringer als die des Vagus im mittleren Halsteil. 1—2 Bündel liegen näher zum ventralen Rand des Nervenstammes, isoliert von den übrigen Bündeln. Der Truncus sympathicus besteht aus 6—7 dünnen Bündeln (Abb. 1, IV).

Im Niveau der I Rippe, nach der Abzweigung des Truncus sympathicus, besteht der Nervus vagus aus 13—16 Bündeln mittleren Kalibers. 1—2 Bündel sind isoliert vom gemeinsamen Stamm und befinden sich in der Nähe des dorsalen Randes des Stammes. Am ventralen Rand des Truncus befinden sich zwei dünne Bündel, die sich vom Halssympathikus gelöst haben. (Abb. 1, V).

Auf der Höhe der C_6 (auf der rechten Seite häufiger im Niveau der C_7) trennen sich die Nervi vagi vom Truncus sympathicus und entlang der ventro-medialen Oberfläche der Trachea treten sie in die Brusthöhle ein. In der Brusthöhle verläuft der rechte Vagus auf der lateralen Oberfläche der Trachea. Der linke Vagus befindet sich beim Eintritt in die Brusthöhle auf der medialen Oberfläche der Arteria subclavia, und oberhalb der Herzbasis lateral vom Bulbus aortae. Auf dem rechten Nervus vagus sind im Niveau der Th_2, und auf dem linken Nervus vagus im Niveau der Th_4 abgeplattete Abschnitte mit ausgesprochenen Ganglien zu sehen.

Auf der Höhe der I. Rippe geht vom rechten Vagus der Nervus recurrens ab, in dessen Bestand auch der aus dem Ganglion stellatum kommende kleine Verbindungszweig eintritt. Der linke Nervus recurrens verläßt den Vagus

im Niveau der Aorta, umzieht die letztere in kaudaler Richtung und verläuft später, nachdem er den Verbindungszweig der Ganglion stellatum empfangen hat, kranial, in der Brusthöhle der dorsolateralen und im Halsteil der ventro-lateralen Oberfläche der Trachea entlang. Bei Ziegen zieht der rechte Nervus recurrens im kaudalen Drittel des Halses links von der Trachea, d. h. in der Nähe des linken Nervus recurrens, und erst im Niveau des C_2 geht er auf die rechte Seite über. Der Nervus recurrens gibt auf seinem ganzen Verlauf dünne Zweige zur Trachea, zum Oesophagus und zur Schilddrüse ab, und versorgt mit seinen Endverzweigungen alle Kehlkopfmuskel mit Ausnahme des Musculus vocalis, Musculus ventricularis und des Musculus crico-thyreoideus.

Aus dem Ganglion stellatum tritt ein dicker Zweig (mit einem Durchmesser von 0,15 cm) in den linken Nervus vagus ein und verläuft weiter in kaudaler Richtung.

Auf der Höhe der Abzweigung der Arteria carotis communis, aus dem Truncus brachiocranialis communus, entspringt vom linken Nervus vagus der Ramus cardiacus (selten doppelt), zu dem die gleich dicke Komissur aus dem Ganglion stellatum hinzutritt. Der Nerv verzweigt sich dann in der Wand des Bulbus aortae. Auf der Höhe des Bulbus aortae entspringt vom Nervus vagus ein Verbindungszweig zum Ramus cardiacus der vertebralen sympathischen Ganglien Th_3—Th_4, der sich an der Wand der Vena azygos befindet. Bei den Elentieren zogen vom linken Vagus 5 dünne Äste zum Herzen.

Vom rechten Vagus führen 3—5 dünne Äste zum Herzen, um sich auf dessen vorderen rechten Oberfläche zu verzweigen. Der rechte Nervus vagus nimmt gleichfalls einen Verbindungsast aus dem Ganglion stellatum auf, und führt ihn größtenteils kaudal, zum geringeren Teil kranial. In der Brusthöhle gehen von beiden Nervi vagi dünne Zweige zur Trachea, zum Oesophagus und zu der mediastinalen Pleura.

Am kaudalen Rand der Herzbasis wird der rechte und linke Vagus mit einem dicken Nervenzweig verbunden, wonach der linke Vagus erneut einen dünnen Verstärkerungszweig vom rechten Vagus erhält. Im weiteren verläuft er als Truncus oesophageus dorsalis vom Niveau des Th_9 in kaudaler Richtung der rechten dorsalen Oberfläche des Oesophagus entlang (Abb. 2, *2*). Der rechte Nervus vagus bildet vereint mit dem Zweig des linken Vagus in der Höhe der Bifurkation der Trachea den Plexus pulmonalis, und hat seine Fortsetzung in der Höhe der Th_6 (bei Ziegen- und Schaf-Fetus, sowie bei Kälbern auf der Höhe des Th_5) im Truncus oesophageus ventralis. (Abb. 2, *3*). Der dorsale Truncus ist in der Regel zweimal so dick wie der ventrale Truncus oesophageus. Der dorsale Truncus oesophageus führt 14—16 Bündel mittleren und dünnen Kalibers (Abb. 1, VIII), der ventrale hingegen bloß 6—8 Bündel von ähnlichem Durchmesser (Abb. 1, VII). Wir können der Behauptung

LANGEBACHERS nicht beipflichten, daß der dorsale Truncus oesophageus hauptsächlich Fasern des rechten Vagus, und der ventrale — Fasern des linken Vagus führe. Ebensowenig können wir die Meinung von BJELAJEW teilen, wonach der dorsale und ventrale Truncus oesophageus eine gleiche Anzahl von Fasern des linken und rechten Nervus vagus enthält. In unserem Material beobachteten wir, daß der dorsale Truncus oesophageus bei Schafen und Ziegen hauptsächlich Fasern des linken Nervus vagus führt, und der Truncus oesophageus ventralis entweder aus den Fasern des rechten Vagus besteht, oder er führt Fasern beider Nerven in gleicher Anzahl. Bei den Elentieren war es hauptsächlich der linke Vagus, der den Truncus oesophageus ventralis bildete, während der Truncus oesophageus dorsalis in der Höhe des Th_{11} aus Bündeln des rechten und des linken Vagus in gleicher Anzahl enstand.

Der Plexus pulmonalis führt hauptsächlich Bündel des linken Vagus. Die Verzweigungen der Nervi vagi begleiten in den Lungen die Bronchen, im Unterschied zu den Zweigen des Ganglion stellatum, welche die Blutgefäße umweben.

Bei Ziegen, Schafen und Elen gesellt sich unmittelbar vor dem Eintritt in den Hiatus oesophagicus aus dem Truncus oesophageus dorsalis ein Verbindungsast zum Truncus oesophageus ventralis ; der Durchmesser dieses Verbindungszweiges kann verschieden sein. In Fällen, wo der Truncus oesophageus ventralis überwiegend Bündel des rechten Vagus führt, hat dieser Ast einen bedeutenden Durchmesser (1,5—2 mm), in den Fällen jedoch, wo im Truncus oesophageus ventralis die Bündel des rechten und des linken Vagus in gleicher Anzahl vertreten sind, ist der Verbindungsast dünn, oder er fehlt überhaupt.

Auf der rechten dorsalen Oberfläche des Atrium ruminis zerfällt der Truncus oesophageus dorsalis fächerartig in 16—18 Zweige, die sich gegenseitig, sowie auch mit den Nervenbündeln des Plexus solaris verflechtend den subserösen »Plexus atrii ventriculi« bilden (Abb. 2, 5). Dieser Plexus wurde von SOKOLOWA (1951) beim Hornvieh, von KLIMONTOW (1957) bei Rentieren und von LANGEBACHER (1877) bei Ziegen und Schafen beschrieben. SOKOLOWA und KLIMONTOW nannten dieses Geflecht »Plexus gastricus caudodorsalis«. Wir sind der Ansicht, daß diese Benennung, welche die genannten Autoren nach dem Muster des Nervennetzes im einkammerigen Magen auf den Plexus im mehrkammerigen Wiederkäuermagen übertragen haben, nicht zutreffend ist, da sie der Topographie dieses Geflechtes nicht entspricht. Wir nennen es »Plexus atrii ventriculi«, da es sich unmittelbar auf dem Atrium rumini befindet.

Bei Schafen, Ziegen und Kühen treten aus dem Plexus atrii ventriculi 2 kleine Äste in den Plexus solaris ein, die einen Durchmesser von je 1 mm haben. Bei Elentieren tritt die Hälfte aller Nervenbündel des Truncus oesophageus dorsalis in den Plexus solaris ein. Obwohl bei Schafen, Ziegen und

Hornvieh die vom Truncus oesophageus dorsalis in den Plexus solaris eintretenden Bündel dünner als die Nerven des Plexus sympathicus (Nervi splanchnici) sind, so ist doch bei Elentieren, bei Fetus von Schafen und Ziegen die Anzahl der aus dem Vagus und Sympathikus kommenden und in den Plexus solaris eintretenden Bündel annähernd gleich.

Die Äste des Truncus oesophageus dorsalis teilen sich am kranio-ventralen Rand des Plexus solaris in vier Bündelgruppen : die 1. Bündelgruppe zieht

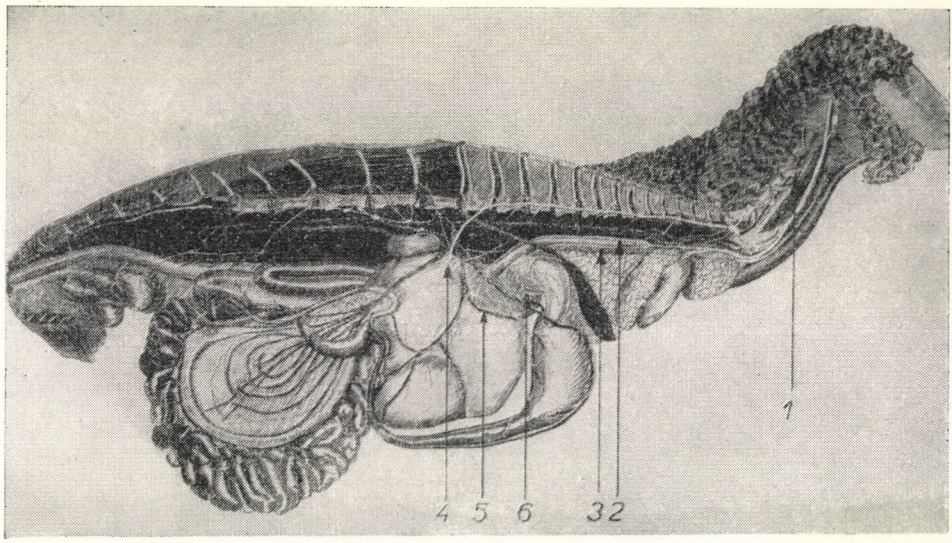


Abb. 2. Die vegetativen Nerven von Schafen
1. — Nervus vago-symphaticus, 2. — Truncus oesophageus dorsalis, 3. — Truncus oesophageus ventralis, 4. — Plexus solaris, 5. — Plexus atrii ventriculi, 6. — Plexus interreticulo-omaseus

zum Ganglion des Plexus solaris, der sich auf der rechten Oberfläche der Arteria coeliaca befindet, die 2. Gruppe geht ohne Unterbrechung mit den Ästen des Plexus solaris zusammen der Arteria mesenterica cranialis entlang zum Darm, wo sie sich in den Dünndarmschlingen, im Ansa spiralis und im Blinddarm ausbreiten ; die 3. Bündelgruppe bildet einen 0,8 mm dicken Nervenstamm, der ohne Unterbrechung durch die Ganglien des Plexus solaris hindurchzieht, und entlang der Arteria gastroduodenalis caudalis verlaufend den Zwölffingerdarm versorgt ; die 4. Bündelgruppe verzweigt sich im kaudalen Teil des Plexus solaris, in der Wand der Vena portae, im Pankreas und in der Milz.

Vom Plexus atrii ventriculi ziehen 6—7 dünne und kurze Äste unmittelbar zum Atrium rumini, die sich in der Oesophaguswand weiter teilen. Der mächtigste Ast des Plexus atrii ventriculi zieht dem Sulcus longitudinalis dexter entlang wo er mit den Ästen des Plexus solaris ein Geflecht um die

Arteria ruminalis dextra herum bildet. Aus diesem Geflecht führen kleine Zweige zum Saccus ruminis ventralis und dorsalis, sowie auch zum Sulcus coronarium caudalis. Die Endverzweigungen des Plexus gehen dem Sulcus ruminis caudalis entsprechend auf die linke Oberfläche des Rumen über, wo sie im Sulcus coronarius caudalis verlaufen. Einige kleine Äste sind auch in der Gegend der kaudoventralen Spitze des Saccus rumini zu finden.

Ein dicker Ast des Plexus atrii ventriculi geht zur Curvatura maior des drüsenreichen Labmagens (Abomasus) und gibt unterwegs einige kleinere Zweige zum Fundus des Labmagens, um seine Endverästelungen im Pylorusgebiet und im Anfangsabschnitt des Duodenums auszubreiten. Ein anderer Ast des Plexus atrii ventriculi führt in ventraler Richtung in der Furche zwischen dem Wanst und dem Omasus (Blattmagen) zum Labmagen, verläuft der kleinen Krümmung des Labmagens entlang, von wo seine Endverzweigungen den Labmagen innervierend bis zum Pylorus reichen. 4—5 kleinere Zweige des Plexus atrii ventriculi gehen auf die linke Oberfläche des Rumen über und umgehen den dorsalen Rand des letzteren. 2—3 Zweige verlaufen im Sulcus rumini cranialis, um in den Sulcus longitudinalis zu ziehen, wo sie entlang der Arteria ruminalis sinistra verlaufen. 5—6 dünne Äste versorgen die Wand des Reticulum und des Omasus. Vom Plexus atrii ventriculi und vom Plexus solaris kommen einige Bündel miteinander verflochten und verzweigen sich entlang der Arteria omentalis. Wir nennen sie Nervi omentali.

Der Truncus oesophageus ventralis gibt unmittelbar nach seinem Eintritt in die Bauchhöhle 1—2 dünne Äste ab, die der Arteria reticularis entlang zum Plexus solaris führen, sowie auch 2—3 kleine Zweige zum Atrium ruminis und zum Oesophagus. In seinem weiteren Verlauf breitet sich der Truncus oesophageus ventralis fächerartig aus und bildet auf der dorsalen und ventralen Oberfläche des Collum omasi (im Niveau des Sulcus oesophageus) ein Nervengeflecht. Sokolowa und Klimontow nannten dieses Geflecht »Plexus ventricularis cranio-ventralis«, doch ist diese Benennung gleichfalls unrichtig, da sie der Topographie des Plexus nicht entspricht. Auf Grund seiner Topographie nannten wir dieses Geflecht »Plexus interreticulo-omaseus« (Abb. 2, *6*).

Der Plexus interreticulo-omaseus führt außer den Zweigen des Truncus oesophageus ventralis auch die Äste des Plexus solaris und des Plexus atrii ventriculi. Den dorsalen Teil des Plexus interreticulo-omaseus bilden die Zweige des Truncus oesophageus ventralis sowie des Plexus solaris, während sein ventraler Teil die Äste des Truncus oesophageus ventralis, Plexus solaris und Plexus atrii ventriculi enthält.

Aus dem dorsalen Teil des Plexus interreticulo-omaseus kommen einige Äste zur Wand des Reticulum und Omasus, um dort entlang der großen Krümmung zu verlaufen. Ein dicker Ast geht auch zum Labmagen und versorgt hauptsächlich dessen Pylorusteil (Nervus pyloricus). Der Nervus pyloricus zieht anfangs entlang des Reticulum und des Omasus zur kleinen

Krümmung des Labmagens, sendet einige Äste zur Labmagenwand und zum Omentum maior, wonach seine Endausbreitungen die Region des Pylorussphynkter versorgen.

Die Äste des ventralen Teiles vom Plexus interreticulo-omaseus versorgen Reticulum, Omasus und Abomasus, das Gebiet des Sulcus oesophageus (besonders reichlich), ferner die Leber.

Sämtliche Äste des Plexus atrii ventriculi und des Plexus interreticulo-omaseus verlaufen im Labmagen, im Netzmagen, sowie auch im Blättermagen subserös. An manchen Stellen dringen sie sogar in die Tunica muscularis ein.

Besonders charakteristisch erscheint, daß die Hauptmasse der Vagusäste im Atrium ruminis, Sulcus oesophageus und im Gebiet der Muskelstränge vom Rumen verlaufen. Diese Verteilung der Nerven steht vermutlich mit der eigenartigen Koordination der Motorik der Kaumagen von Wiederkäuern im Zusammenhang. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen stehen im Einklang mit der Beschreibung von RENZONI (1956), der festgestellt hat, daß der Sulcus oesophageus bei Wiederkäuern besonders reich an Nervenelementen ist, ferner daß im Bestand seiner Lippen eine fast zusammenhängende Schicht von Nervenzellen vorhanden ist. Aus der obigen Beschreibung ist zu ersehen, daß der Pylorusteil des Labmagens gleichfalls äußerst reich innerviert ist, was vermutlich mit der wichtigen Rolle des Pylorus im Verdauungsmechanismus zusammenhängt.

ELLENBERGER und BAUM behaupten, daß der Truncus oesophageus dorsalis dem Nerven des Rumen, der Truncus oesophageus ventralis jedoch dem Nerven des Reticulum, Omasus und Abomasus entspräche. Unserer Ansicht nach ist diese Behauptung nicht mit den Tatsachen vereinbar. Der Truncus oesophageus dorsalis und ventralis — wie bereits PETROSJAN (1954) und IBRAGIMOW (1958) richtig erkannten — versorgen sämtliche Abteilungen des Wiederkäuermagens. Die Frage der Innervation der Därme durch die Fasern der Nervi vagi ist bis zum heutigen Tag eines der ungelösten Probleme der Morphologie geblieben. Mehrere Verfasser sind der Ansicht (STEINACH [1895], KEN-KURE [1935], LEGRO, MAIER, u. a.), daß die Nervi vagi bloß einen unbedeutenden Teil des Zwölffingerdarms versorgen. Andere Verfasser (FINKELBRANDIENE [1955], DOLGO-SABUROW [1938—1957], STILLING [1842]) behaupten, daß die Versorgung des gesamten Dünndarmtraktus die Aufgabe der Vagi sei. Schließlich weisen einige Forscher, wie A. KOROTKOW (1957) darauf hin, daß der Vagus nicht nur den Dünndarmtraktus, sondern auch den Anfangsabschnitt des Dickdarmtraktus innerviert. TEITELBAUM (1933) behauptete, daß die Zweige des Nervus vagus den gesamten Darmtraktus einschließlich des Anus versorgen. DE CASTRO und Mitarbeiter (1948) meinen, daß das Jejunum und das Ilium keine vagale Innervation aufweisen.

All dies beweist, daß die Frage der Ausbreitung des Nervus vagus in

den Organen der Bauchhöhle, insbesondere im Darmtraktus dringender Lösung durch spezielle Untersuchungen bedarf.

Wir haben bei unseren Untersuchungen mittels Feinpräparation, sowie durch die Zerlegung der Nerven in Bündel und Fasern, festgestellt, daß bei Schafen, Ziegen und Kühen 35—40% der Fasern des Truncus oesophageus dorsalis in den Plexus solaris eintritt, wo sie zum Teil unterbrochen werden, zum anderen Teil jedoch ohne Unterbrechung entlang der kranialen Zweige der Arteria mesenterica weiterziehen. Diese Fasern können mit Ausnahme des kaudalen Teiles des Colon, und des Rectum in allen Teilen des Darmtraktus verfolgt werden, wobei der Anfangsteil des Darmtraktus (Duodenum) hauptsächlich von den Vagusästen, der kaudale Teil jedoch (Colon), im überwiegenden Teil von den Ästen des Plexus solaris innerviert wird. Die mittleren Teile des Darmtraktus erhalten annähernd die gleiche Anzahl von Vagus- und Sympathicusästen. Dieser Verlauf der Vagusäste bestätigt die Vorstellung von LAWRENTJEW, dergemäß die Vagusäste im Prozeß der historischen Entwicklung in kaudaler Richtung fortschreitend immer mehr Organe der Bauchhöhle erfaßten, sowie auch seine Behauptung, daß bei Tieren nicht in allen Teilen des Verdauungstraktus eine gleiche Anzahl sympathischer und parasympathischer Faser zu finden sei.

Wir haben bei Schafen, Ziegen und Elentieren den Truncus oesophageus dorsalis und ventralis in Bündel zerlegt und festgestellt, daß die Hauptmasse der den Labmagen, Reticulum, Omasus, Pankreas und Leber versorgenden Vagusfasern aus dem rechten Nervus vagus entspringt, während die den Rumen innervierenden Vagusfasern größtenteils aus dem linken Vagus stammen. Zur Innervation des Darmtraktus treten in den Plexus solaris in annähernd gleicher Anzahl Bündel aus beiden, dem rechten und dem linken Nervus vagus ein.

FONTANA unternahm im Jahre 1871 erstmalig die Untersuchung der inneren Struktur der peripherischen Nerven, dies bildete den Anfang der vielen nachfolgenden Versuche zur Klärung der inneren Nervenstruktur.

Bekanntlich ist die Struktur des Nervus vagus äußert komplizierter Natur. Wie DOLGO-SABUROW richtig erkannte, ist der Vagus nicht nur ein Nerv, sondern ein Nervensystem. Daher ist die Untersuchung der inneren Struktur des Nervus vagus für die Neuromorphologen von besonderem Interesse.

VAN GEHUCHTEN und MALHONT (1911) fanden in der Zusammensetzung der Nervi vagi 3 Faserntypen, die sich voneinander nur hinsichtlich der Dicke der Markscheide unterschieden. STÖHR (1931) hat nachgewiesen, daß die Rami pulmonales nervi vagi markhaltige Nervenfasern enthalten. Gemäß den Angaben von MÜLLER (1931) führt der Pars cervicalis nervi vagi zum überwiegenden Teil markhaltige Nervenfasern. OTELIN (1948) untersuchte die Wurzeln des Nervus vagus am Menschen und stellte fest, daß sie aus 2 Arten

sich voneinander nur in der Form der Kerne der Schwannschen Scheiden (Neurilemm) unterscheidenden marklosen Nervenfasern, sowie aus markhaltigen Fasern bestehen. KISS und MIHALIK (1929) stellten fest, daß die Hauptmasse des Nervus vagus aus dünnen, markhaltigen Fasern besteht, doch kommen im Vagus äußerst selten auch marklose Fasern vor. KISS und MIHALIK behaupten, daß marklose Fasern im Vagusstamm nur im Pars cervicalis erscheinen, und daß sie vermutlich durch die vom Truncus cervicalis kommenden Verbindungszweige hierher gelangen. HOFFMANN und KUNTZ (1957) haben gleichfalls festgestellt, daß im Pars cervicalis nervi vagi die marklosen Nervenfasern in größerer Anzahl vorkommen, als im Anfangsabschnitt des Vagus. Sie erklären diese Vermehrung der marklosen Fasern mit dem Umstand, daß die Fasern in ihrem Verlauf zahlreiche Kollaterale abgeben. HOFFMANN und KUNTZ sind der Ansicht, daß im Vagus nur wenig sympathische Fasern vorhanden sind. PERWUSCHIN (1957) beobachtete bei Hunden und Katzen im Pars abdominalis nervi vagi eine große Menge markloser Nervenfasern und nur ganz wenig markhaltige Fasern von dünnem und mittlerem Kaliber.

Im Laufe unserer nach der von WOROBJEW vorgeschlagenen Methode durchgeführten Untersuchungen wandten wir unsere Aufmerksamkeit hauptsächlich auf das Aussehen der Nervenfasern und auf den Charakter der Glia-Gebilde, d. h. auf die Struktur der Markscheiden und Schwannschen Scheiden.

Im Ergebnis unserer Untersuchungen gelang es uns von den im Nervus vagus vorhandenen Nervenfasern 5 verschiedene Typen nachzuweisen. Bei der Bestimmung der einzelnen Typen wurden folgende morphologische Kennzeichen in Betracht gezogen: 1. das Vorhandensein oder das Fehlen von Markscheiden, 2. die Dicke der Fasern, 3. der Charakter der Ranvierschen Einschnürungen, 4. die Schmidt-Lantermannschen Einkerbungen und 5. die Form der Kerne in den Schwannschen Zellen.

Die Klassifikation der Nervenfasern auf Grund ihrer morphologischen Kennzeichen hat eine ungeheuere Bedeutung in der Klärung des Wesens der peripherischen Innervation. GRIGORJEWA (1954) schreibt über diese Frage folgendes: »bekanntlich besteht zwischen der funktionalen Charakteristik der Nervenfasern und ihren strukturellen Eigenschaften eine feine Korrelation«. Diese strukturellen Eigenschaften finden — unserer Meinung nach — ihren Ausdruck in erster Reihe in der Dicke der Fasern, sowie im Aufbau der Ranvierschen Einschnürungen und der Schmidt—Lantermannschen Einkerbungen. TASAKI (1957) erbrachte in seinen hervorragenden Arbeiten den Nachweis, daß die Ranvierschen Einschnürungen eine primäre Rolle in der sprungartigen Leitung der Nervenimpulse spielen. Nicht zu bezweifeln ist ferner auch die große Bedeutung der Schmidt—Lantermannschen Einkerbungen in der Funktion der Nervenfasern. NEMILOV (1910) schrieb, daß ihre Zahl, Häufigkeit und überhaupt ihr Vorhandensein mit bestimmten

funktionellen Momenten der Nervenfasern im Zusammenhang steht, ferner, daß diese Einkerbungen in manchen Nervenfasern dicht und zahlreich sind, und bei anderen nur selten vorkommen.

Die Bestimmung der verschiedenen Typen der myelinarmen, marklosen Nervenfasern kann auf Grund der Elemente der Schwannschen Scheide, in

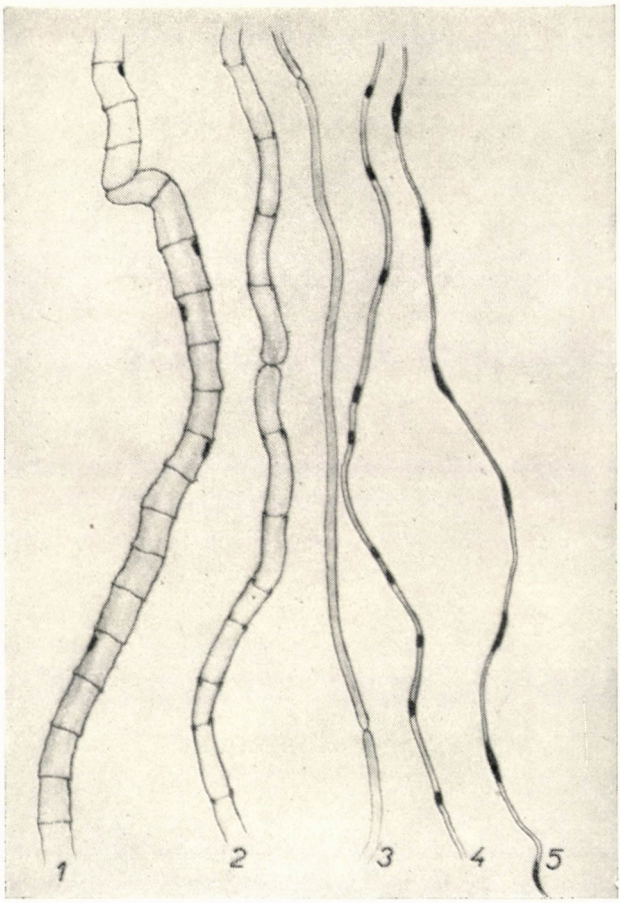


Abb. 3. Die Nervenfasern des Truncus nervi vagi
1. — Dicke markhaltige Nervenfasern, 2. — Mittelmäßig dicke markhaltige Fasern, 3. — Dünne markhaltige Fasern, 4. — Marklose Fasern mit ovalen Kernen der Schwannschen Zellen, 5. — Marklose Fasern mit spindelförmigen Kernen in der Schwannschen Scheide

erster Reihe nach der Form ihrer Kerne erfolgen. Diese Scheide, so wie auch die Markscheide, bildet mit dem Achsenzylinder eine einheitliche funktionelle Struktur. Daraus folgt, daß ihre strukturellen Eigenschaften mit den funktionellen Besonderheiten der Nervenfasern in linearem Zusammenhang stehen.

Im Nervus vagus von Wiederkäuern (Schafen, Ziegen und Kühen) sind folgende Faser-Typen zu finden:

1. Dicke markhaltige Fasern 16—20 μ (ohne ausgeprägte Schnürringe und mit häufigen Schmidt—Lantermannschen Einkerbungen (Abb. 3, *1*). Die Entfernung zwischen den Einkerbungen ist gering — 15—20 μ. Diese bilden die Hauptmasse des Nervus recurrens, Nervus laryngeus cranialis und der Rami pharyngei nervi vagi. Unserer Ansicht nach entsprechen sie den motorisch-somatischen Fasern.

2. Markhaltige Nervenfasern mittleren Kalibers (6—16 μ). In diesen Fasern sind die Ranvierschen Einschnürungen ausgeprägt, doch Schmidt—Lantermannsche Einkerbungen kommen seltener vor (Abb. 3, *2*). Der Abstand zwischen den Schnürringen beträgt 600—750 μ, zwischen den Einkerbungen 30—45 μ. Die Häufigkeit der letzteren steht mit der Dicke der Fasern in Zusammenhang. Je dicker die Faser, umso dichter die Einkerbungen und umgekehrt, bei dünnen Fasern war die Zahl der Einkerbungen geringer. Über eine ähnliche Relation berichtet auch Bruch Hiscoe (1947). Fasern dieses Types sind im kaudal vom Plexus reticularis verlaufenden Teil des Vagus in besonders großer Anzahl zu finden, doch sind sie auch in sämtlichen Vagusästen vorhanden. Wir betrachten diese als afferente Fasern.

3. Markhaltige Fasern von dünnem Kaliber (2—6 μ) und mit deutlich ausgeprägten Ranvierschen Einschnürungen, ohne Schmidt—Lantermannsche Einkerbungen. Der Abstand zwischen den Einschnürungen beträgt 500—600 μ (Abb. 3, *3*).

4. Marklose oder myelinarme Nervenfasern (Abb. 3, *4*) mit einem Durchmesser von 2—4 μ. In diesen Fasern sind die Kerne der Schwannschen Zellen oval (Remaksche Fasern). Die Rami cardiaci nervi vagi, sowie die zum Rumen, Reticulum und Omasus ziehenden Vagusäste führen zum überwiegenden Teil solche Fasern. In geringerer Anzahl sind sie in allen übrigen Zweigen des Nervus vagus gleichfalls zu finden. Hinsichtlich des Vorhandenseins von Markscheiden bei den Remakschen Fasern gehen die Meinungen auseinander. Clara (1956), Stöhr, Müller (1933) und andere meinen, daß es unter ihnen überhaupt keine marklosen Fasern gäbe. Beidl (1952) ist gegenteiliger Ansicht, und behauptet, es gäbe vollkommen marklose Fasern. Wir haben im Laufe unserer Untersuchungen die Fasern mit Eisen-Hämatoxylin gefärbt, und gelangten zu der Überzeugung, daß diese Fasern eine dünne Myelinscheide haben.

5. Marklose Nervenfasern (1—4 μ) in deren Schwannschen Scheiden die Kerne spindelförmig sind. (Abb. 3, *5*). Ihr Kerndurchmesser ist größer als der Durchmesser von den Fasern. Die Hauptmasse der zum Labmagen, der Leber und zum Darmtraktus führenden Vagusäste besteht aus Fasern von diesem Typus. Da diese Fasern in großer Menge in den Nerven drüsiger

Organe zu finden sind, kann angenommen werden, daß sie irgendeine Rolle in der sekretorischen Funktion der Drüsen spielen.

Auf Grund unserer Untersuchungen, sowie der Analyse der erhaltenen Daten gelangten wir zu den folgenden Schlüssen :

1. Bei Wiederkäuern hat der Nervus vagus im Vergleich zum Nervus sympathicus, sowohl hinsichtlich der Masse seiner Nervenfasern, als auch seiner Versorgungsgebiete, das Übergewicht. Mit zunehmendem Alter der Tiere wird dieses Übergewicht noch ausgeprägter.

2. Bei Ziegen, Schafen und Rindvieh fehlt das Ganglion reticulare als solches. Statt seiner ist bei diesen Tieren der Plexus reticularis zu finden, und zwar in Form eines dichten Geflechts von Nervenbündeln, zwischen denen zerstreut kleine Ganglien eingeschlossen sind.

3. Der Plexus reticularis des Vagus spielt eine bedeutende Rolle in der innerhalb des Nervenstammes erfolgenden Umschaltung der Nervenbündel und in der Ganglienanhäufung.

4. Der Nervus laryngeus cranialis und der Nervus recurrens treten unterhalb des Schildknorpels miteinander in Verbindung und innervieren außer dem Larynx auch noch den Oesophagus, die Trachea, ferner die zu ihnen gehörende Skelettmuskulatur.

5. Der Truncus vagus und Truncus sympathicus tauschen im Halsteil, in der Brusthöhle und in der Bauchhöhle untereinander ihre Nervenbündel aus.

6. Die Innervation des Herzens geschieht in der Hauptsache durch die aus dem Ganglion stellatum kommenden Abzweigungen und nur in geringem Ausmaß durch die Vagusäste.

7. Bei Kleinvieh erfolgt die Innervation der Lungen zum überwiegenden Teil durch die Zweige des linken Nervus vagus.

8. Bei Kleinvieh führt der Truncus oesophageus dorsalis größtenteils die Nervenbündel des linken Nervus vagus (bei Elentieren die des rechten Vagus). Bei Schafen und Ziegen wird der Truncus oesophageus ventralis überwiegend von den Fasern des rechten Vagus, oder aus den Fasern beider Nervi vagi in gleicher Anzahl gebildet.

9. Die Innervation des mehrkammerigen Wiederkäuermagens besorgen zwei subseröse Geflechte : der Plexus atrii ventriculi und der Plexus interreticulo-omaseus. Der Plexus atrii ventriculi besteht aus den Zweigen des Truncus oesophageus dorsalis, sowie des Plexus solaris und versorgt Rumen, Reticulum, Omasus und Labmagen (Abomasus). Der Plexus interreticulo-omaseus wird vom Truncus oesophageus ventralis gebildet, und seine Äste versorgen das Gebiet des Sulcus oesophageus, des Atrium ruminis, sowie Reticulum, Omasus und Abomasus. Der überwiegende Teil der Vagusäste verläuft im Gebiet des Sulcus oesophageus, des Atrium ruminis, in den länglichen Muskelsträngen des Rumen und im Pylorussphinkter.

10. Die Nervenbündel des Vagus begleiten die Zweige des Plexus solaris

entlang sämtlicher kleiner Verzweigungen der Arteria mesenterica cranialis und innervieren den gesamten Dünn- und Dickdarmtraktus, mit Ausnahme des kaudalen Teiles vom Colon und vom Rectum.

11. In dem Nervus vagus können 5 Nervenfaserntypen festgestellt werden: dicke, mittlere und dünne markhaltige, sowie zwei Typen von marklosen Nervenfasern.

12. Bei Elentieren sind die Nervi vagi in großen Zügen den Nervi vagi der wiederkäuenden Haustiere ähnlich.

LITERATUR

1. Auerbach, L.: (1864) Feinere Untersuchungen über den Nervenapparat des Darmes. Wirchow's Archiv. *30*. — 2. Beidl, W.: (1952) Zur Morphologie der Nervenfaser. Acta Anatomica *25*. — 3. Беляев, В. В.: (1957) Внеорганные вегетативные нервы органов грудной полости мелкого рогатого скота. Тезисы докладов XXXI. научн. конф. Новочеркасск. — 4. Беляер, В. В.: (1958) Внеорганные нервы кишечника мелкого рогатого скота. Труды Новочеркасского вет. ин-та. В—XI. — 5. Bruch Hiscoe, H.: (1947) Distribution of Nodes and Incisures in Normal and Regenerated Nerve Fibers. Anat. Rec. *99*. 6. Воробьев, В. П.: (1958) Избрайные труды. Ленинград. — 7. Григорьева, Т. А.: (1957) О строении безмякотных нервных волокон. Архив А. Г. и Э. Т—34. № 1, Ленинград. 8. Hoffman, H.—Kuntz, A.: (1957) Vagus nerve components. Anat. Rec. *127*. — 9. Долго-Сабуров, Б. А.: (1937) К учению о строении блуждающего нерва. Сб. трудов В. М. М. А. Т. — 10. Долго-Сабуров, Б. А., Кузнецов, А. И.: (1941) О природе блуждающего нерва в свете учения о нейрогуморальной регуляции. Бюлл. экспер. биологии и медицины, № 6, Т.—XI, В—6, Москва. — 11. Докукина, А. П.: (1956) Материалы к анатомии связей между пограничными симпатическими стволами и блуждающими нервами у человека и животных. Материалы 19-ой научн. конф. Рязанского мед. ин-та. Рязань. — 12. Ellenberger—Baum: (1943) Handbuch der vergleichenden Anatomie der Haustiere. Berlin. — 13. Золина, Е. И.: (1956) Материалы к анатомии блуждающих нервов человека и животных. Матер. 19-ой научной конф. Рязанского мед. ин-та. Рязань. — 14. Ибрагимов, Ш. И.: (1958) К анатомии блуждающего нерва каракульской овцы. Доклады А. Н. Узбекской ССР. № 3. — 15. Ковшикова, Л. М.: (1952) Блуждающий нерв лошади и иннервация им внутренних органов. Дисс. Л. — 16. Кен-Куре: (1935) Значение блуждающего нерва в парасимпатической иннервации органов брюшной полости. Советская невропатология, псих. и психогигиена. Т. IV. В—2. — 17. Clara, M.: (1955) Wo steht die Morphologie der neurovegetativen Periferie. Acta Neuroveget., *6*, Suppl., 1—17. — 18. Kiss, F., Mihalik, P.: (1929) Über die Zusammensetzung der peripherischen Nerven ... Zeitschr. f. Anat. und Entw. *88*. — 19. Климонтов, М. И.: (1957) Блуждающий нерв северного оленя и иннервация им внутренних органов. Дисс. Ленинград. — 20. Лаврентьев, Б. И.: (1927) Окончания волокон блуждающего нерва в сердце млекопитающих. Казанский мед. журнал. 1927 г. № 6—7. Казань. — 21. Лангебахер, Л.: (1877) Материалы для сравнительной анатомии блуждающих нервов у домашних животных. Дисс. Петербург. — 22. Lantermann, A. J.: (1876) Über den feineren Bau der markhaltigen Nervenfasern. Arch. f. Mikr. Anat. *13*. — 23. Miller, L. K.: (1933) Die Beziehungen des sympathischen Systems zum parasympatischen. Münch. Med. Wochenschr. *17*. — 24. Nemiloff, A.: (1910) Über die Beziehungen der sog. »Zellen Schwannschen Scheide zum Myein in den Nervenfasern von Säugetieren«, Arch. f. N. Anat. *76*. — 25. Оделин, А. А.: (1948) Строение корешков блуждающего нерва человека. Сб. материалов по макро-микроскопии. Москва. — 26. Осипов, И. П.: (1956) К морфологии вегетативной нервной системы кр. рог. скота. Сб. трудов Харьковского зоотехн. ин-та. Т.—VIII, Киев. — 27. Перегудин, В. Ю.: (1957) Об источниках иннервации поджелудочной железы. Вестник хирургии им. Грекова. Т. 79, М—Л. — 28. Плетнев, С. А.: (1956) К микроморфологии вегетативной нервной системы сложного желудка жвачных. Сталинград. — 29. Петросян, З. В.: (1954) Вегетативная система буйволов. Дисс. Ереван. — 30. Perman, E.: (1924) Anatomische Untersuchungen über Herznerven bei höheren Säugetieren und beim Menschen. Zeitschr. f. Anat. u. Entw. *71*. — 31. Португалов, В. В.: (1946) Строение безмякотных нервных волокон периферических

нервов. Сб. «Морфология автономной нервной системы» Москва. — 32. **Renzoni, A.: (1956) Il pleso di Auerbach nella doccia esofagea dei ruminanti. Arch. ital. anat. e embriol. *61*.** — 33. Тасаки, И: (1957) Проведение нервного импульса. Москва. — 34. Терновский, В. Н.: (1924) Парасимпатическая нервная система. Ж. Психологии, неврологии и психиатрии. Т. IV. М. — 35. **Finkelbrandiene, S. B.: (1958) Klaiokio nerve preganglijiniu scaiduli pasiskirstumes zarnune. Sammlung wissenschaftlicher Werke der Med. Univ. Wilna.** — 36. **Steinach, E.: (1898) Über die viscero-motorischen Funktionen der Hinterwurzeln ... Arch. f. Physiol. *71*.** — 37. **Stöhr, Ph., Möllendorf, W. und Goertler, K.: (1955) Lehrbuch der Histologie. Jena.**

Zusammenfassung

Bei Wiederkäuern (Schafen, Ziegen, Kühen und Elentieren) haben die Nervi vagi das Übergewicht über die sympathischen Nerven. Dieses Übergewicht wird mit zunehmendem Alter der Tiere noch ausgeprägter. Das Ganglion reticulare fehlt bei Schafen, Ziegen und Kühen, statt seiner ist bei diesen Tieren der Plexus reticularis zu finden, und zwar in Form eines dichten Geflechtes von Nervenbündeln, zwischen denen zerstreut Nervenknötchen eingeschlossen sind.

Der Truncus vagus und Truncus sympathicus tauschen im Halsteil, in der Brusthöhle und in der Bauchhöhle untereinander ihre Nervenbündel aus. Das Herz wird in der Hauptsache durch die aus dem Ganglion stellatum kommenden Zweige innerviert und nur in geringerem Ausmaß durch die Vagusäste. Die Lungen hingegen werden hauptsächlich von den Zweigen der Nervi vagi versorgt.

Bei Schafen und Ziegen führt der Truncus oesophageus dorsalis größtenteils Nervenbündel des linken Nervus vagus (bei Elentieren die des rechten Vagus). Bei Kleinvieh wird der Truncus oesophageus ventralis überwiegend von den Fasern des rechten Vagus, oder aus den Fasern beider Nervi vagi gleicher Anzahl gebildet.

Die Innervation des mehrkammerigen Wiederkäuermagens besorgen zwei subseröse Geflechte: der Plexus atrii ventriculi und der Plexus interreticulo-omaseus. Der Plexus atrii ventriculi besteht aus den Zweigen des Truncus oesophageus dorsalis, sowie des Plexus solaris und versorgt Rumen, Reticulum, Omasus und Abomasus, der Plexus interreticulo-omaseus wird vom Truncus oesophageus ventralis gebildet und seine Zweige innervieren das Gebiet des Sulcus oesophageus, des Atrium ruminis, sowie Reticulum, Omasus und Abomasus. Der überwiegende Teil der Vagusäste verläuft im Gebiet des Sulcus oesophageus, des Atrium ruminis, in den länglichen Muskelsträngen des Rumen und im Pylorussphinkter.

Die Nervenbündel des Nervus vagus begleiten die Zweige des Plexus solaris und innervieren den gesamten Dünn- und Dickdarmtraktus, mit Ausnahme des kaudalen Teiles vom Colon und vom Rectum. Im Nervus vagus können 5 Typen von Nervenfasern festgestellt werden: dicke, mittlere und dünne markhaltige, sowie zwei Typen von marklosen Nervenfasern.

Bei Elentieren sind die Nervi vagi in großen Zügen ihrer Struktur und ihrer Topographie nach den Nervi vagi der wiederkäuenden Haustiere ähnlich.

МОРФОЛОГИЯ БЛУЖДАЮЩИХ НЕРВОВ И ИХ РАЗВЕТВЛЕНИЙ У ЖВАЧНЫХ

Ю. Х. МИНДУБАЕВ

У жвачных (овцы, козы, коровы и лося) блуждающие нервы преобладают над симпатическими. С возрастом это преобладание ещё более увеличивается. Сетевидный узел у овец, коз и коров отсутствует — у них имеется лишь сетевидное сплетение в виде густого переплетения нервных пучков с включенными между ними нервными узелками.

Блуждающие нервы и симпатические стволы в области шеи, грудной и брюшной полостей обмениваются между собой нервными пучками. Сердце иннервируется главным образом ветвями звездчатых узлов и в меньшей степени ветвями блуждающих нервов. Легкие, напротив, иннервируются главным образом ветвями блуждающих нервов.

Дорзальный пищеводный ствол у овец и коз образуется в основном пучками левого (у лося — правого) вагуса. Вентральный пищеводный ствол образуется у овец и коз главным образом за счёт правого или равным образом волокнами обоих блуждающих нервов.

Иннервация сложного желудка жвачных осуществляется из двух подсерозных сплетений: – преддверного и межсетко-книжкового. Преддверное сплетение, образованное ветвями дорзального пищеводного ствола и солнечного сплетения, иннервирует рубец, сетку, книжку и сычуг. Межсетко-книжковое сплетение, образованное вентральным пищеводным стволом снабжает своими ветвями область пищеводного желоба, преддверия рубца, пилорического сфинктера, сетку, книжку и сычуг. Преобладающая часть разветвлений блуждающих нервов располагается в области пищеводного желоба, преддверия рубца, продольных мускульных тяжей рубца и пилорического сфинктера.

Нервные пучки блуждающих нервов, сопровождающие ветви солнечного сплетения, иннервируют весь тонкий и толстый отделы кишечника, исключая каудальный участок ободочной и прямую кишки. В составе блуждающих нервов имеется 5 видов нервных волкон : – толстые, средние и тонкие мякотные и 2 вида безмякотных.

Блуждающие нервы лося в основных своих чертах строения и топографии сходны с блуждающими нервами домашних жвачных.

MORPHOLOGY OF THE VAGUS NERVE AND ITS BRANCHES IN RUMINANTS

J. MINDUBAEV

In ruminants (sheep, goat, cattle and deer) vagus nerves predominate over the sympathetic nerves. This predominance increases with age. In sheep, goat and cattle there is no reticular ganglion, — in these animals only a reticular plexus is to be found, consisting of a rich network of nerve bundles and containing small ganglia.

The vagus nerves and the sympathetic trunks in the neck, as well as in the thorax and abdominal cavity are interconnected with each other by nerve bundles. The heart is innervated predominantly by branches of the stellate ganglia and in a smaller degree by branches of the vagi. The nervous supply of the lungs, on the contrary, is predominantly of vagal origin.

The dorsal esophageal trunk in the sheep is formed chiefly by bundles arising from the left vagus (in the deer — from the right one). The ventral esophageal trunk is formed in the sheep and goat mainly by fibres of the right vagus or in an equal proportion of both vagi.

The complex stomach of ruminants is innervated by two subserosal plexi : the vestibular and the omaso-interreticular. The vestibular plexus, formed by fibres from the dorsal esophageal trunk and the celiac ganglion, supplies the rumen, the reticulum, the omasum (manyplies) and the abomasum (fourth stomach). The omaso-interreticular plexus, arising from the ventral esophageal trunk, innervates the areas of the esophageal sulcus, of the vestibule of the rumen, and of the pyloric sphincter, as well as the reticulum, the omasum and the abomasum. The greatest part of vagus branches is found around the esophageal sulcus, in the vestibule of the rumen, around the longitudinal muscular bundles of the rumen and at the pyloric sphincter.

The nerve bundles of the vagus, accompanying the celiac plexus, supply the small and large intestines with the exception of the rectum and the caudal part of the colon.

The vagus nerves contain 5 types of nerve fibres : thick, medium and thin myelinated fibres and two types of amyelinated fibres.

The vagus nerves of the deer in their main features of structure and topography are similar to the vagi of domestic ruminants.

Ю. Х. МИНДУБАЕВ, СССР. Казань, ул. Зинина 20. № 2.

Department of Physiology (Chief: L. HORVÁTH) College for Special Pedagogy (Rector: G. BÁRCZI), Budapest

SOME DATA CONCERNING THE SUBMICROSCOPIC MORPHOLOGY OF MAST CELLS. II.

L. HORVÁTH

(Received March 13, 1959)

An earlier report [1] gave account of our observation that, upon treatment with acid neutral red, toluidine blue and pyronine G (Grübler), the mast cells of rats become anisotropic. We concluded that mast cells had an oriented structure which — according to ROMHÁNYI [2] — becomes more pronounced on the addition of dye molecules. We isolated mast cells with a view to studying their structure and ascertaining the nature of their birefringence.

Method

Mast cells were isolated by the somewhat modified technique of GLICK, BONTING, DEN BOER [3], PADAWER, GORDON [4] and KELLER [5].

The procedure was as follows. Lower median laparotomy by means of electrocautery (which does not cause haemorrhage so that the cell suspension remains free of erythrocytes) is performed on rats under aether anaesthesia. A mixture composed of four parts of Tyrode and one part of physiological sodium citrate solution is then carefully instilled into the open abdominal cavity (it is advisable to bring the solution to a temperature of 37° C before administration). This done, the lips of the wound are held together by a long-limbed Péan's clamp. The pH of the Tyrode solution should not exceed 7.2; that of the physiological sodium-citrate solution, 7.35.

After massaging the animal's abdomen for 1½ to 2 minutes the clamp is removed and the wound cranially lengthened by 2 cm (the cautery should avoid the umbilical depression). The animal is then brought into a semirecumbant position and approximately half of the introduced solution is withdrawn by means of a syringe. The solution thus extracted is turbid, non-coagulable, and fatty to an extent which depends on the nature and time of the animal's last meal. Although PADAWER and GORDON recommend fractional centrifugation in order to separate mast cells from other cells (granulocytes, lymphocytes, mesothelial cells), we omitted this unphysiological procedure. The cell suspension obtained from the abdomen is centrifuged (300 r. p. m. for 3 minutes) and the supernatant discarded; from the cells a smear is prepared which — while still wet — is fixed in OsO_4 vapour. Dried, the preparation is washed with distilled water in order to remove crystallized salts.

The use of the following dye combination is recommended:

0.1 g of neutral red,
01. g of toluidine blue,
100.0 g of *N*/10 HCl.

Staining, 5 minutes; rinsing with distilled water, drying. Covering with dammar resin or immersion oil.

Results

The preparations obtained by the technique described were examined under a phase contrast microscope provided with polarization filtres. A picture was revealed as illustrated in Figs. 1 and 2.

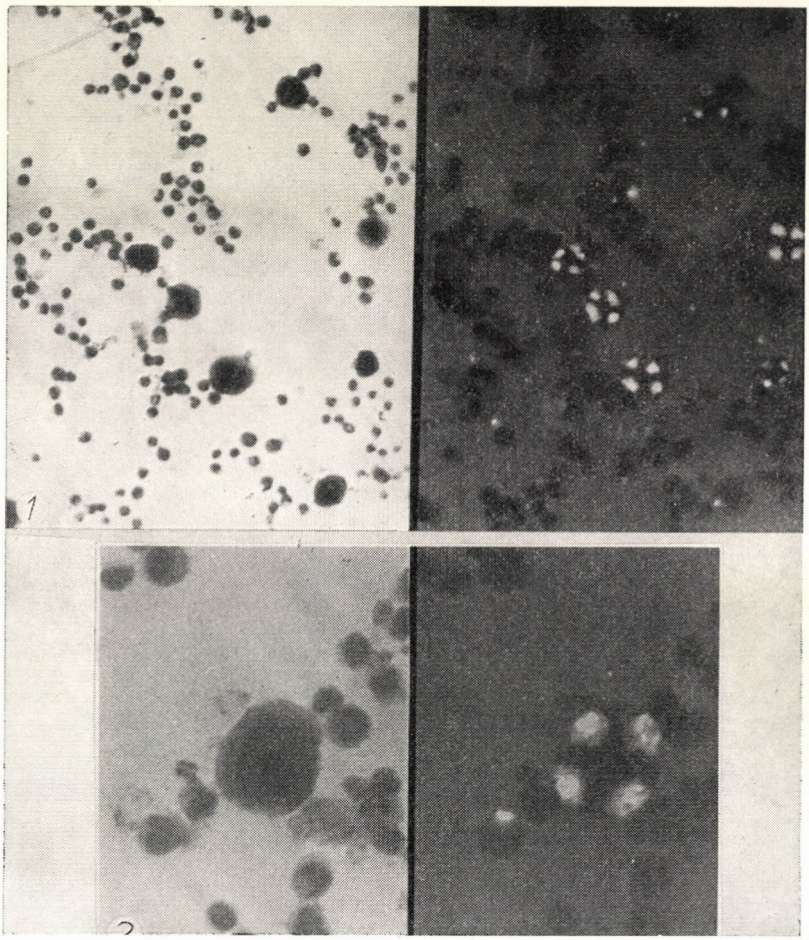


Fig. 1. Cells isolated from the abdomen of rats. Stain : acid neutral red mixed with toluidine blue. Normal and polarization-microphotograph. × 100
Fig. 2. Same as Fig. 1, enlarged × 300. Polarization cross clearly visible

The polarization cross was found to have a positive value. From this it follows that anisotropy was due to the circularly arranged intracellular substance. This substance was not intragranular but intergranular ; this means that the granules of the mast cells were embedded in a circularly oriented protoplasmic substance (Fig. 3).

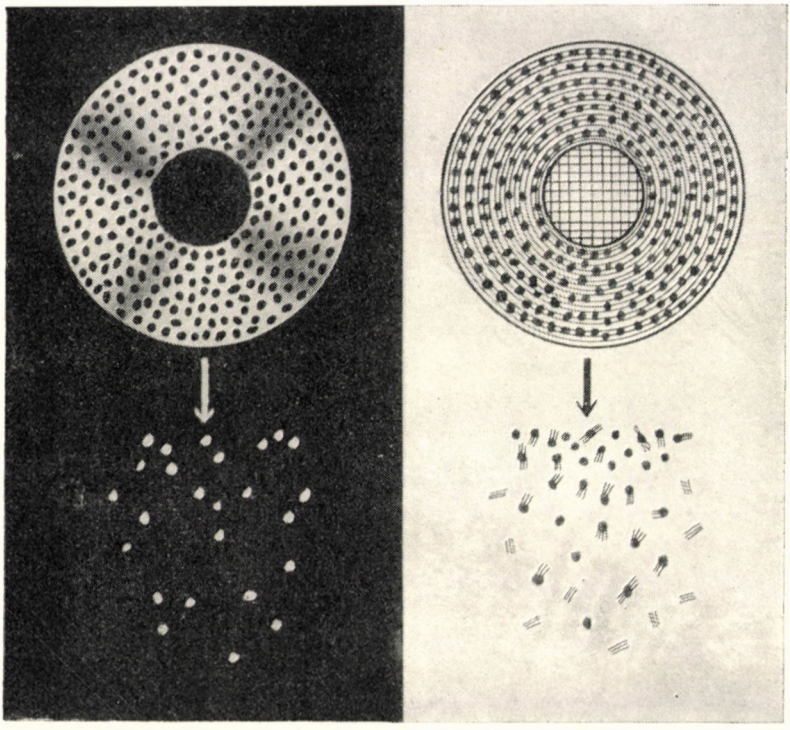
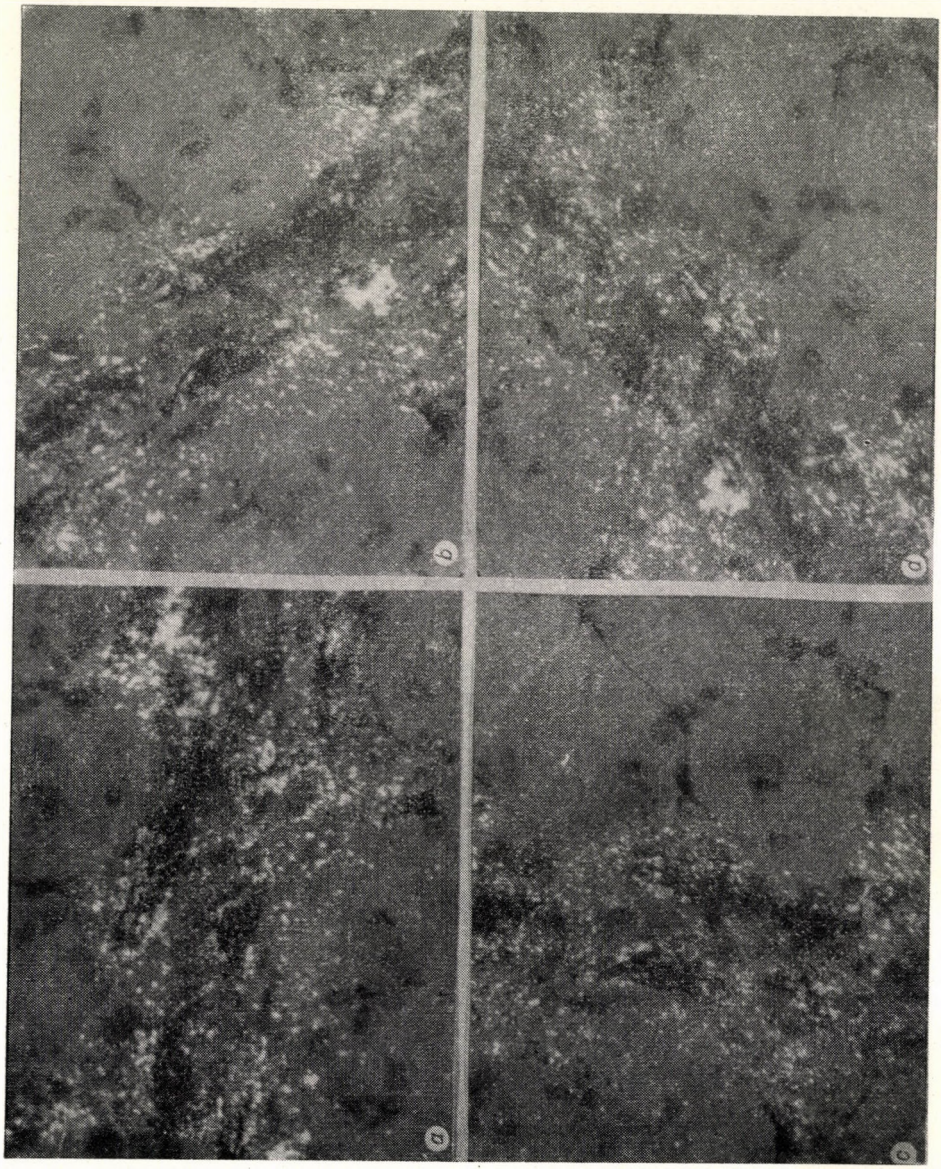


Fig. 3. Polarographic outline of mast cell, and explanatory drawing made on the basis of the positive polarization cross. Arrows point to anisotropic granules released by disintegrated cells ; the figure presents the orientation responsible for anisotropy

Discussion

The above described observation elucidates the phenomenon presented by way of illustrations in our previous publication [1] : around the disintegrated mast cell there are anisotropic granules, invisible in normal light, so that no visible quantity of dye is adsorbed to them. These granules contain, therefore, purely intergranular oriented substance. Worthy of note is further the phenomenon that anisotrophy is displayed also by the granules which bind the dye liberated by the disintegrating cell. We suggest the explanation that, simultaneously with disintegration, the intergranular substance is adsorbed to the granule, or that the latter imbibes the former : optically, the anisotropic substance is sometimes distinguishable from the dye-adsorbing granules in which case the two are observable side by side. It was likewise under the phase contrast microscope combined with polarization filtres that we were able to observe this phenomenon.



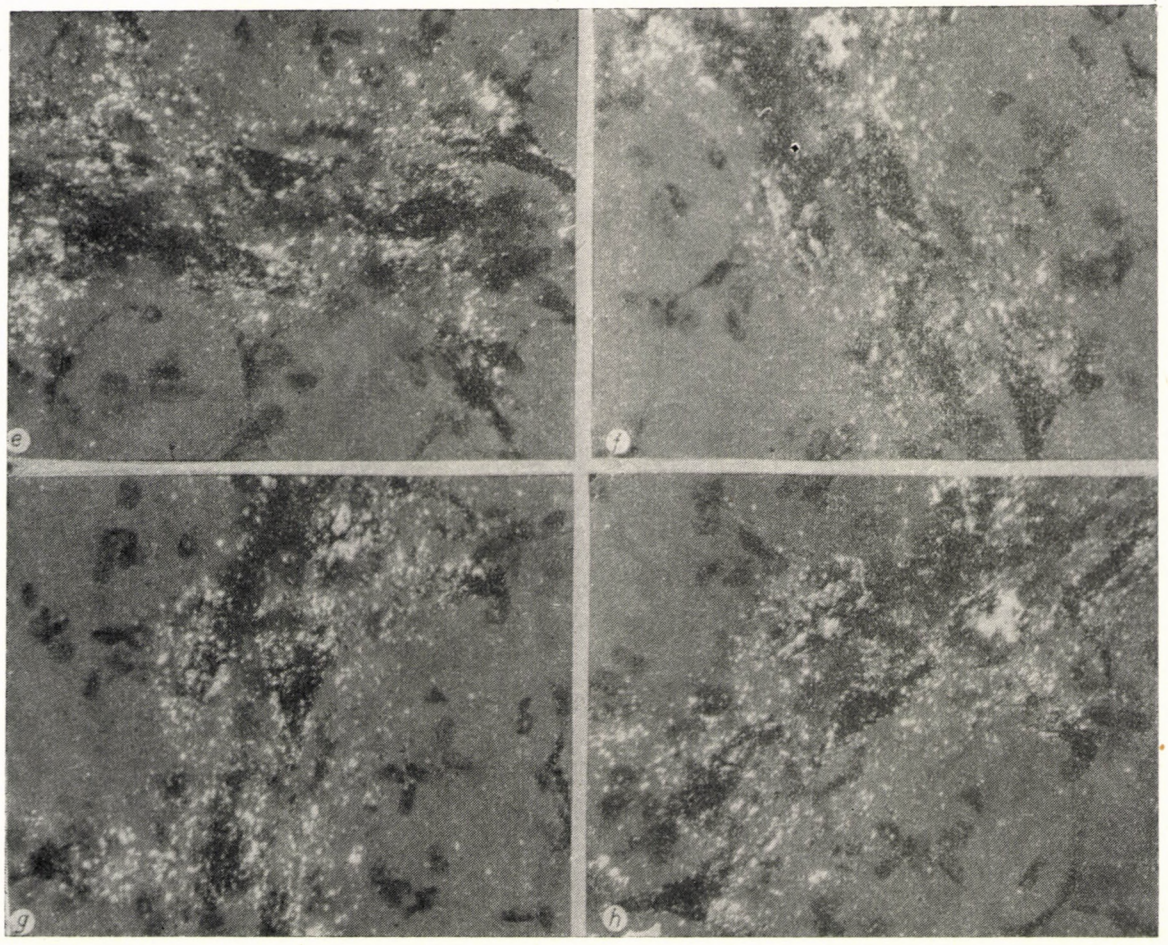
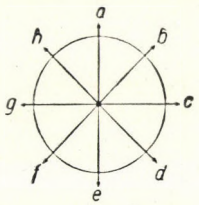


Fig. 4. Preparation of granules from disintegrated mast cell in polarized light, turned over angles of 45°

To facilitate a detailed study of their optical orientation, serial photographs were made of the granules released by disintegrated mast cells. Placing the latter into the optical axis of the microscope, it was turned over an angle of 360°, and after each turn of 1° a picture was taken. We have enlarged



every 45th film and, having no space to present all of the 360 photographs, we present these enlarged films so that there is an angular difference of 45° between each of the eight photographs here reproduced.

Summary

The submicroscopic structure of mast cells, isolated from the abdominal cavity of rats, has been examined under the polarization microscope. Stained with a mixture of acid neutral red and toluidine blue, the mast cells display a positive polarization cross which points to the existence of a circularly arranged protoplasmic structure. Anisotropy is due to the intergranular substance.

Polarized photomicrographs were taken in order to facilitate a closer study of the orientation of the granules liberated by disintegrated mast cells.

REFERENCES

1. HORVÁTH, L.: (1959) Some data concerning the submicroscopic morphology of mast cells I. Acta Morph. Hung. *9*. 35. — 2. ROMHÁNYI, G.: Personal communication. — 3. GLICK, D., BONTING, S. L., DEN BOER D.: (1956) Isolation of mast cells. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.). *92*. 357. — 4. PADAWER, J., GORDON, A. S.: (1955) Effect of colchicine on mast cells of the rat. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) *29*. 522. — 5. KELLER, R.: (1957) Histamin und 5-Hydroxytryptamin in den Gewebsmastzellen der Albinoratte. Helv. physiol. Acta *15*. 371.

ДАННЫЕ К СУБМИКРОСКОПИЧЕСКОЙ МОРФОЛОГИИ ТУЧНЫХ КЛЕТОК. II

Л. ХОРВАТ

Автор исследовал с помощью фазово-контрастного поляризационного микроскопа на основании предлагаемого Гликком и Падавером метода субмикроскопическую структуру изолированных тучных клеток. Он изолировал тучные клетки из брюшой полости белых крыс и фиксированные парами OsO_4 смазки окрасил смесью красителей нейтральный красный и толуидин, растворенной в N/10 HCl. Препарированные и окрашенные этим методом тучные клетки показали положительный поляризационный крест. Данное явление основывается на двойном преломлении межзернистого вещества протоплазмы. Из этого можно заключить, что вещество между зернышками распределено циркулярно.

Зарнышки тучных клеток, в нормальных неповрежденных клетках оптически изотропны. С другой стороны зернышки распавших тучных клеток показывают отчасти анизотропию. Это явление объясняется тем, что при распаде анизотропное межзернистое вещество пропитывает зернышки тучных клеток. В целях более подробного изучения описанного явления автор изготовил от исследованных в поляризационном микроскопе тучных клеток скоростную ротационную киноленту.

BEITRÄGE ZUR SUBMIKROSKOPISCHEN MORPHOLOGIE DER MASTZELLEN, II.

L. HORVÁTH

Es wurde die submikroskopische Struktur von isolierten Mastzellen mittels der Glick und Padawerschen Methode unter dem Phasenkontrast-Polarisationsmikroskop untersucht. Die aus der Bauchhöhle von Albinoratten isolierten Mastzellen wurden in mit OsO_4-Dampf fixierten Ausstrichen mit einem in *N*/10 HCl gelöstem Gemisch von Neutralrot und Toluidinblau gefärbt. Die auf diese Weise präparierten und gefärbten Mastzellen zeigten ein positives Polarisationskreuz. Dieses Phänomen ist durch die Doppelbrechung der intergranulären Protoplasmasubstanz bedingt. Hieraus wurde gefolgert, dass die Intergranularsubstanz zirkulär orientiert ist. Die Körnchen der Mastzellen sind innerhalb der intakten normalen Zellen optisch isotrop. Die Körnchen der zerfallenen Mastzellen hingegen zeigen zum Teil Anisotropie. Diese Erscheinung wird dahingegend erklärt, dass beim Zerfall die anisotrope Intergranularsubstanz die Körnchen der Mastzelle durchtränkt. Zwecks genauerer Untersuchung der beschriebenen Erscheinung wurde ein Raffer-Rotationsfilm von den im Polarisationsapparat untersuchten Mastzellen hergestellt.

Dr. László Horváth, Budapest, VII. Bethlen G. tér 2. Hungary.

Department of Histology and Embryology, Medical University, Budapest
(Director: Prof. I. Törő)

THE BEHAVIOUR OF THE THYMUS IN CONDITIONS ASSOCIATED WITH TISSUE PROLIFERATION

Gy. Csaba, I. Törő, T. Ács and F. I. Kiss †

(Received April 23, 1959)

The thymus has been classified both as a lymphatic organ and as an endocrine gland ; its function is still not clear. The studies on its role yielded conflicting results, depending in part on the species, sex and age of the experimental animals used, and in part on the methods employed in the investigations. There is no such evidence as would make it possible to discuss and study the thymus according to uniform points of view. The role of Hassal's corpuscles, the genesis of thymocytes and the evacuation of the thymus are problems all unclarified [13].

According to our investigations, morphological differences exist between the thymocytes and the lymphocytes produced in the lymph nodes, insofar as the thymocytes give a strongly positive alkaline phosphatase reaction, whereas the lymphocytes do not ; moreover, differences are demonstrable in the cell membrane, too [14, 16]. There is ample evidence in the literature indicating that the two kinds of cells differ in function. For example, many data show that plasma cells develop from lymphocytes, while, for instance, Shelin et al. [10] reported that such plasma cells are present even normally in the lymph nodes and spleen, but not in the thymus, in which they appear in small numbers only, even in response to experimental influences. According to Harris and Harris [7] lymph cells immunized *in vitro* produce antibodies, whereas the thymocytes do not, etc. It seems therefore that the two kinds of cells cannot be considered identical.

As to the other problem in our previous studies we observed that the corpuscles of Hassal secreted a PAS-positive substance corresponding to a neutral polysaccharide, and the corpuscle itself represented the active function of the thymus, developing from the epithelial reticulum of the thymus while secreting the above substance [9, 14, 15, 16, 17, 18].

The third problem is that of the evacuation of the thymus. The thymus is one of the organs that show fastest response in the organism's adaptation reactions ; it may be emptied so fast that it is virtually only the initial and end states that can precisely be determined morphologically. This may be one of the reasons why we do not know how and where the thymus empties

its cells. Some authors suppose that the thymocytes would enter the lymph circulation directly, whereas according to others (*e. g.* LEHNER, 8) they would be transformed into mast cells and would enter in that state the adjacent connective tissue, wherein their number would increase, for example in conditions associated with excitement [1]. At any rate, this problem is just as unsolved as is that of the thymus as a whole.

In the present experiments we have investigated all three problems. We think namely that the three problems are greatly interdependent and a solution may be found by such experiments, in which the three problems are studied on grounds of a uniform conception and by uniform methods. Just for this reason we have studied the thymus in conditions associated with tissue proliferation, because in such conditions the organs and their cells show themselves differently from what is seen in normal immunity.

First of all, we wished to determine the fate of the PAS-positive mucopolysaccharide we had found in earlier experiments. Furthermore, we followed up the fate of thymocytes in various conditions associated with cell proliferation, normal or pathological.

We have made observation on the thymus and other lymphatic organs of tumorous or tuberculous or pregnant rats and mice, as well as on those from rats in different stages of ontogenesis.

Methods

Ninety albino rats and 60 albino mice were used in the experiments. — Mice were inoculated with 0.3 ml of Ehrlich ascites tumour about 10 mm below and left from the umbilicus intraperitoneally. The tumour developed rapidly and the animals survived inoculation by 15 days on the average as determined in a special control group. Subcutaneous inoculations of the Ehrlich tumour were made in the back of mice, using 0.3 ml of ascites fluid. The tumour began grow at about 12 days and the average survival time was 46 days.

Rats were inoculated with Guérin tumour. These animals survived 42 days on the average. The tumour was inoculated subcutaneously, in the form of a suspension.

Other groups of rats were inoculated with 2 mg of Mycobacterium tbc. Ravenel (bovine type) grown in Sula's medium, suspended in physiologic NaCl solution. The inoculations were made intravenously, as described by FÖLDES [4]. The animals were killed 10 or 25 days later. By the end of that period many animals had already succumbed.

The thymus, usually the regional lymph node, as well as the spleen of 2 animals from each group were studied histologically, in all the above, as well as in the control groups. The specimens were fixed in Carnoy's fluid and embedded in paraffine. Histologic sections were stained with Giemsa, PAS, toluidine blue and cresyl-violet, respectively. Representative preparations from each group were stained with methylgreen-pyronine as well.

Experimental

A) *Studies on the thymus from rats in different stages of ontogenesis*

Fifteen to 19 days old rat foetuses, 10, 20, 50 and 150 g rats, as well as old rats weighing 250 g were studied in this group.

In the thymus from the *15 days old rat foetus* very few PAS-positive cells were visible. The PAS-positive substance tended to occur between the

epithelial elements, as a product of cell secretion. Corpuscles of Hassal were not visible. Epithelial elements preponderated over lymphocytes and were to be found among them, in the form of big islets. Mast cells were not found.

In the *18 to 19 days old rat foetus* an equilibrium existed between the epithelial and thymocyte matter. PAS-positive substance was present as in the former stage, it seldom occurred intracellularly. Regular mast cells were found in the thymus. Between the epithelial elements, mainly in the peripheral lobules, thymocyte-like cells appeared, with more or less perinuclear granulation showing azur or toluidine metachromasia in the cytoplasm.

In the *10 g rat*, big, degeneration-free corpuscles of Hassal were seen. In the thymus cavities filled with mesenchyma appeared at sites ; the mast cells were in these, as well as in the capsule. The corpuscles of Hassal contained PAS-positive substance. In some cases mast cells, even in the thymus itself, were found at many sites. In the peripheral lobe of the thymus epithelial-gland-like tissue was seen, the picture being similar to that found in the thymus of the 18 to 19 days old foetus ; between the epithelial cells thymocyte-like cells appeared, with perinuclear granulation showing azur and toluidine metachromasia in the cytoplasm *(Fig. 1)*.

In the *20 g rat* some slight PAS-positivity and a few mast cells were found. There were much less epithelial islets than in the 10 g animal.

In the *50 g rat* there was a pure lymphatic thymus with very few epithelial elements, very little PAS-positive substance and a slight increase in the mast cell count.

In the *150 g rat* the PAS-positive substance was increased. The epithelial elements were more marked than in the 50 g rat. As to the mast cells, there was not much difference from the 50 g rat. The number of corpuscles of Hassal was small, though higher than in the 50 g rats.

In *old rats weighing 250 g* the number of both the thymocytes and the epithelial elements decreased markedly. Big corpuscles of Hassal, filled with PAS-positive substance were visible. The mast cell count was low ; the mast cells were hypergranulated, and disintegrated at many sites. Some of them showed marked vacuolisation.

B) *Studies on the thymus and lymphatic organs from tumorous animals*

1. Rats inoculated with Guérin tumour. Until the tumour "took", changes in the thymus were slight. At the time of "taking" the PAS-positive substance increased in the corpuscles of Hassal and numerous PAS-positive thymocytes appeared. These had an extremely swollen cytoplasm, as a result of the accumulation of the PAS-positive substance in them. With the advance in the growth of the tumour, large numbers of mast cells appeared in the capsule, connective tissue trabecules and the cortical layer of the thymus *(Fig. 2,*

Fig. 3). The process was found to be parallel with the decrease in the number of thymocytes. In older rats, in which the tumour did not take there also appeared PAS-positive cells *(Fig. 4)*. In general, the more advanced the tumorous invasion, the greater the increase in the number of PAS-positive cells in the thymus. In the lymph nodes and spleen, there were only a very few mast cells and occasional PAS-positive cells. In the final stage of the tumour the lymph nodes (especially the regional ones) were filled with metastases, but even then the number of PAS-positive cells was quite small.

2. *Mice inoculated intraperitoneally with Ehrlich ascites tumour.* Three days after intraperitoneal inoculation, large numbers of PAS-positive thymocytes appeared in the thymus. In these cells the nuclei were sometimes in the centre, sometimes excentric. The cells were situated in the cortex, but first of all in the periphery of the lobules. Numerous PAS-positive cells occurred around the corpuscles of Hassal as well. The corpuscles contained a great amount of PAS-positive substance, were cavernous at many sites, forming glandular lumenlike structures filled with much PAS-positive substance *(Fig. 5)*. All these PAS-positive areas showed neither azur granulation, nor metachromasia on staining with toluidine. In some cells, however, mainly in those of the medulla, metachromatic granules were visible. In the capsule of the thymus the number of mast cells was greatly increased. No characteristic changes were detected in the lymph nodes and spleen. At that phase gross examination revealed neither ascites, nor any other change in the animals.

Seven days after intraperitoneal inoculation the picture was still about the same, except that the increase of PAS-positive substance in the cyst-like structures was even more marked and the number of PAS-positive thymocytes had increased. The peripheral lobes of the thymus had begun to become empty. No characteristic changes were visible in the lymph nodes and spleen. The tumour was palpable in the abdomen, the amount of ascites fluid had increased and a small solid tumour appeared at the site of the injection.

Eleven days after intraperitoneal inoculation the thymus could hardly be recognized. When stained with PAS, the whole organ was flame-red, all the cells visible being practically PAS-positive *(Fig. 6)*. Enormously distended cysts filled with PAS-positive substance were seen. The structure of the whole thymus was markedly loosened. Regular mast cells were visible in both the cortex and the medulla, but first of all between the PAS-positive thymocytes. In the peripheral lobes there was no thymus tissue, but the number of mast cells was increased *(Fig. 7)*. In the sinuses of lymph nodes tumour cells were found. The cellular pattern of the spleen was poor. The ascites caused a marked distension of the abdomen, the mesentery was infiltrated by masses of small tumours. The solid tumour was the size of a pea.

Fifteen days after intraperitoneal inoculation in about 50 per cent of the animals no thymus was found, the organ had been completely emptied [5].

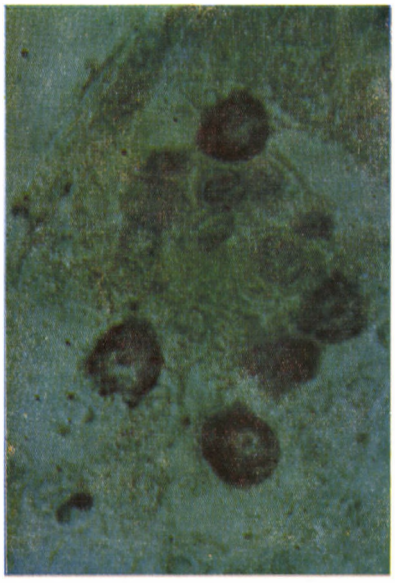


Fig. 1. Thymus from a rat weighing 10 g. Big thymocytes, with perinuclear metachromatic granules in the cytoplasm. Toluidine blue. × 500

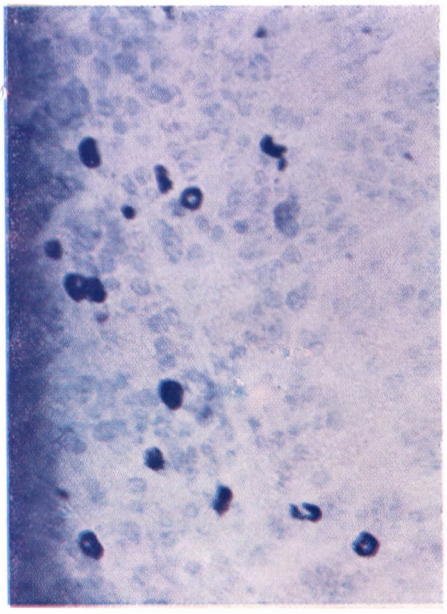


Fig. 2. Thymus from a rat with Guérin tumour. Metachromatic substance accumulating in thymocytes. Toluidine blue. × 100

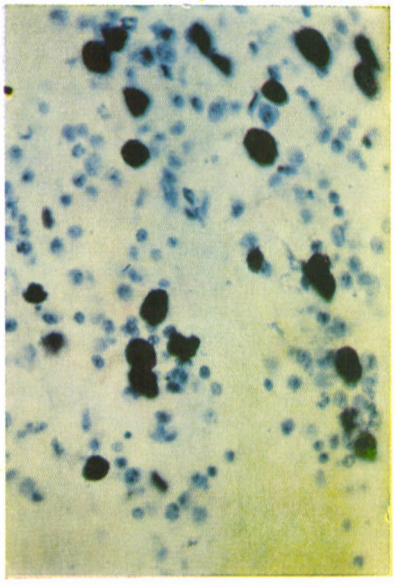


Fig. 3. Thymus from a rat with Guérin tumour, 25 days after subcutaneous inoculation. Numerous mast cells in the parenchyma of the thymus. Giemsa. × 200

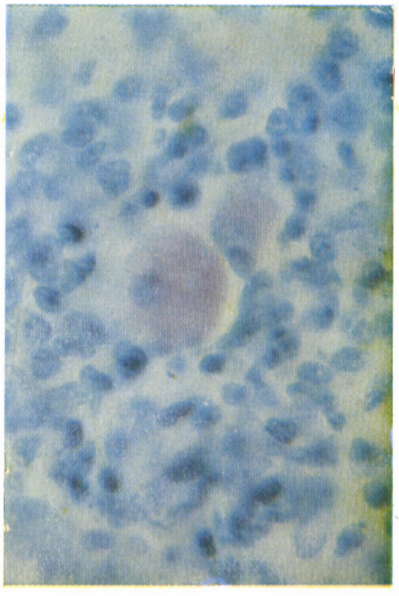


Fig. 4. Thymus from an old rat weighing 250 g, 42 days after the subcutaneous inoculation of Guérin tumour. The tumour did not take. Big PAS-positive cells visible. PAS ; oil immersion

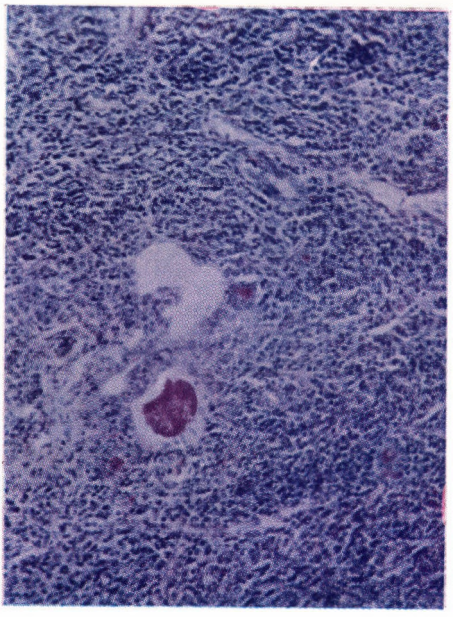


Fig. 5. Mouse thymus, 3 days after the intraperitoneal inoculation of Ehrlich ascites tumour. A cavity lined with epithelium, showing cyst-like distension, is filled with PAS-positive substance. PAS. × 100

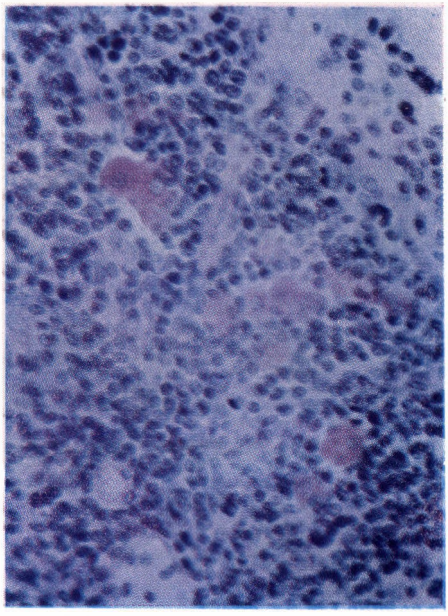


Fig. 6. Mouse thymus, 11 days after the intraperitoneal inoculation with Ehrlich ascites tumour. Many PAS-positive cells. PAS. × 100

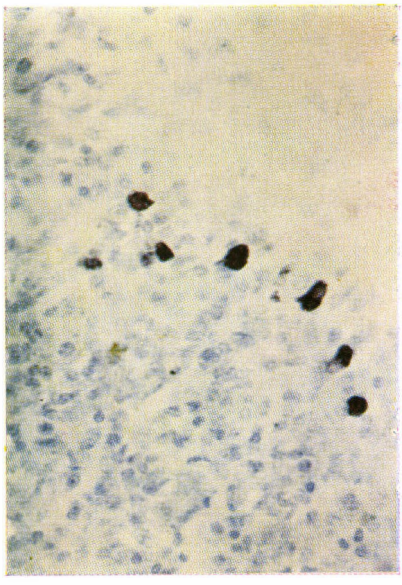


Fig. 7. Mouse thymus, 11 days after the intraperitoneal inoculation with Ehrlich ascites tumour. Mast cells. Cresyl violet. × 100

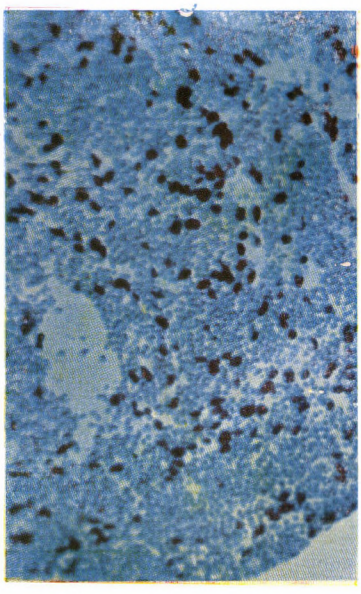


Fig. 8. Thymus from rat, 18 to 19th day of pregnancy. Mast cells Giemsa. × 100

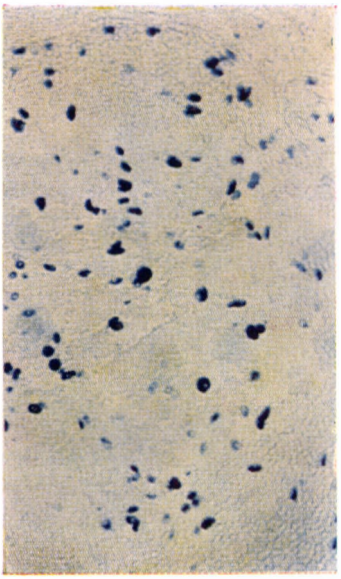


Fig. 9. Thymus from pregnant (18—19 days) rat. The thymocytes contain more or less of the metachromatic substance. Mast-cell-like cells. Toluidine blue. × 100

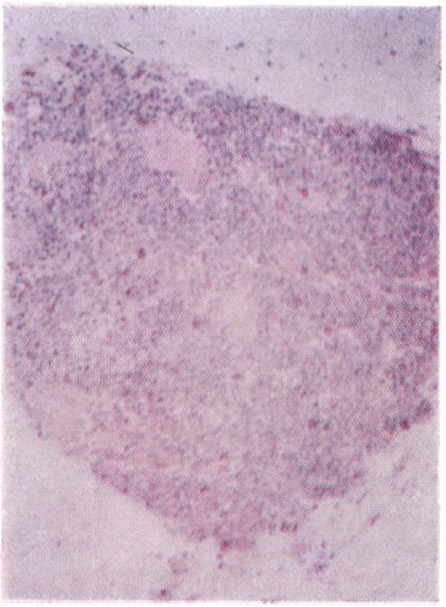


Fig. 10. The same as in *Fig. 9.* Many PAS-positive thymocytes. PAS. × 100

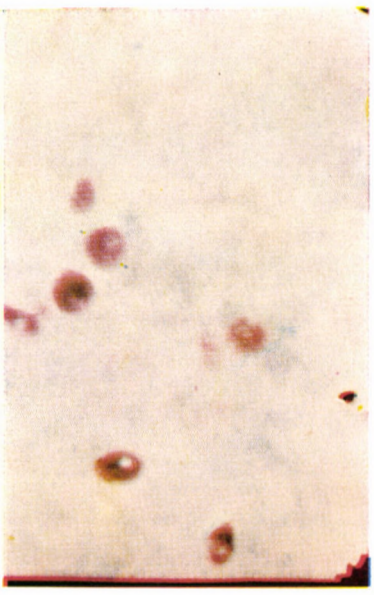


Fig. 11. Thymus from pregnant (18—19 days) rat. Metachromatic granules in the cells. Mast cells. Toluidine blue. × 300

Fig. 12. Same as in *Fig. 11* from another area. Metachromatic granules and some fully developed mast cells are visible. Toluidine blue. × 300

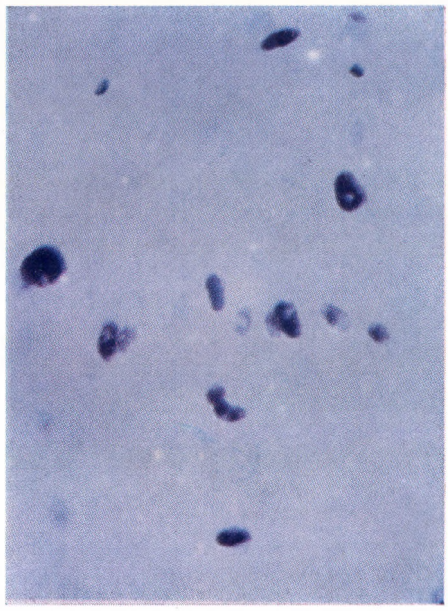


Fig. 13. Same as in *Fig. 12* Enlarged thymocytes filled with metachromatic granules and regular mast cells are visible. Toluidine blue. × 150

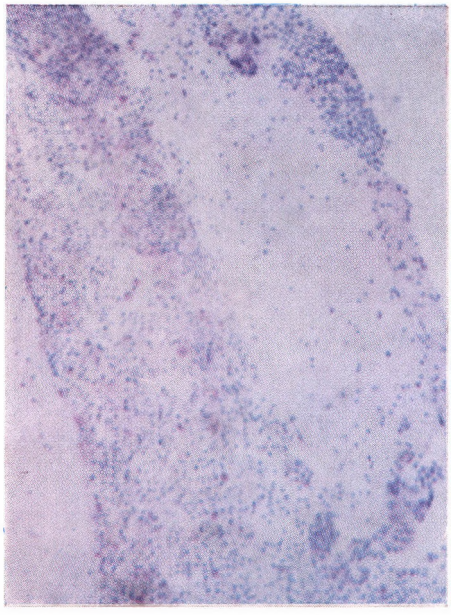


Fig. 14. The same as in *Fig. 13* stained with PAS. The thymocytes are filled with PAS-positive substance. PAS. × 100

Even where it could be found, only a few lobes displayed an extremely loosened thymus tissue. The number of PAS-positive cells decreased, but the cysts filled with PAS-positive substance were still present. Metastases were found in the lymph nodes and in some cases also in the spleen. Most of the animals were dying.

3. *Mice inoculated subcutaneously with Ehrlich ascites tumour.* The picture was comparable to that seen in the rats inoculated subcutaneously with Guérin tumour. PAS-positive corpuscles of Hassal and PAS-positive cells occurred. In the capsule and connective tissue of the thymus, and later also in its parenchyma, an increased number of mast cells appeared.

C) *Rats intravenously infected with tuberculosis*

Ten days after inoculation with Mycobacterium the thymus was reaction-free. At that time tubercles began to appear in the lungs, together with a strong plasma cell reaction. No mast cells were found around the tubercles, and their number in the thymus was as usual. PAS-positive cells were not found and the corpuscles of Hassal contained normal amounts of PAS-positive substance.

Twenty-five days after infection, when the animals were near to death, a few PAS-positive cells were visible in the thymus and at sites the corpuscles of Hassal were filled with PAS-positive substance. In the connective tissue of the thymus the number of mast cells was significantly increased and such cells occurred at many sites in the thymus, mainly in the cortex. The thymus had not emptied. In the lung, tubercles had developed, a regular lymphocytic-plasmocytic barrier was also visible. Langhans-type giant cells appeared in great numbers, but mast cells were not visible anywhere.

D) *Pregnant rats*

Almost without exception, the thymus glands from pregnant rats contained a great amount of PAS-positive thymocytes. The peripheral lobes of the thymus were emptying and in such lobes the PAS-positive substance in the cytoplasm of the thymocytes was especially well observable, owing to the reduced number of cells present. In the same lobules (on staining the consecutive sections with different stains) these PAS-positive cells showed also azur and toluidine metachromasia *(Fig. 8—Fig. 14)*. This is clearly visible in the figures. The toluidine-stained preparation shows that most of these cells are well-defined mast cells. Considerably increased numbers of mast cells were visible in the parenchyma and the connective tissue of the thymus, first of all in the zone of PAS-positive thymocytes. Likewise, corpuscles of Hassal filled with PAS-positive substance appeared. No change whatsoever was detectable in the lymph nodes and spleen.

Discussion

Analysing this variable material, which has been selected according to a given point of view, it is clear that in the conditions examined the thymus showed an almost identical behaviour, at the same time when the lymphatic tissue and the spleen displayed quite slight reactions, which were different from that shown by the thymus. The thymus of mice inoculated intraperitoneally with the Ehrlich ascites tumour exhibited the most characteristic pattern. This was obviously due to the fact that this was the only kind of lesion that developed rapidly and killed the animals within about 2 weeks. However, the phenomena encountered after inoculation with the Ehrlich tumour occurred also in the other conditions, though in the latter they developed less rapidly. In their course, depending on the quality of the process, one or another of the changes found in the animals with ascites was in the foreground, but all of the variants could be detected.

What are these phenomena composed of? As it has been seen, a PAS-positive substance appears in the corpuscles of Hassal, these corpuscles increase in number and size, and in some cases are converted to cyst or gland-like structures [3]. The patterns bear a close resemblance to what we may call a glandular transformation of the thymus. At the same time, PAS-positive substance is accumulating in the thymocytes, which tend to occur mainly at the periphery of the lobes of the thymus. Meanwhile, the number of mast cells increase in the connective tissue of the thymus. The uniformity of these changes in every one of the benign or malignant conditions associated with tissue proliferation indicates that what we are dealing with is a tissue reaction of the thymus, which is uniform and characteristic of that organ. Considering, further, that in immunization processes the thymus remains practically inactive while the spleen and lymph nodes are highly active, whereas in the present experiments a hyperfunction of the thymus was associated with a relative inactivaty of the lymph nodes and spleen, the role of the thymus prevails especially in processes associated with some dysharmony of tissues. This appears to be the first and probably most important conclusion to be drawn from our experiments.

In all the above experiments, all of them conditions associated with tissue proliferation, the lymph cells in the thymus accumulated a PAS-positive substance, whereas those in the spleen and lymph nodes did not. This difference between the two kinds of cells is due not to a difference in the environment, but to the fact proved by us earlier, that the thymocytes differ in nature from the lymphocytes. This has been confirmed also by the observation that with the development of a malignant tumour the blood level of PAS-positive substances is increased [6, 11, 19], and yet the lymphocytes in the spleen and lymph nodes do not take up those substances.

Thus, the second important conclusion is that thymocytes are capable of taking up PAS-positive substances and differ in this respect from the lymphocytes in the lymph nodes and spleen.

Furthermore, the experiments have confirmed our earlier statements as regards the corpuscles of Hassal, notably that these corpuscles are active, functioning structures, which increase in number when the thymus is exposed to specific strain, and which produce PAS-positive substances. The gland-like structure of the corpuscles of Hassal is likewise indicative of active function. On the basis of our earlier investigations, the corpuscles of Hassal were considered to be the gland-representants of the thymus, in which the secretion is released with the development of the corpuscles. Still, unlike with the endocrine glands, the secretion is not given over directly into the blood serum, but is taken up by adjacent thymocytes. This is suggested by our observation that large numbers of thymocytes filled with PAS-positive substance were found around the PAS-positive corpuscles of Hassal. As regards the secretive mechanism, in this question we agree with BOMSKOW [2]. On the other hand, we shall discuss later how we think transport takes place and what conclusions our experiments permit in this respect. At any rate, it seems clear that the corpuscles of Hassal develop first of all in connexion with active thymus function and turn into gland-like structures producing a specific product.

A further problem of importance is that of the evacuation of the thymus. We have found that it is invariably the peripheral lobes of the thymus that become empty, and the central ones follow suit. This, however, fails to explain the mechanism of emptying, all that it implies is that the thymus is capable of segmental function. A close relationship must exist between the emptying of the thymus and the appearance of mast cells. When namely the number of PAS-positive cells is increasing in the peripheral parts of the lobes of the thymus, mast cells appear in large numbers in the connective tissue of the organ. Later, when PAS-positivity increases, many mast cells appear in the parenchyma of the thymus as well. An even more convincing proof, however, is the fact that in the thymus of pregnant rats the same cells could be seen in the PAS-positive and in the toluidine-metachromatic state, indicating that the two kinds of cell are in fact transformation products. These two forms of mast cells (PAS-positive and the one showing toluidine metachromasia) had been known before, but our experiments have proved with a high degree of certainty that mast cells are formed first of all from thymocytes. The process takes place not only in pathological conditions, but also in normal ones, *e. g.* in pregnancy. Studies on normal animals often revealed metachromatic granules in the thymus of young rats of 10 g, as a new corroboration of our view. We are fully aware of the need for further evidence, especially such as may be obtained in tissue culture studies ; such investigations are in progress.

We do not claim that mast cells would appear in the thymus in every case of tissue destruction and proliferation, or that their development would always meet peripheral requirements. While the mast cells form a barrier around malignant growths, they do not appear around tubercles. This, however, does not yet alter the fact that the release of mast cells plays an important role in the reactivity of the thymus.

When discussing the problem of thymocytes and mast cells, we must consider the nature of the PAS-positive substance as well. In contrast to the data reported by SMITH and THOMAS [12], that material is not glycogen, not being digested by diastase. According to our earlier investigations, it is a mucopolysaccharide, which in this state may be neutral, but later it becomes more acid and sulphated, thus obtaining its metachromasia. The process takes place intracellularly in the parenchyma and in the connective tissue of the thymus. Further studies are required to reveal the details of this process.

It is possible that this PAS-positive substance is the hormone, or a component of the hormone, of the thymus and that the thymus is a special endocrine gland, whose secretion is carried away by cell transport. Further studies will have to decide this problem. It is noteworthy that in tuberculous rats the reaction of the thymus was late, observable only when the second specimen was taken, *i. e.* at a time when tissue destructions predominate, not the processes of immunization. The same occurs in pregnancy, in which state one cannot speak about the presence of foreign material or about a pathological condition, yet the hyperactivity of the thymus is elicited by tissue destruction.

In earlier investigations we had shown that the thymus would respond to various effects by the same reaction, the one manifesting itself with the evacuation of thymocytes, the appearance of Hassal's corpuscles and the secretion of a neutral mucopolysaccharide. The present results add to this that in conditions associated with tissue destruction, *i. e.* when the harmony of the tissues is disturbed, not only the PAS-positive mucopolysaccharides appear and the number of the corpuscles of Hassal increases, but an increase occurs also in the number of PAS-positive thymocytes and mast cells, as a representation of an active function of the thymus.

Summary

The tissue reaction of the thymus has been studied in animal experiments, in conditions associated with tissue proliferation. It has been found that malignant tumours, advanced proliferative tuberculosis and pregnancy all elicited a hyperfunction of the thymus, manifesting itself with an increase in the number of Hassal's corpuscles, the appearance of large quantities of a PAS-positive material in them, the appearance of PAS-positive thymocytes, as well as with a marked mast cell reaction. It is suggested that all these features are in correlation with one another, that the corpuscles of Hassal have an active, gland-like function

and that the thymocytes are apparently transformed into mast cells. As a difference between thymocytes and lymphocytes, it is pointed out that in the above-mentioned conditions the thymocytes contain PAS-positive substance, whereas the lymphocytes of the lymph nodes and spleen do not. The opinion is expressed that the function of the thymus becomes manifest first of all in the state of tissue dysharmony, in contrast to other lymphatic organs, which take part in the defense against injury caused by foreign substances.

REFERENCES

1. Arvy, L. : (1955) Effect of injection of oestrogen on the mast cells of white mouse. Nature *175*, 506. — 2. Bomskow, Ch., Brachat, F. : (1940) Bildung nnd Transport des Thymushormons in Organismus. Die Lymphozyte als Träger des Thymushormons. Endokrinologie. *23*, 145—161. — 3. Diderholm, H., Hellmann, B. : (1958) Nature and metabolism of a thymus cyst studied by histochemistry and autoradiography. Z. Zellforsch. *48*, 450—454. — 4. Földes, I., Komlós, E. : (1957) Kísérletes gümőkór hatása patkányok felsőbb idegműködésére. Tuberkulózis, *7*, 185. — 5. Falk, F. : (1954) Reaktion von Milz und Thymus beim Ascitescarcinom der weissen Maus. Z. ges. exp. Med. *124*, 224—233. — 6. Greenstein, J. P. : (1954) Biochemistry of cancer. Academic, Press, New York. — 7. Harris, S., Harris, T. N.: (1955) Studies on the transfer of lymph node cells. V. Transfer of cells incubated in vitro with suspensions of Shigella paradysenteriae. J. Immunol. *74*, 318—328. — 8. Lehner, K. : cit. in Möllendorff : Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. Springer. Berlin, *2*, 1. 1927. — 9. Raditz, M., Törő, I. : (1954) Behaviour of thymus transplanted to chorioallantoic membrane. Acta Biol. Hung. *5*, 88—96. — 10. Shelin, U., Hesseljö, R., Paulsen, F., Mellgren, J. : (1954) Plasma cell production promoted by pituitary somatotrophic hormone in the adaptation syndrome. Acta path. microbiol. scand. *35*, 503—511. — 11. Shetlar, M. R., Foster, J. V., Kelly, K. H., Shetlar, C. L., Bryan, R. S., Everett, M. R. : (1949). The serum polysaccharide level in malignancy and in other pathological conditions. Cancer Res. *9*, 515—519. — 12. Smith, Ch., Thomas, F. C. : (1950) Studies on the thymus of the mammal III. Glycogen in the cortical cells of thymus. Anat. Rec. *106*, 17—27. — 13. Tesseraux, H. : (1953) Physiologie et pathologie du thymus. J. A. Barth, Leipzig. — 14. Törő, I.: (1955) A csecsemőmirigy histophysiologiája. Debreceni Orvosegyetem Évkönyve 1—5. — 15. Törő, I. : (1957) Histologische Beiträge zur Funktion des Thymus. Verhandlungen der 54. Versammlung der Anatomischen Gesellschaft, in Freiburg/Br. von 22 bis 25 Sept. — 16. Törő, I. : (1958) A csecsemőmirigy szöveti szerkezete. M. T. A. Biol. Csop. Közleményei *2*, 48—64. — 17. Törő, I., Aros, B. : (1958) Die Gewebsreaktion des Thymus auf verschiedene Einwirkungen. Acta Morph. Hung. *8*, 152—171. — 18. Vadász, J. : (1954) Beiträge zur Entstehung der Thymozyten. Acta Morph. Hung. *4*, 279—292. — 19. Winzler, R. J., Smyth, I. M. : (1948) Studies on the mucoproteins of human plasma II. Plasma mucoprotein levels in cancer patients. J. Clin. Invest. *27*, 617—619.

ПОВЕДЕНИЕ ЗОБНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В СОСТОЯНИЯХ, СОПРОВОЖДЕННЫХ РАЗРАСТАНИЕМ ТКАНИ

ДЬ. ЧАБА, И. ТЁРЁ, Т. АЧ и Ф. КИШШ †

Авторы исследовали в опытах на животных тканевую реакцию зобной железы при различных состояниях, сопровождаемых разрастанием ткани. Они установили, что прогрессирующая, пролиферативная стадия опухолей и туберкулеза, как и беременность вызывают гиперфункцию зобной железы, проявляющуюся в размножении гассалевских телец, появлением в них большого количества перйодная-кислата-шиф (PAS) положительного вещества и перйодная-кислата-шиф (PAS) положительных тимоцитов, как и сильной тучноклеточной реакции. Все перечисленные явления авторы приводят в взаимную связь и приходят к тому заключению, что гассалевские тельца обладают активной, железе подобной функцией, причем тимоциты предположительно преобразовываются в тучные клетки. Они устанавливают, что разница между тимоцитами и лимфоцитами заключается в том, что в вышеприведенных состояниях тимоциты содержат перйодная-кислата-шиф (PAS) положительное вещество, а в лимфоцитах лимфатических узлов и селезенки такого вещества не имеется. По мнению авторов, функция зобной железы проявляется, прежде всего, при состояниях тканевой дисгармонии, в противоположность другим лимфатическим органам, участвующим в предотвращении повреждений, причиненных чужеродными веществами.

DAS VERHALTEN DES THYMUS BEI MIT GEWEBSWUCHERUNG EINHERGEHENDEN ZUSTÄNDEN

GY. CSABA, I. TÖRŐ, T. ÁCS und F. I. KISS †

Es wurde in Tierversuchen die Gewebsreaktion der Thymusdrüse bei verschiedenen mit Gewebswucherungen einhergehenden Zuständen untersucht und festgestellt, dass das progressive, proliferative Stadium von Geschwülsten und Tuberkulose, sowie Schwangerschaft eine Hyperfunktion des Thymus auslösen, die sich in der Vermehrung der Hassalschen Körperchen, im Erscheinen grosser Mengen von PAS-positiver Substanz und PAS-positiven Thymozyten in letzteren, sowie in einer starken mastzelligen Reaktion manifestiert. Diese Erscheinungen werden miteinander in Verbindung gebracht und die Schlussfolgerung gezogen, dass die Hassalschen Körperchen über eine aktive, drüsenartige Funktion verfügen und dass sich die Thymozyten vermutlich in Mastzellen umwandeln. Als Unterschied zwischen den Thymozyten und Lymphozyten wird festgestellt, dass die Thymozyten in Verbindung mit den obenangeführten Zuständen eine PAS-positive Substanz enthalten, während die Lymphozyten der Lymphdrüsen und der Milz keinen solchen Stoff aufweisen. Verfasser sind der Meinung, dass die Funktion des Thymus sich in erster Reihe in den Zuständen der Gewebsdysharmonie manifestiert, im Gegensatz zu den übrigen Lymphorganen, die an der Abwehr der durch Fremdkörper verursachten Schädigungen teilnehmen.

Dr. György Csaba,
Prof. Imre Törő,
Tamás Ács
Budapest, IX. Tűzoltó u. 58., Hungary.

Department of Histology and Embryology, Medical University, Budapest
(Director, Prof. I. Törő)

PROVOKED TISSUE REACTION OF THE THYMUS IN TISSUE CULTURE

Gy. Csaba, I. Törő and Eszter Kapa

(Received April 23, 1959)

We have reported previously [1, 4—8.] that in conditions associated with tissue proliferation a characteristic, uniform tissue reaction takes place in the thymus. This reaction manifests itself with an increase in the number of Hassal's corpuscles, the appearance and accumulation in them of a PAS-positive substance, with an increase in the number of thymocytes, as well as with an intensive mast cell reaction. It has been found, for example, that in the thymus of the pregnant animal the PAS-positive thymocytes turned into mast cells showing toluidine metachromasia. Although we have already stated that all these observations point to the role of thymocytes in mast cell formation and that the emptying of the thymus is partly due to the conversion of thymocytes into mast cells, we still thought it necessary to verify our findings in tissue culture studies. For this reason in the experiments to be described below, we provoked the tissue reaction of the thymus by adding a PAS-positive, heparin-type substance to the tissue culture.

Methods

The observations were performed on 600 tissue cultures.

Tissues were explanted in Maximov cultures, in a hen plasma medium coagulated with chick embryo juice. The washing fluid was composed of one part of embryo juice, three parts of horse serum, six parts of Tyrode's solution and 150 U/ml penicillin. The cultures were washed at 3 day intervals.

Cultures showing the same rate of growth were selected for study. To the cultures we added 3 days after explantation heparin, treated in the following way. Heparin (Heparin pulvis Richter, 1 mg = 80 I. U.) dissolved in physiological saline (1 mg/ml) was ampouled, boiled for 1 hour, then placed into a water bath of 56° C for 48 hours. Thereby the heparin — used by us — lost its toluidine metachromasia and became PAS-positive. The Tyrode's solution in the cultures was replaced by the solution thus prepared. The control cultures were washed with the same fluid, except that these washing fluids contained no heparin.

The cultures were fixed in Carnoy 5, 24, 48 and 72 hours later. Serial sections were made from the 72-hour heparinized cultures, as well as from the control ones. The sections and the cultures were stained with Giemsa's stain and with toluidine blue.

Experimental

Cultures made of the thymus, lymph nodes, spleen and kidney of rat embryos (intrauterine, 15 to 19 days old), newborn and 1 month old rats were studied.

The behaviour of the heparinized thymus, lymph node and spleen cultures is shown in Tables I, II and III. (The heparin used was treated as specified above.) The crosses (+, ++ and +++) indicate the metachromatic cell count. Both the toluidine and the azur metachromasia appeared perinuclearly in the cells. No spontaneous metachromasia was noted in the control cultures. Although no planimetric measurements were made, it was observed that the heparinized thymus cultures grew more intensively than the control ones, whereas heparin had no effect on the growth of the spleen and lymph nodes.

In the embryonic thymus cultures endothelial tubes with numerous cells showing toluidine metachromasia around them, appeared 72 hours after heparinization. Similar endothelial tubes and cells were found in the control cultures, too, but these showed no evidence of metachromasia.

In order to prove that not every kind of epithelium was capable of producing from PAS-positive substance a substance showing toluidine metachromasia, we cultured renal epithelium and treated it with heparin (see above). The epithelium itself remained negative, but a few migrating cells of the mast cell type were found that showed toluidine metachromasia. The number of these cells showed no further increase.

In other experiments we used, instead of the heparin treated as specified, a solution containing 1 mg of glucuronic acid and 1 mg of glycosamine. No

Table I

*Behaviour of thymus cultures treated with heparin**

	In culture					In culture sections, metachromatic cells
	azur +		toluidine metachromasia		mast cells	
	epithelium	thymocyte	epithelium	thymocyte		
embryo 5h	+	—	—	—	—	
24	++	++	++	++	+	
48	++	++	++	+++	++	
72	++	+++	++	+++	++	+++
newborn 5h	—	—	—	—	—	
24	+	—	+	—	+	
48	++	+++	++	+++	++	
72	++	+++	++	+++	+++	+++
1 month 5h	—	—	—	—	—	
24	+	—	+	—	+	
48	+	+	+	+	+	
72	+	+	+	+	+	+

* (Heparin had been treated as specified in the text)

Table II

Behaviour of heparinized lymph node cultures*

	In culture					In sections, metachromatic cells
	azur +		toluidine metachromasia		mast cells	
	epithelium	thymocyte	epithelium	thymocyte		
5h	—	—	—	—	—	
embryo 24	—	—	—	—	—	
48	—	±	—	±	—	
72	—	±	—	±	—	—
5h	—	—	—	—	—	
newborn 24	—	—	—	—	—	
48	—	±	—	±	—	
72	—	±	—	±	—	—
5h	—	—	—	—	—	
1 month 24	—	+	—	—	—	
48	—	++	—	—	—	
72	—	++	—	—	—	—

* (Heparin treated as specified in text)

Table III

Behaviour of heparinized spleen cultures*

	In culture					In sections, metachromatic cells
	azur +		toluidine metachromasia		mast cells	
	fibroblast	thymocyte	epithelium	thymocyte		
5h	—	—	—	—	—	
embryo 24	—	—	—	—	—	
48	—	±	—	—	—	
72	—	+	—	—	—	—
5h	—	—	—	—	—	
newborn 24	—	±	—	—	—	
48	—	±	—	—	—	
72	—	±	—	—	—	—
5h	—	—	—	—	—	
1 month 24	—	+	—	—	—	
48	—	+	—	—	—	
72	—	+	—	—	—	—

* (Heparin treated as specified in text)

metachromasia of any kind was observable in the thymus, or other cultures during the period of cultivation.

Discussion

Before discussing our results, let us briefly consider the role of heparin. We have pointed out when describing the methods that the heparin used had been pre-treated, decomposed. This was necessary for two reasons. One, as it is known mainly from the evidence published by HEILBRUNN, heparin inhibits mitosis, and as such damages tissue cultures, retarding their growth. Two (and this was the more decisive point), we wished to reproduce the experiments made in live animals, thus, we wanted to determine whether toluidine-metachromatic heparinocytes would be actually formed from PAS-positive thymocytes. Thus, heparin had to be broken down. It was found that as it being broken down and possibly when it is synthesized heparin passes into three forms, as examined by the three stains mentioned. The intact, active heparin stains metachromatically with toluidine blue and gives azur-positivity when stained with Giemsa's stain, and is PAS-negative. When slightly broken down, it loses the toluidine metachromasia, but still reacts positively on staining with azur, while in the markedly decomposed state it shows only PAS-positivity *(Fig. 14)*. These observations have made it possible properly to interpret the results of the above experiments, because it is obvious that if toluidine metachromasia develops in a tissue or cell treated with heparin, that reacts positively only to PAS, this will mean a synthesis of heparin, or of a heparin-type substance, from its metabolites.

The experiments have proved beyond doubt that in the thymus a substance showing toluidine metachromasia is formed from a PAS-positive substance. This takes place in the epithelial cells just as well as in the thymocytes. The process begins in the epithelial cells, but later it takes place also in the thymocytes. We have found such a process neither in the lymph nodes, nor in the reticulum cells of the spleen, nor in the renal epithelium, nor anywhere else, so that we may state that the phenomenon is characteristic of the epithelial reticulum of the thymus and of the thymocytes.

Our investigations showed further that regular cells, morphologically identical with mast cells, develop from the thymocytes and from the epithelial cells of the thymus reticulum. Thus, a difference can be noted between the thymocytes and lymphocytes, at least in the sense that in the thymus mast cells develop from the thymocytes, whereas this does not happen in the lymph nodes and spleen.

The fact that regular mast cells develop in thymus cultures makes it clear that the thymus must have a role in the genesis of mast cells. Thus,

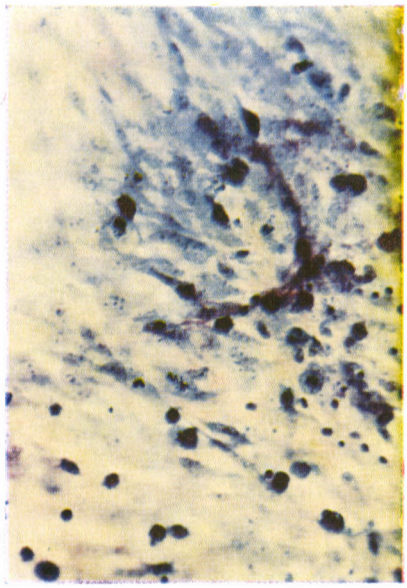


Fig. 1. Embryonic thymus culture 5 hours after heparin treatment. Appearance of azurpositive substance in epithelial plate. Giemsa. × 100

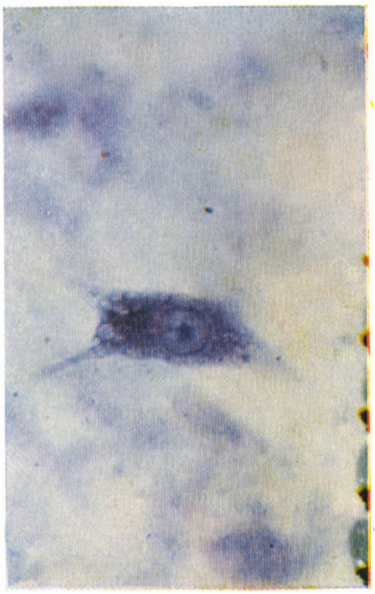


Fig. 2. Thymus from a rat aged 13 to 15 days. Appearance of culture 24 hours after heparin treatment. Mast cell in the culture. Giemsa. × 200

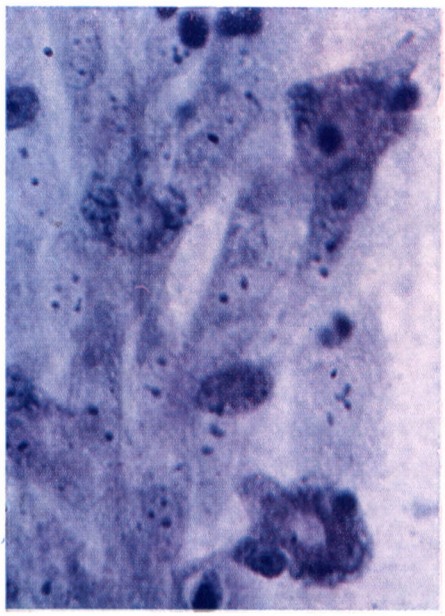


Fig. 3. Culture of thymus from a 15-day old rat embryo 48 hours after heparin treatment. Perinuclear accumulation of metachromatic substance in epithelial cells. Giemsa. × 100

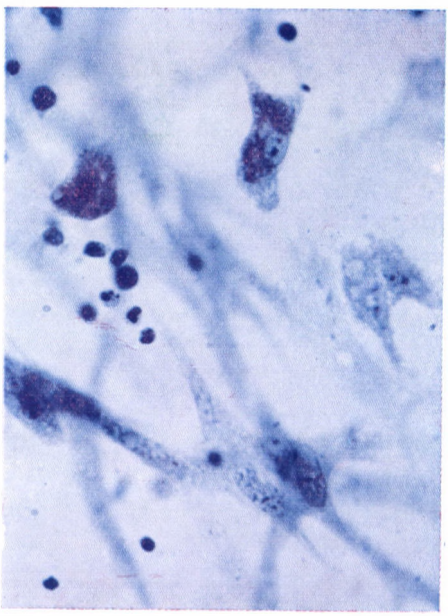


Fig. 4. The same as shown in *Fig. 3.* Metachromatic mast cells, with nuclei characteristic of thymocytes in one of them. Giemsa. × 100

Fig. 5. 15-day old embryonic control culture 5 days after explantation. Metachromasia is not visible anywhere. Growth is less marked and less epithelium-like than in the heparinized cultures. Giemsa. × 100

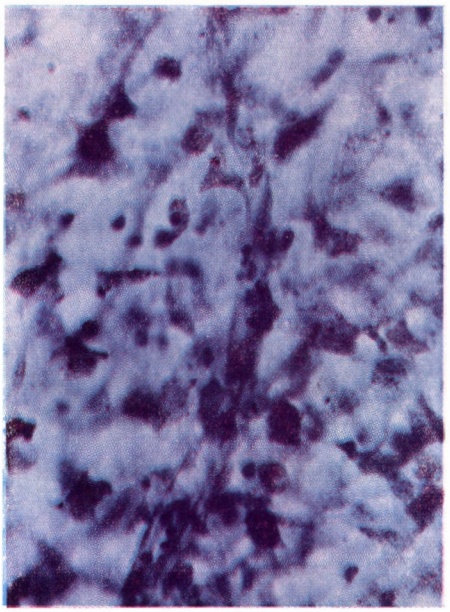


Fig. 6. Appearance of embryonic thymus culture, 72 hours after heparinization. Development of endothelial tube, with many metachromatic cells around it. Giemsa. × 100

Fig. 7. 6-day old control thymus culture. Even around the endothelial tube there are no metachromatic cells. Giemsa. × 100

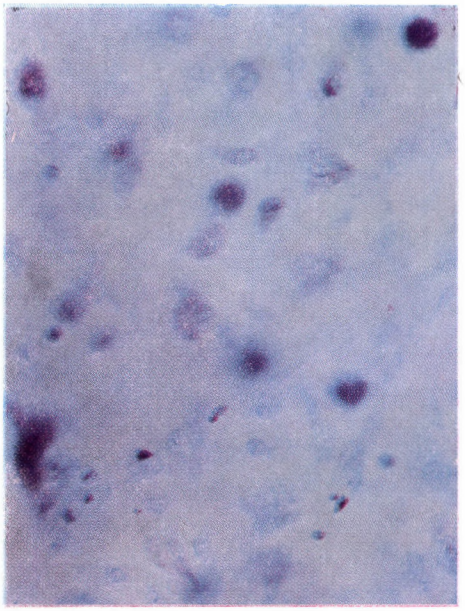


Fig. 8. Thymus culture from newborn rat, 72 hours after heparin treatment. Many metachromatic cells with nuclei characteristic of thymocytes. Toluidine blue. × 200

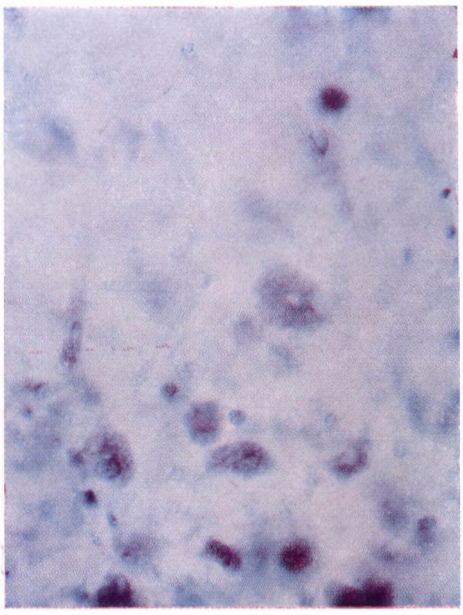


Fig. 9. The same as Fig. 8. Mastcell-like cells, a few of them still resembling thymocytes. Toluidine blue. × 200

Fig. 10. The same as *Fig. 9.* Regular mast cells have developed. Toluidine blue. × 200

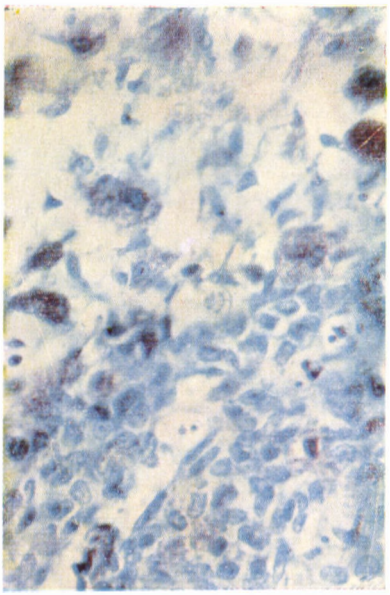


Fig. 11. Section of embryonic thymus culture 72 hours after heparin treatment. Big mastcell-like metachromatic cells at the periphery. Giemsa. × 200

Fig. 12. Embryonic spleen culture 72 hours after heparin treatment. Small, lymphocyte-like cells containing metachromatic substance. Giemsa. × 100

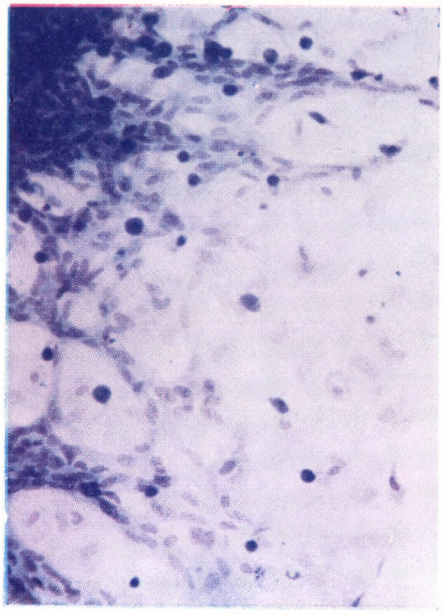


Fig. 13. Embryonic lymph node culture 72 hours after heparin treatment. Azur metachromatic substance in the cytoplasm of a few lymphocyte-like cells. Giemsa. × 100

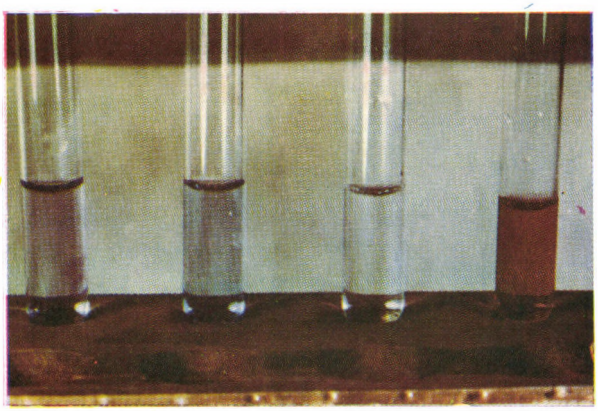


Fig. 14. Full-value and decomposed heparin stained with toluidine blue and PAS. Tubes 1 and 2 : intact and decomposed heparin stained with toluidine blue. Tubes 3 and 4 : intact and decomposed heparin stained with PAS

the experiments strongly supported our observations made *in vivo* that thymocytes develop first into PAS-positive cells and later into mast cells showing toluidine metachromasia. Likewise, our experiments corroborate the results obtained by LEHNER.

The genesis of these mast cells is a problem *in se*. We have namely found that if a mixture of glucuronic acid and glycosamine is added to the cultures, no metachromatic cells are formed. If we consider this finding in the light of the evidence that in response to the subcutaneous injection of glycosamine regular mast cells appear in guinea pigs, we feel justified in suggesting that whereas in that case the material responsible for metachromasia was available, in the tissue culture it was not present. As far as the structure of heparin is known, the attachment of sulphate in the ester seems to be the factor to be considered in the first place ; the cells can synthesize heparin probably only in its presence.

The fact that thymus cultures grew more intensively with decomposed heparin than without it suggests that this substance may be essential for the growth of the thymus.

In the thymus the decrease in the number of epithelial elements was associated with a decrease in the mast cell producing ability, whereas as the same time an increased number of metachromatic cells appeared, chiefly in the lymph nodes. This may suggest that a considerable percentage of the thymus cells has already been transferred to the lymph nodes, or it may imply that at the time of the involution of the thymus the organism starts compensatory processes in other organs. At any rate, these cells are not of full value, as it is indicated also by the fact that they are not toluidine-metachromatic, but show merely azur-positivity, as the same time when the cells in the thymus show a regular toluidine metachromasia.

Summary

In tissue cultures a tissue reaction has been provoked that had been observed on the thymus *in vivo*. Decomposed heparin (one which reacts positively only to PAS) was added to cultures of thymus, lymph nodes and spleen from rats of different ages and it has been found that in the epithelial reticulum of the thymus and in the thymocytes a metachromatic substance had been synthesized and regular mast cells had been formed. In the spleen and lymph nodes only very slight number of rudimentary cells showed metachromasia. The experiments corroborated the evidence obtained *in vivo* for the tissue reaction of the thymus.

Acknowledgement

Authors express their thanks to Mrs. I. ORBÁN, for the excellent technical assistance.

REFERENCES

1. Csaba, Gy., Törő, I., Ács, T., Kiss, F. I.: (1959) The Behaviour of the Thymus in Conditions Associated with Tissue Proliferation. Acta Morphologica Hung. In this number of Acta Morph. Hung. — 2. Heilbrunn, L. V.: (1956) The Dynamics of Living Protoplasma. Academic Press, New York. — 3. Paschoud, J. M.: (1954) Experimentelle Untersuchungen zur Heparingenese der Urticaria pigmentosa. Dermatologica *108*, 331. — 4. Raditz, M., Törő, I.: (1954) Behaviour of Thymus Transplanted to Chorioallantoic Membrane. Acta Biol. Hung. *5*, 88. — 5. Törő, I.: (1955) A csecsemőmirigy histophysiologiája. Debreceni Orvosegyetem Évkönyve, pp 1—5. — 6. Törő, I.: (1957) Histologische Beiträge zur Funktion des Thymus. Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft, 54. — Versammlung in Freiburg/Br, 22—25 Sept. — 7. Törő, I.: (1958) A csecsemőmirigy szöveti szerkezete. MTA Biol. Csop. Közl. *2*, 48—64. — 8. Törő, I., Aros, B.: (1958) Die Gewebsreaktion des Thymus auf verschiedene Einwirkungen. Acta Morph. Hung. *8*, 152—171. — 9. Vadász, J.: (1954) Beiträge zur Entstehung der Thymozyten. Acta Morph. Hung. *4*, 279—292.

ИСКУССТВЕННО ВЫЗВАННАЯ ТКАНЕВАЯ РЕАКЦИЯ ЗОБНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ТКАНЕВЫХ КУЛЬТУРАХ

ДЬ. ЧАБА, И. ТЁРЁ и Э. КАПА

В своих опытах авторы искусственно вызывали в тканевых культурах наблюдаемую ими прижизненно тканевую реакцию зобной железы. К тканевым культурам зобной железы, лимфатических узлов и селезенки крыс различного возраста они добавили расщепленный — исключительно PAS положительный — гепарин и установили, что в эпителиальной сеточке зобной железы и в тимоцитах синтетизируется метахроматическое вещество и образуются регулярные тучные клетки. Появление метахроматических клеток наблюдается в селезенке и в лимфатических узлах только в форме зачаточных клеток в совершенно минимальном количестве. Проведенными опытами авторам удалось подкрепить сделанные прижизненно наблюдения тканевых реакциий зобной железы.

PROVOZIERTE GEWEBSREAKTION DES THYMUS IN GEWEBSKULTUREN

GY. CSABA, I. TÖRŐ und E. KAPA

In Gewebskulturen wurde die in vivo beobachtete Gewebsreaktion der Thymusdrüse provoziert. Zu Gewebskulturen des Thymus, des Lymphdrüse und Milz von Ratten verschiedenen Alters wurde gespaltenes — ausschliesslich PAS-positives — Heparin zugefügt und festgestellt, dass im Epithelretikulum der Thymusdrüse und in den Thymozyten metachromatischer Stoff synthetisiert wird und reguläre Mastzellen entstehen. Das Erscheinen der metachromatischen Zellen kann in der Milz in den Lymphdrüsen nur bei einer ganz minimalen Anzahl von rudimentären Zellen beobachtet werden. Durch diese Versuche gelang die in vivo gemachten Beobachtungen im Zusammenhang mit der Gewebsreaktion der Thymusdrüse zu bestätigen.

Dr. György Csaba
Prof. Imre Törő
Eszter Kapa
Budapest, IX. Tűzoltó u. 58., Hungary.

State Institute of Rheumatism and Medical Hydrology (Director: K. FARKAS), Section for Anthropology (Director: J. NEMESKÉRI) of the National Museum-Natural History Museum, Budapest

PALEOPATHOLOGICAL STUDIES ON COPPER AGE SKELETONS FOUND AT ALSÓNÉMEDI

G. GÁSPÁRDY and J. NEMESKÉRI

(Received January 19, 1959)

Introduction

In historical anthropological research concerned with biological and social aspects, attention is devoted not only to the classical typological problems, but also to the fullest possible biological reconstruction. Within the framework of biological reconstruction, the problems should be approached from various angles to obtain the most complete information as to various prehistoric populations. In the present report we shall describe, as part of the biological reconstruction, the paleopathological state of a population that had lived in the Great Hungarian Plain between the Danube and Tisza rivers, in the late copper age (Pécel culture), around 2100 to 2000 B. C.

The copper age cemetery studied was unearthed in 1949 by KOREK et al. [8], of the Hungarian National Museum. In the cemetery of the small colony 41 copper age graves were found ; on the basis of the cemetery's size, there must have been about 60 graves. Archeological evidence suggests that the cemetery had been in use for about 2 or 3 generations, *i. e.* for 50 to 75 years, as it is indicated also by the uniformity of the burial rituals. Chronologically, the copper age population of the cemetery forms a facies living side-by-side with the population of the copper age Bodrogkeresztúr culture in the Great Hungarian Plain [4, 7, 9].

The archeological and anthropological aspects of the cemetery have been described in 1951 [8, 9]. In the present paper an account will be given of the results of paleopathological studies on the skeletal findings from the 41 graves.

Materials and methods

A total of 43 people was buried in the 41 graves. In two graves (No. 3 and No. 57) there were two bodies each. In the records made of the skeletal findings right at the beginning of the investigations we listed the intact, the fragmented and the defective bones, as well as the pathological changes and anatomical variations detectable on them. If so required, the gross findings were supplemented by X-ray examinations. The inventory made it clear that the skeletal findings from the single graves were greatly defective, mostly fragments and were in a poor condition. The graves were at a depth where sand met clay and this lead

Table I

Data for age and their confirmation

No.	Grave No.	Inventory* No.	Sex	Age at death	Age index	Endocranial ossification coefficient	Dental state		Internal structural and surface phases indicative of age			Notes
							Dentition	Abrasion	Humerus	Facies, symphyseos	Femur	
1.	3.	In situ	♂	35—39	— 50	—	—	—	—	—	—	Double grave on exhibition
2.	3.	In situ	♀	23—40	— 50	—	—	—	—	—	—	Double grave on exhibition
3.	4.	—	o	0,6	— 1	—	I_b	—	—	—	—	
4.	5.	4993	♀	49—53	— 50—	0,0	—	A_2—A_1	—	—	V.	
5.	9.	—	o	8	7—14	—	—	—	—	—	—	
6.	11.	4995	♀	21—22	— 22	0,0	—	A_0—A_0	—	—	—	Trace of epi-diaphyseal line still visible
7.	14.	—	o	4,5— 5	— 6	—	6_a	—	—	—	—	
8.	15.	—	♂	61—65	50 —	4,0	—	—	—	—	—	
9.	18.	—	o	3— 4	— 6	—	—	—	—	—	—	
10.	19.	4997	♂	54—58	— 50—	1,0	—	A_1—A_0	V.	—	V.	
11.	20.	—	o	1,5— 2	— 6	—	V_b	—	—	—	—	
12.	22.	4998	♂	64—68	50 —	4,0	—	A_3—S	III.	—	—	
13.	23.	4999	o	11—12	— 14	—	3_b	—	—	—	—	
14.	24.	5000	♂	28—32	— 50	0,0	—	A_0—A_0	—	—	—	
15.	25.	5002	♀	42—46	— 50	1,4	—	A_1—A_0	III.	II.	II.	
16.	26.	—	o	0,1	— 1	—	I_i	—	—	—	—	
17.	28.	5004	♂	52—56	— 50 —	4,0	—	A_1—A_0	III.	III.	II.	
18.	29.	5005	♂	54—58	— 50 —	3,2	—	S—S	III.	—	III.	
19.	30.	—	G	23— x	50	—	—	—	—	—	—	
20.	32.	5006	o	1,5	— 6	—	V_b	—	—	—	—	
21.	33.	5007	o	0,2	— 1	—	I_i	—	—	—	—	

Table I
(Continued)

No.	Grave No.	Inventory No.	Sex*	Age at death	Age index	Endocranial ossification coefficient	Dental state		Internal structural and surface phases indicative of age			Notes
							Dentition	Abrasion	Humerus	Facies, symphyseos	Femur	
22.	34.	—	o	0,1	— 1	—	I_i	—	—	—	—	
23.	35.	5008	o	1,5— 2	— 6	—	V_b	—	—	—	—	
24.	36.	5009	♂	62—66	50 —	3,5	—	A_3—A_3	—	—	—	
25.	38.	5011	♂	43—47	— 50 —	0,9	—	A_2—A_2	VI.	—	II.	
26.	39.	5012	♀	23—40	— 50	0,0	—	A_0—A_1	—	—	—	
27.	40.	5013	o	1,5— 2	— 6	—	V_b	—	—	—	—	
28.	41.	5014	♀	71—75	50 —	3,4	—	A_3—S	VI.	V.	V.	
29.	42.	5015	♂	44—48	— 50	4,0	—	A_2—A_1	—	II.	II.	
30.	43	—	♀	0,2	— 1	—	I_i	—	—	—	—	
31.	44.	5016	♀	30—34	— 50	0,4	—	A_2—A_1	II.	I.	II.	With one foetus
32.	45.	5017	o	1,5— 2	— 6	—	V_b	—	—	—	—	
33.	46.	5018	♂	42—46	— 50	0,0	—	A_1—A_0	IV.	—	IV.	
34.	47.	—	o	0,2	— 1	—	I_i	—	—	—	—	
35.	48.	5019	♀	56—60	50 —	—	—	—	V.	—	—	
36.	52.	—	?	23—x	— 50 —	—	—	—	—	—	—	
37.	53.	5020	♂?	16—17	— 22	—	8_b	—	—	—	—	Ossification of epi-diaphysis not yet begun
38	54.	—	G	23—x	— 50 —	—	—	—	—	—	—	Observed at excavation
39.	55.	5021	♀	24—28	— 50	—	—	—	I.	—	I.	
40.	56.	5022	♀	43—47	— 50 —	0,8	—	—	IV.	—	—	
41.	57/1.	5023	♂	43—47	— 50 —	0,5	—	A_1—A_0	II.	—	III.	
42.	57/2.	5024	♂	35—39	— 50	1,1	—	A_1—A_0	IV.	—	I.	
43.	58.	5025	♀?	20—21	— 22	0,0	—	—	—	—	—	Signs of epi-diaphysis ossification

* G = grown-ups o = child

to the deformation of bones. Petrification and porosity were also evident. Nevertheless, the material was exceptionally suitable for paleopathological studies.

First we determined the sex and age of the remains. Sex was determined by the methods used in anthropology; in estimating age, the complex method of NEMESKÉRI and HARSÁNYI [12] was employed, taking into account several factors determining age. The data for age and their corroboration are presented in *Table I.*

In *Table II* are shown the data for sex and age incidence; these furnish the basis for the evaluation of the results of paleopathological analysis.

Table II

Age and sex incidence in the skeletal material explored

Age groups	Male *n*	Female *n*	Total		In the case of the estimated 60 individuals *n*
			n	%	
Infant I			13	30.2	18
Infant II			2	4.6	3
Juvenile		2	2	4.6	3
Adult	4	4	8	18.6	11
Mature	7	4	11	25.5	15
Senile	3	1	4	9.5	6
Adult age not determined		1	3*	6.9	4
Total	14	12	43	99.9	60

* The sex of two adults can not be determined

Results

The pathological changes found are summarized in *Table III.* A description according to groups is given of the more significant pathological changes, developmental anomalies and of the few anatomical variations found.

Table III

Survey of pathological changes found

Grave No.	Inventory No.	Sex	Age	Changes	Diagnosis
19.	4997	male	Mat. 54—58	The orbital aspect of the frontal bone porous on the left side	Cribra orbitalis
22.	4998	male	Sen. 64—68	Lipping of vertebral bodies. Osteophytes on the margin of the cervical and lumbar intervertebral joints. The 10, 11 and 12 elongated up- and downward, due to ossification of the supraspinous ligament. Osteophytes on the margin of certain peripheral joints	Spondylosis (osteoarthritis of the spine). Ossification of ligaments. Arthrosis degenarative joint disease)

Grave No.	Inventory No.	Sex	Age	Changes	Diagnosis
29.	5005	male	Mat. 54—58	Lipping of the cervical and lumbar vertebral bodies. Osteophytes on the cervical and lumbar intervertebral joints ; bony union of those between cervical vertebrae 3 and 4. A fragment had detached from, then fused again with the upper margin of the body of, lumbar vertebra 4. The tendon of the extensor digitorum communis muscle shows ossification on the lateral condylus of the right tibia. Osteophytes on the right patella, at the insertion of the quadriceps femoris muscle. Spurs on both calcaneus bones, at the site of insertion of Achilles'tendon	Osteoarthritis of the spine and knee. Marginal hernia. Ossification of ligaments.
38.	5011	male	Mat. 43—47	Fenestration of right pelvic bone. Circumscribed impression of left pelvic bone, with thinning	Pressure atrophy?
41.	5014	female	Sen. 71—75	Lipping of cervical and lumbar vertebrae. Osteophytes on lumbar intervertebral joints. Marginal osteophytes on the tubercular articular facets of two right ribs	Spondylosis (osteoarthritis of the spine and costovertebral joints)
44.	5016	female	Adult 30—34	Lipping, 6 mm high, on the right side, on adjacent aspects of thoracic vertebrae 8 and 9. An impression 4 × 8 mm in size, 2 mm deep, in the lower aspect of thoracic vertebra 8. Tuberosities on adjacent aspects of lumbar vertebra 5 and sacrum	Spondylosis, Schmorl's hernia osteochondrosis
48.	5019	female	Mat. 56—60	Minor marginal lipping on the lumbar vertebral joints	Osteoarthritis (spondylosis)
55.	5021	female	Adult 24—28	Anterior wedging of lumbar vertebra 2.	Compression fracture (eventually spondylitis?)
56.	5022	female	Mature 43—47	Lipping, 1 to 2 mm high, on the anterior-superior margin of lumbar vertebra 5.	Spondylosis
57/2.	5024	male	Adult 35—39	Circumscribed, shallow impressions in the superior and inferior aspects of the bodies of lumbar vertebrae 2 to 5.	Schmorl's hernia

Pathological changes

a) *Spondylosis, spondylarthrosis (hypertrophic spondylitis, osteoarthritis of the spine)*

Severe spondylosis and spondylarthrosis occurred in the spine of 3 individuals. These are described in detail below.

A male aged 64 to 68 years (No. 4998, grave No. 22) showed osteophyte formation, at the superior and inferior circumferences of the cervical vertebrae 4 to 7. At sites, the osteophytes coalesced to a mass, at other sites they formed protuberances and spurs *(Fig. 1)*. The osteophytes at the superior margins of the 4th and 5th cervical vertebrae continue in the superior vertebral notch and thus narrow the intervertebral foramen. The left articular facets of the 4th and 5th cervical vertebrae are widened by osteophytes and are therefore much larger than the contralateral, intact facets. The affected articular facets are worn down and porous *(Fig. 2)*. The right lumbosacral joint shows evidence of severe spondylarthrosis. The enormous osteophyte originating from the inferior articular process of the 5th lumbar vertebra bridges over the articular space and almost completely covers the articular process of the sacrum *(Fig. 3)*. The other joints of the lumbosacral region show less severe spondylotic changes. On the affected side of the 5th lumbar vertebra the articular process is considerably widened, the articular surface is worn down and porous *(Fig. 4)*.

A male aged 54 to 58 years (No. 5005, grave 29) has osteophytes at the anterior margin of the cervical vertebrae ; those on the body of the cervical vertebrae 5, 6 and 7 extend also into the vertebral notches, narrowing thereby the intervertebral foramen. Osteophyte formation is visible at the margin of the intervertebral joints between the 2nd and 5th cervical vertebrae on the left side, and between the 3rd and 4th cervical vertebrae on the right side. Those between the 3rd and 4th cervical vertebrae show bony union on both sides *(Fig. 5)*. As a result of marginal osteophyte formation, the left intervertebral articular facet of the 3rd cervical vertebra is about 4 times the size of the unaffected right articular facet. The affected articular facet is worn down and porous *(Fig. 6)*. On the lumbar vertebrae the osteophytes increase in size downwards, protruding by 10 mm at sites *(Fig. 7)*. From the superior margin of the 4th lumbar vertebral body a piece, 12 × 4 mm in size, had detached, then formed a bony union with the vertebral body *(Fig. 8)*. We believe this change to be a marginal hernia. SCHINZ ET AL. [13] explain its development in the following way. Insofar as the cartilage covering the vertebral body breaks near the margin, cartilaginous tissue will undermine the vertebral margin by penetration through the hole formed and may detach it completely from the vertebral body. A condition similar to fracture arises. Later, the detached fragment is fixed to the vertebral body by spongious

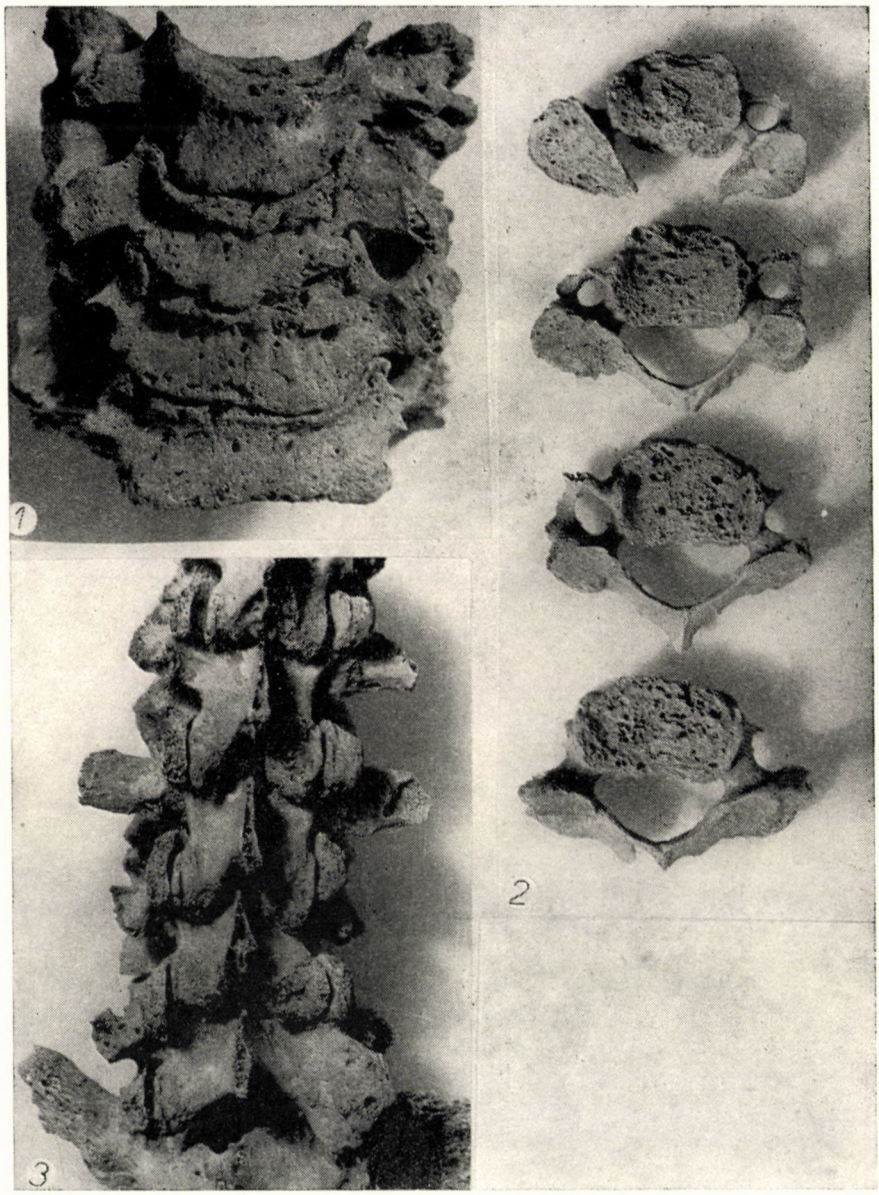


Fig. 1. Spondylosis, spondylarthrosis (hypertrophic spondylitis, osteoarthritis of the spine). Anterior view of cervical vertebrae 4 to 7 of a male aged 64 to 68 years (No. 4998)

Fig. 2. Spondylosis, spondylarthrosis, osteochondrosis. Superior aspect of the vertebrae shown in *Fig. 1*

Fig. 3. Severe osteoarthritis of the right lumbosacral joint. Posterior view of the spine (No. 4998)

Fig. 4. Severe spondylarthrosis (osteoarthritis) on the right side. The lumbar vertebra 5 shown in *Fig. 3.* turned upside down (No. 4998)

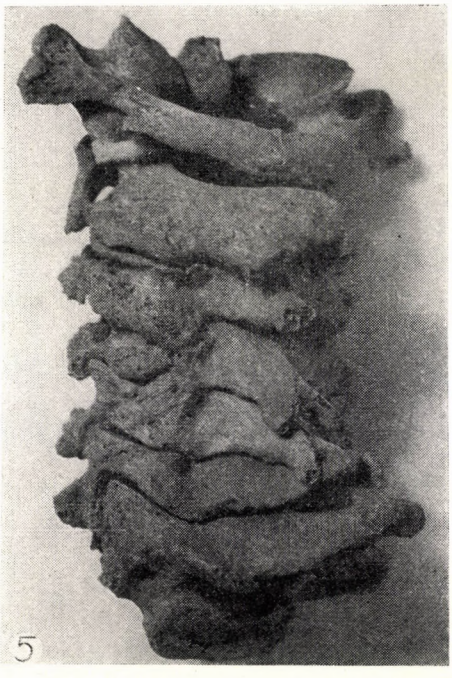


Fig. 5. Spondylosis, spondylarthrosis (hypertrophic spondylitis, osteoarthritis of the spine). Bony union of osteophytes on cervical vertebrae 3 to 4. (No. 5005)

Fig. 6. Spondylosis, spondylarthrosis (hypertrophic spondylitis, osteoarthritis). Superior aspect of cervical vertebra 3 shown in *Fig. 5*. The left articular facet increased to fourfold its original size by marginal osteophytes (No. 5005)

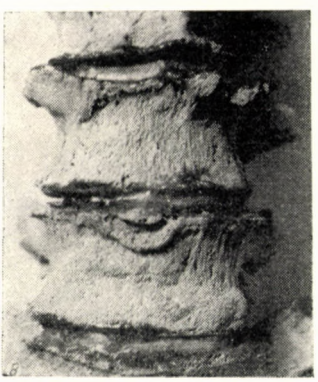


Fig. 7. Spondylosis, spondylarthrosis, Baastrup's disease. Posterior-right view of lumbar vertebrae (No. 5005)

Fig. 8. Spondylosis (hypertrophic spondylitis). Marginal hernia at the superior margin of lumbar vertebra 4. Anterior view (No. 5005)

tissue and the margin in this area shows osteophyte formation. This was demonstrable also in our case. The lumbar spinous processes are widened and those of the lumbar vertebrae 2 to 4 are in contact with one another. The contagious surfaces are worn down *(Fig. 7)*.

A female aged 71 to 75 years (No. 5014, grave 41), shows osteophytes at the upper margin of the fovea dentis of the atlas. There is a small osteo-

phyte on the apex of the dens epistrophei, and osteophytes on the adjacent anterior margins of the cervical vertebrae 6 and 7. The costal transversal fovea of the 11th thoracic vertebra is widened by osteophytes. On the anterior margin of the lumbar vertebrae 4 and 5 there are marginal spurs, 2 to 3 mm high. Osteophytes increasing in size downward are visible on the lumbar vertebrae and the sacrum, widening the articular facets.

b) *Arthrosis (osteoarthritis, hypertrophic arthritis, degenerative arthritis)*

Osteoarthritis (arthrosis) did not seriously effect any of the peripherial joints. Most of the changes were noted in the peripherial joints of the subject who had severe osteoarthritis of the spine as well.

Fig. 9. Spina bifida occulta in thoracic vertebrae 11 and 12. Male aged 42 to 46 years. Thoracic vertebrae 10 to 12 and lumbar vertebra 1. (No. 5018)

In one of them (male No. 4998, from grave 22) the acromial articular facet of the clavicle and the acromial facet of the scapula shows osteoarthritis. The styloid process of the left ulna and the volar aspect of the ulnar capitulum likewise display osteophytes. In both femurs the intercondyloid fossa is separated from the articular surface by a bone ridge, 1 to 2 mm high.

Likewise, osteoarthritis involving several joints is demonstrable on the skeleton of *a male aged 54 to 58 years* (No. 5005, grave 29), whose spine shows

severe pathological changes. The acromial articular facet of the right clavicle is widened by a tuberal exostosis. The lateral part of the acromion of the right scapula is widened and worn down. Osteophytes are visible on the margin of the right ulnar capitulum. Exostoses varying in height from 2 to 3 mm are found at the margin of the iliac tuberosity, lateral labium of the iliac crest, as well as on the tuber ischii.

c) *Pressure atrophy in the iliac bone*

The right iliac bone of *a male aged 43 to 47 years* (No. 5011, grave 38) had thinned centrally. An opening, 15 × 20 mm in size, with irregular outlines,

Fig. 10. Pressure atrophy of unknown cause in both pelvic bones of a male aged 43 to 47 years (No. 5011)

is visible in the centre of this area. Opposite to this area the left iliac bone exhibits an impression, 20 × 40 mm in size; here the bone had thinned *(Fig. 10)*.

d) *Compression fracture of a vertebra*

The 2nd lumbar vertebra of *a female aged 24 to 28 years* (No. 5021, grave 55) shows wedging anteriorly. The vertebral body has a height of 20 mm dorsally and 3 mm anteriorly. Osteophytes are visible to protrude 12 mm from the anterior-superior part of the vertebra *(Fig. 11)*. The body of the

Fig. 11. Compression fracture of lumbar vertebra 2. Female aged 24 to 28 years. Thoracic vertebra 12, lumbar vertebrae 1 to ? with gibbus formation. (No. 5021)

Fig. 12. Superior view of lumbar vertebra 2, showing osteophytes at the anterior-superior margin (No. 5021)

vertebra superior to it fits into this lipping. As a result of the compression fracture of the 2nd lumbar vertebra, the curve of the spine has altered and there is a gibbus at the level of the broken vertebra *(Fig. 12)*. The changes in the 2nd lumbar vertebra appear to have been caused by a compression fracture or eventually by spondylitis.

e) *Orbital cribra*

The left orbital aspect of the frontal bone is perforated like a sieve in a *male aged 54 to 58 years* (No. 4997, grave 19).

Developmental anomalies and anatomical variations

a) *Occult spina bifida*

Occult spina bifida occurs most commonly in the lumbosacral junction of the spine, whereas it is uncommon in the dorsal area. For this reason we think it worth while to describe this, otherwise most common, change. The arc of the thoracic vertebra 11 did not unite posteriorly and no spinous process was formed in the *male aged 42 to 46 years* (No. 5018, grave 46). The arc of the thoracic vertebra 12 did not unite posteriorly and only the left part of the arc took part in the formation of the rudimentary spinous process *(Fig. 9)*.

b) *Transitory lumbosacral vertebra*

The vertebra at the lumbosacral junction of *a male aged 28 to 32 years* (No. 5000, grave 24) is widened and increased in size at the lower portion of the transversal process. The articular facet is smaller on the left side. The facets are in contact with the lateral mass of the sacrum. The arc of the transitory vertebra is patent posteriorly.

c) *Spondylolysis*

The arc of lumbar vertebra 5 of an *individual aged 16 to 17 years* (No. 5020, grave 53) shows a cleavage along the pars interarticularis. According to BROCHER [5], in European people this change has an incidence of 5 per cent and, according to orthopaedic statistics, spondylolysis or spondylolisthesis is responsible for 10 per cent of the cases of sacral pain.

d) *Intercondyloid foramen*

Intercondyloid foramen occurs in both humeri of *a male aged 49 to 53 years* (No. 4993, grave 5) and in the left humerus of *a male aged 52 to 56 years* (No. 5004, grave 28).

e) *Variations of the transversal foramen*

In a *female aged 42 to 46 years* (No. 5002, grave 25) the transversal foramen on the right side of the cervical vertebra 5 is merely a round opening, 2 mm in diameter.

In a *female aged 30 to 34 years* (No. 5016, grave 44) the right transversal foramen forms a complex of intersecting foramina.

Discussion

The results of the paleopathological studies on the copper age remains of Alsónémedi do by themselves not suffice to draw conclusions of any great detail as to the public health relations of this population. Comparison with the results of similar investigations will, however, make it possible to determine whether in a certain period health conditions had improved or deteriorated. Good health relations are usually characterized by a low infant mortality rate and by high age. In *Table IV* we have compared the mortality rate of the population of Alsónémedi with that of the copper age population of Polgár—Basatanya; both cemeteries have been explored almost completely. The two populations had lived in the copper age, but geographically so distant from each other that any contact between them was unlikely. Yet, their mortality rates were practically identical, suggesting that the living conditions and health relations, too, were closely similar in the two populations.

Table IV

Comparative analysis of the age incidence in two copper age cemeteries

Site of excavation	Age groups					
	Infant I.	Infant II.	Juvenile	Adult	Mature	Senile
Alsónémedi	17.2	3.4	13.8	34.3	20.7	10.3
Polgár—Basatanya	11.1	6.9	14.5	33.3	29.7	4.1

In connection with the evaluation of paleopathological results it is to be mentioned that the average life span of both sexes was 30.5 years and that the subjects 20 years of age had a life expectancy of 32.2 and 34.1 years, respectively. We do not wish to deal here with the potential causes of death, but it has to be mentioned that foetal bones were found in the pelvis of a female skeleton from grave 44 (No. 5016). The woman had obviously died during pregnancy at the age of 30 to 34 years. It is questionable whether or not death has been in causal relationship with pregnancy. The same skeleton shows vertebral changes disproportionately severe for the woman's age.

The pathological changes found in 10 of the skeletons examined are presented in *Tabie V.*

Table V

Summary of the changes found

Diagnosis	Males			Females			Combined n
	Adult n	Mature n	Senile n	Adult n	Mature n	Senile n	
Cribra orbitalis					1		1
Spondylosis		1	1		2	1	5
Spondylarthrosis		1	1		1	1	4
Ossification of ligaments		1	1				2
Arthrosis			1			1	2
Schmorl's hernia	1	1		1			3
Costovertebral arthrosis						1	1
Osteochondrosis				1			1
Pressure atrophy		1					1
Compression fracture of a vertebra				1			1
Total	1	5	4	3	4	4	21

As seen, in the 10 individuals 10 different pathological conditions have been established in 21 cases ; each one of six individuals showed one pathological condition, 4 showed 3 or 4 simultaneously.

Most of the pathological changes occurred in the spine. This finding is in agreement with the view of ACKERKNECHT [1] that osteoarthritis (spondylosis and arthrosis) of the spine is the most frequent change ; this condition was wide-spread even in the big reptiles of the geological middle age. The signs of arthritis detected in skeletons from distant geological areas induced ANDERSON to claim [2] that articular diseases are the oldest and most wide-spread skeletal changes. Paleopathological research revealed a high incidence of osteoarthritis in Pithecanthropus, man of Neanderthal and *Homo sapiens fossilis.* A decisive role has to be attributed to constitutional factors in the genesis of these diseases, as such factors did not change for thousands of years, whereas the diseases caused by bacteria and viruses are subject to continuous variations, as a result of the mutual adaptation of both the organism and the pathogen.

The incidence of pathological skeletal changes in the adult population (28 adults) was 35.7 per cent, as 10 adults show such changes.

Of the 21 cases of 10 different changes occurring in 10 individuals, 20 may be considered to have been due to disease, whereas one might have

been caused by injury. Four subjects had such vertebral changes that they must have been unable to work.

To supplement the results of paleopathologocal studies we shall now discuss briefly the general anthropology of copper age populations. (As to our previous studies, see 10, 11).

There are two types of anthropological character in the Alsónémedi copper age population. Those of the first type are of small-medium stature, have a dolicho-mesocranic skull and a lepto-mesoprosopic face. The skeletal bones are fine and the constitution is gracile, leptosomic. This typological element may be considered to be a local variation of the mediterranean race, with brachycranic elements. The second type is characterized by medium, tall-medium stature, a meso-brachycranic skull and a meso-leptoprosopic face. The skeletal bones are of medium strength, the constitution is picnic-athletic. This type is the atlanto-mediterranean variant of the mediterranean race, with a secondary admixture of a brachycranic element. Anthropological analysis according to age and sex suggests the basic type to have been a dolichomorphic one, modified by the appearance of a brachycranic, brachymorphous element.

The aim of the paleopathological studies was to supplement the usual anthropological reconstruction by biological reconstruction. Demographical, anthropological and paleopathological reconstruction, together with archeological reconstruction, will furnish the basis for a fuller information as to the population in a given colony living in a certain era. Similar studies of several cemeteries will make biological reconstruction and its interpretation possible. This study has been intended to contribute some data to such future work.

Summary

Pathological changes and anatomical variations have been studied on skeletons found in a copper age cemetery at Alsónémedi.

As to the anthropological characteristics, the population belonged to the Europoid group, showed two variants of the Mediterranean type, mixed with a brachymorphic component.

Most pathological changes occurred in the vertebrae. Besides osteoarthritis of the spine, one case of marginal herniation and one case of vertebral compression were revealed. The peripheral joints showed only degenerative osteoarthritis (arthrosis) of mild nature.

The total number of individuals unearthed was 43 ; among these, 10 adults showed 10 diagnostically different skeletal changes, an incidence of 35.7 per cent.

REFERENCES

1. ACKERKNECHT, E. H. (1953): Paleopathology. In Krober's Anthropology Today. The University Press, Chicago. — 2. ANDERSON, W. A. D. : (1953) Pathology. C. V. Mosby Co., St. Louis. 1249. — 3. BANNER, J.: (1956) Die Péceler Kultur. Archeol. Hung. *35*. 314, 124. — 4. BANNER, J., KUTZIÁN, I.: (1959) Adatok a Kárpát-medence rézkori kronológiájához. Archeol. Ért. Budapest. In the press. — 5. BROCHER, J. E. W. : (1951) Die Wirbelverschiebung in der Lendengegend. Georg. Thieme, Leipzig. — 6. GÁSPÁRDY, G. : (1957) A Győrben feltárt késő rómaikori csontvázleletek paleopathológiai vizsgálata. Anthropol.

Közl. Budapest, *4*, 15—24. — 7. KALICZ, N.: (1958) A székelyi ásatások kronológiája. Archeol. Ért. Budapest. *80*. — 8. KOREK, J.: (1951) Ein Gräberfelder der Badener Kultur bei Alsónémedi. Acta Arch. Hung. *1*, 35—51. — 9. KUTZIÁN, I.: (1955) Die Ausgrabungen in Tiszapolgár—Basatanya (Gehöft Basa). Archeologische Konferenz der Ungarischer Akademie der Wissenschaften. Budapest, 68—87. — 10. NEMESKÉRI, J.: (1951) Anthropologische Untersuchungen der Skelettbefunde von Alsónémedi. Acta Arch. Hung. *1*, 55—72. — 11. NEMESKÉRI, J.: (1956) Anthropologische Übersicht des Volkes der Péceler Kultur. In Banner's Die Péceler Kultur. Archeol. Hung. *35*, 295—314. — 12. NEMESKÉRI, J., HARSÁNYI, L.: (1958) A csontvázleletek életkorának meghatározási módszereiről és azok alkalmazhatóságáról. MTA Biol. Csop. Közl. *1*, 115—164. — 13. SCHINZ, H. R., BAENSCH, W. E., FRIEDL, E., UEHLINGER, E.: (1951) Lehrbuch der Röntgendiagnostik. Band II. G. Thieme. Stuttgart. pp. 1436—1438. —

РЕЗУЛЬТАТЫ ПАЛЕОПАТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ СКЕЛЕТОВ ИЗ МЕДНОГО ВЕКА, ОБНАРУЖЕННЫХ ПРИ РАСКОПКАХ В АЛШОНЕМЕДИ (ПЕЦЕЛЬСКАЯ КУЛЬТУРА)

Г. ГАШПАРДИ и Я. НЕМЕШКЕРИ

Авторы исследовали патологические изменения и анатомические варианты на скелетах из медневекового могильника, раскрытого в ходе раскопок в Алшонемеди.

Антропологическую характеристику исследованной популяции представляет в пределах европидного форменного круга комплекс двух видоизменений средиземноморского типа, смешанный брахиморфным компонентом.

Больше всего патологических изменений наблюдались на позвоночном столбе. Наряду со спондилозом и артрозом позвоночного столба в одном случае наблюдалась краевая грыжа, а в другом случае компрессионный перелом позвонка. На суставах конечностей наблюдался только незначительный артроз. В одном случае была установлена вызванная внешним давлением атрофия вертлужной впадины, которая на одной стороне обусловливала окончатость вертлужной впадины.

Из 43 скелетов могильника можно было установить на скелетах 10 взрослых лиц 10 диагностически обособляемых патологических изменений, что соответствует 35,7%-ой частоте.

PALÄOPATHOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN DER SKELETTFUNDE AUS DER KUPFERZEIT (PÉCELER KULTUR), FREIGELEGT IN ALSÓNÉMEDI

G. GÁSPÁRDY und J. NEMESKÉRI

Verfasser untersuchten an den Skelettfunden des in Alsónémedi freigelegten kupferzeitlichen Friedhofes die pathologischen Veränderungen und die anatomischen Variationen.

Das anthropologische Charakteristikum der untersuchten Population vertritt im Rahmen des europiden Formenkreises ein Komplex von zwei Varianten des mediterranen Typs, der mit einem brachymorphen Komponenten gemischt ist.

Die meisten pathologischen Veränderungen wurden an der Wirbelsäule beobachtet. Neben Fällen von Spondylosen und Arthrosen der Wirbelsäule wurde in einem Fall Randhernie und in einem anderen Kompressionswirbelbruch beobachtet. In den Gliedmaßgelenken waren nur Arthrosen geringen Grades zu beobachten. In einem Fall wurde die durch äußeren Druck hervorgerufene Atrophie der Hüftpfanne festgestellt, die auf einer Seite zur Fenestration der Hüftpfanne geführt hatte.

An den Skeletten von 10 Erwachsenen des 43 Individuen erhaltenden Friedhofs konnten 10 diagnostisch differenzierbare pathologische Veränderungen festgestellt werden, was einer 35,7%igen Häufigkeit entspricht.

Dr. Géza GÁSPÁRDY, Budapest II. Frankel Leó u. 19—21., Hungary,
Dr. János NEMESKÉRI, Budapest, VI. Bajza u. 39., Hungary.

Department of Dermatology and Venerology of the University Debrecen
(Director : Prof. L. SZODORAY)

CORRELATIONS BETWEEN SCLERODERMA AND DERMATITIS ATROPHICANS

(CONCEPT OF THE SO-CALLED COLLAGEN DISEASES)

L. SZODORAY and P. DARÓCZY

(Received February 23, 1959)

Problems concerning the so-called "collagen diseases" have formed the subject of numerous congresses and symposia during recent years (Stockholm 1954, Strassbourg 1957, Budapest 1957, Cracow 1958, Moscow 1959, etc.). Unfortunately — instead of discussing the clinico-pathological significance of the syndromes in question —, these scientific meetings more or less confined themselves to debates concerning the terms to be applied to these diseases falling in the above category. The term "collagen disease" seems to be a misnomer. It was KLEMPERER himself, the inventor of the concept, who arrived subsequently at the conclusion that what characterizes the syndromes known collectively as collagen diseases is not so much a change of the collagenous fibres as a pathological alteration of the interfibrillar ground substance. It should be noted that the morbid changes in question are far from being uniform either qualitatively or quantitatively. Although it is chiefly the change of fibrinoid which is regarded as the principal feature of these diseases, it must be borne in mind that fibrinoid itself is not a morphologically or chemically uniform substance.

We think that the clinical use of this nosological category is justified chiefly by the fact that the pertaining diseases frequently show intermediate forms, thus constituting transitions from one to the other member of the group (see Table I), and further by the fact that the frequency of their simultaneous occurrence in the same patient is greater than the statistical probability.

It has been mentioned that, in the diseases at issue, the pathological change in the ground substance displays quantitative and qualitative differences. While in some cases an accumulation of mucopolysaccharides is encountered, in others sclerosis of the connective tissue or fibrinoid degeneration — particularly in the vessel walls — is observed. The fundamental problem is the determination of the factors responsible for the various phenomena characterizing histologically each particular pathological process, such as the atrophy of collagenous tissue accompanied by the loss of the elastic matter in one case, sclerosis of the connective tissue in another, accumulation of mucoproteins in a third, and fibrinoid in the vessel walls in a fourth case.

Certain facts are actually available for the interpretation of the various changes affecting the connective tissue. A certain correlation is known to exist between the mucopolysaccharides contained in the ground substance, and the sclerosis of the connective tissue. WYDROFF, HIGHBERGER and BANGA and others observed the incorporation of mucoids into the collagenous fibres. These authors performed their experiments on tissue cultures, while ROMHÁNYI et al. "in vivo" experiments observed the gradual incorporation

Fig. 1. Scleromyxoedema : accumulation of mucoids in the corium. Cresyl-violet stain

of mucoid into the collagenous tissue after intracutaneous injection into the tail of albino rats. Clinical observations supplied adequate evidence to show that the relationship between mucoids and collagen may be disturbed under morbid conditions. A good example in this respect is the peculiar dermatological process termed *scleromyxoedema.* It was first described by DUBREUILH at the beginning of the century, and a few years later by ARNDT. Of recent, it was GOTTRON, then, — in 1956 — KEINING and BRAUN—FALCO who concerned themselves with this syndrome. In scleromyxoedema the conversion of mucoids into sclerotic collagenous tissue is inhibited. There are great amounts of mucoid in the corium which shows metachromasia on staining with toluidine blue and cresyl violet (acid mucopolysaccharides, see Fig. 1), while advanced fibrosis of the connective tissue is also encountered (hypertrophy and homogenization of collagen).

A similar problem is presented by the association of scleroderma and alterations suggestive of dermatitis atrophicans or, again, by the sclerodermatous appearance of some areas in dermatitis atrophicans plaques. The observation of such intermediate forms or the simultaneous appearance of true scleroderma and dermatitis atrophicans gives rise to the question, why initial inflammatory alterations are followed by a sclerosis of collagenous tissue in some areas, and by atrophy without sclerosis in other regions. It should be noted in this connection that certain cases of localized scleroderma (morphea) lead likewise to atrophy. Dermatologists have long been interested in the concurrence of these two — both histologically and clinically so different — processes. The problem was treated by OPPENHEIM as long ago as 1910 and 1913, and it was raised again by PAUTRIER, who at the Strassbourg conference in 1929 reported to have observed sclerodermic symptoms in 60 per cent of his cases of dermatitis atrophicans. It was in 7 cases of scleroderma, out of a total of 42, that we were able to encounter the signs of dermatitis atrophicans. The publications of the said authors gave rise to a wide-spread discussion of the problem whether the sclerodermatous alterations observable in cases of dermatitis atrophicans were really indicative of true scleroderma. PAUTRIER inclined to this view: "si nous disons lésions sclerodermiformes, c'est pour indiquer qu'elles n'obéissent pas à la topographie de la sclerodermie en bandes, de la sclerodactylie ou de la sclerodermie en plaques, mais ce n'est pas qu'une question des mots, en réalité c'est bien de la sclerodermie qu'il s'agit". In discussing this problem we must bear in mind that the various members of the scleroderma group display certain histological differences. This view seems to be confirmed by GOTTRON—SCHÖNFELD's recent textbook whose chapter on scleroderma was written by KORTING. The evidence furnished by our own histological material induces us to accept this view. In connection with a number of cases of scleroderma and dermatitis atrophicans, we undertook investigations with a view to throwing light on transitional structures and, in particular, on the combination of sclerosis with the atrophy of the connective tissue.

Before describing these investigations we wish to deal briefly with the histomorphology and with the histogenesis of scleroderma (or, more correctly, scleropathy Emmerich). Most of the authors (GOTTRON and his school, LONGHI, ALLEN, etc.) agree that, in sclerodermic processes, changes in the connective tissue are preceded by neurovascular alterations. We agree with JABLONSKA et al. in regarding sclerodermia as a neurotrophic — or, more correctly, neurovascular — process. The correctness of this concept substantiated by the evidence of those earlier histological (neuromorphological: ORMEA, JOHN, SZODORAY*) observations and by capillarmicroscopical observations which

* *Szodoray* observed enhanced cholinesterase activity in the nerve fibres of the little blood vessels in the sclerotic corium (see Fig. No 2/b).

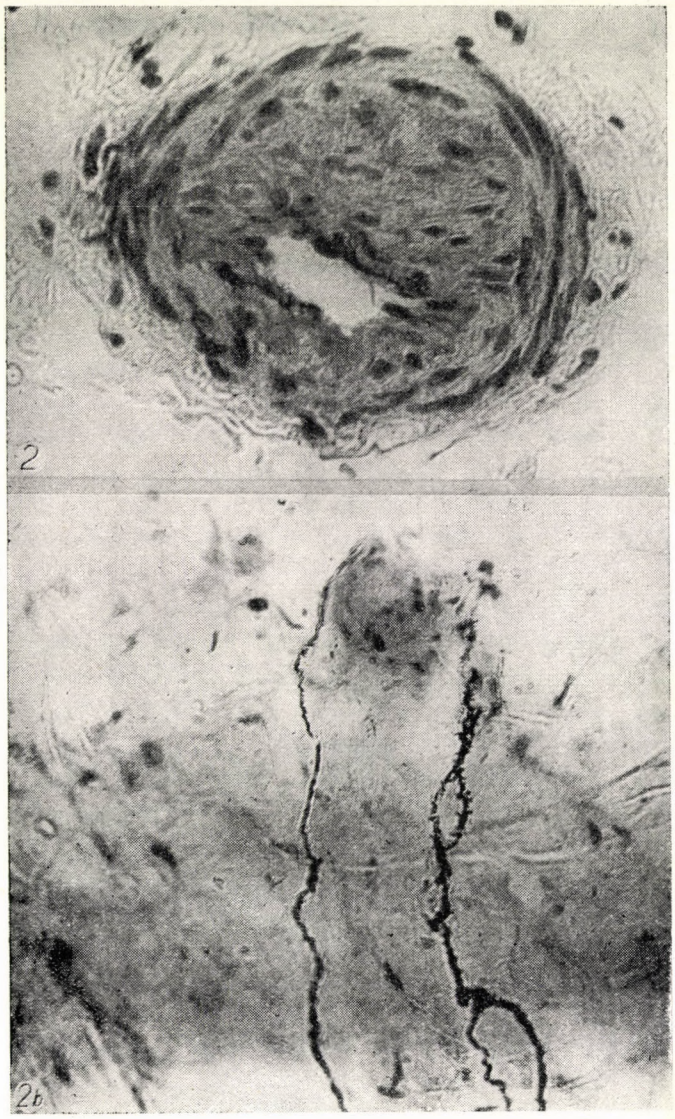


Fig. 2/a Scleroderma : typical thickening of arteriolar walls
Fig. 2/b Cholinesterase activity (Kolle-Friedenwald's technique). Note nerve fibres running towards the wall of blood vessels

were made by BUGÁR—MÉSZÁROS and later by MÁRAMAROSI and NAGY, and in histological sections by LONGHI and others (Figs. 2a). The chronaximetric investigations performed by JABLONSKA et al. also point to the importance of neural factors. Apart from neurovascular ones we must, however, take also other pathogenic factors into account, *e. g.* endocrine, allergic (auto-allergic), etc. factors, as indicated also by the evidence of certain clinical observations such as the preponderance of female patients ; the appearance of hypergammaglobulinaemia which is not infrequently associated with hypo-proteinaemia ; the *increased level of hexosamine in the serum* (SZABOLCS and TANKÓ), premenstrual exacerbation of cutaneous changes in certain cases, etc. We refer in this connection to SULZBERGER's statement concerning the pathogenesis of skin diseases that many cutaneous processes may be regarded as examples of the general rule according to which "a disease will develop if several pathogenic factors exert a simultaneous action on the tissues". It is in our opinion on the extent to which the various pathogenic factors become operative that the clinical and pathomorphological picture of each individual case depends. We are, therefore, inclined to accept PAUTRIER's view that the members of the scleroderma group are histologically different from one another, and cannot share the view — expressed by WORINGER and LAUPIER at the conference of Strassbourg in 1957 — that all the diseases (about six) classified under the head of scleroderma show a common characteristic histological picture.

Of recent, we undertook histochemical investigations with a view to finding the reason why the sclerosis of collagenous tissue is associated with elastosis in some, and with atrophy and the destruction of elastic tissue in other cases. The direction of our studies was based on a statement made by REICH some 8 years ago that the onset of both scleroderma and dermatitis atrophicans was characterized by an inflammatory process. In the case of scleroderma, this initial phase is followed by sclerosis due to exoserosis. In the case of dermatitis, the initial inflammation has an overwhelmingly cellular character (circumscribed masses of leukocytes and lymphocytes) which is really responsible for the fact that here the initial phase is followed by atrophy of collagen and elastolysis. Perivascularly arranged lymphocytes and leukocytes are indeed well observable in the upper layer of the corium not only in the incipient phase of dermatitis atrophicans.

In the investigations we endeavoured to demonstrate exoserosis as postulated by REICH by means of HAITINGER's fluorochrome method. After preparing histological sections from four cases of scleroderma and four cases of dermatitis atrophicans, we stained them with mixtures of euchrysene, thiazine-red and thioflavine, and examined them under the fluorescence microscope. Brownish discoloration is regarded by EPPINGER and HAITINGER as indicating the presence of serum in the tissues. Intact epidermis shows

otherwise a pale blue, and collagen tissue a greenish fluorescence. All of our sections obtained from the skin of sclerodermatous patients showed a more or less diffuse, brownish discoloration of the corium (Fig. 3), while all the sections obtained from the skin of the dermatitis cases showed a weak, greenish fluorescence of the connective tissue (Fig. 4). Sections obtained from the edge of sclerotic areas revealed a marked brownish colour also (Fig. 5).

Our observations support the assumption of WYDROFF and HIGHBERGER, BANGA and ROMHÁNYI that mucoproteins that have gained access to the intercellular ground substance are involved in the development of sclerosis, and to confirm at the same time REICH's statement that exoserosis occurs in the initial stage of sclerodermal processes. The manner in which pathological mucoproteins find their way to the connective tissue is still unelucidated. Sclerodermic vascular processes are possibly associated with increased permeability which may facilitate the escape of mucoproteins from the blood stream into the tissues.

It is only too natural that vascular changes, characteristic of the initial inflammatory processes, may be of various degrees and different types and that, consequently, sclerosis can be of a different degree in each particular case. The fact that cellular infiltrations are different in different cases would then explain the reason why sclerosis is followed by elastosis in some instances and by atrophy in others. It is moreover conceivable that vascular changes of different types occur in different regions of the organism of one and the same individual and give thus rise to different types of cutaneous alterations.

Table I makes it evident that the concurrence of different pathological processes of the collagenosis group or the simultaneous appearance of intermediate forms, *e. g.* scleroderma and myxoedema (scleromyxoedema) or dermatomyositis and myxoedema (dermatomyxomyositis) are fairly frequent. (The syndrome termed "localized panatrophy" by GOWERS and BETTLEY, in which atrophy takes a predominantly vertical course, might also be regarded as belonging to this category).

We propose to present, in the following, the case records of three patients in whom the existence of intermediate forms and the simultaneous occurrence of dermatitis atrophicans and scleroderma caused considerable difficulties in diagnosis, from histological point of view also.

Case I. L. K., female, 56 years of age, menopause at the age of 46 years, had noticed the first cutaneous alterations in 1945 when she had become aware of numbness in the fingers ; this had been followed by a bluish pigmentation and thinning of the skin of the hand. Similar symptoms had subsequently developed on the lower extremities and had continuously spread over wider and wider areas.

The patient was admitted in October 1958, when the skin of both her hands was bluish and astrophied and similar diffuse alterations were visible on the skin of the lower limbs. Lentil-sized, yellowish, round and indurated foci were seen around lesions. A histological analysis of the sections made from the atrophied areas of the skin revealed advanced atrophy of the epidermis and corium, as also a marked dilatation of the capillaries in the upper layer of the corium, with a moderate lymphocitic infiltration. We were surprised to find, instead of elas-

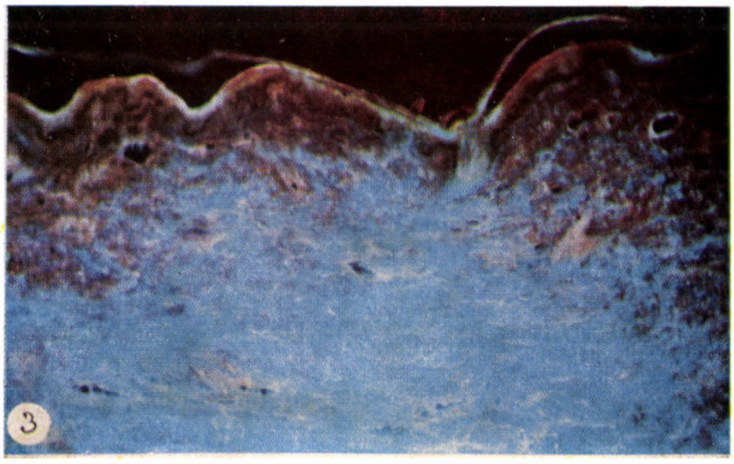


Fig. 3. Scleroderma: brownish coloration of sclerosed area. Haitinger's fluorochrome method

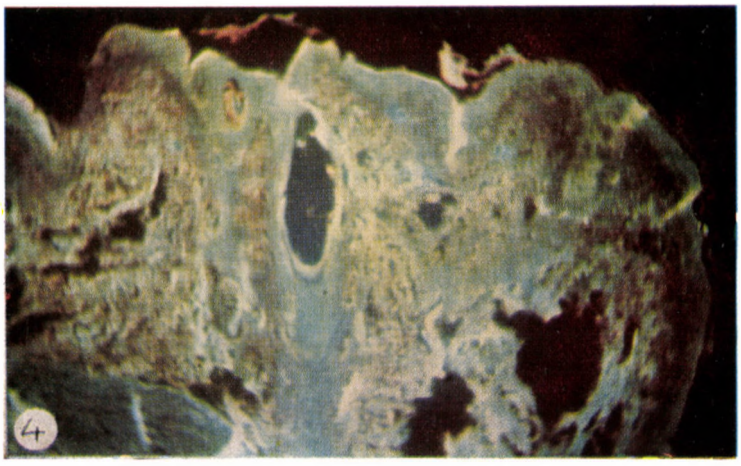


Fig. 4. Dermatitis atrophicans: no brownish colour visible. Haitinger's fluorochrome method

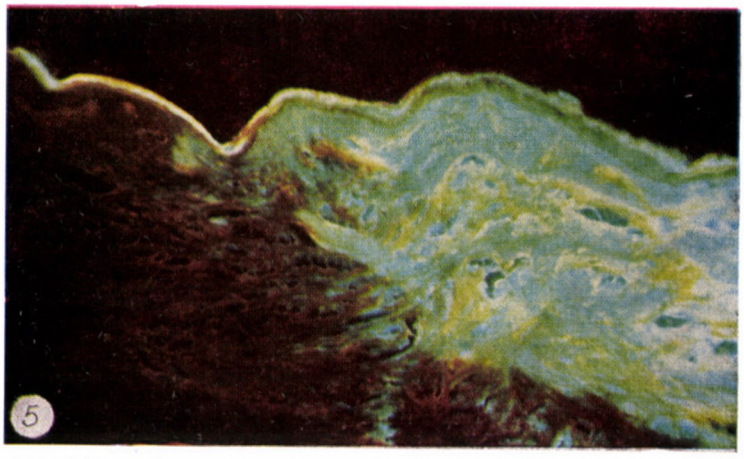


Fig. 5. Scleroderma (morphoea guttata): brownish coloration at the edge of the lesion. Haitinger's fluorochrome method

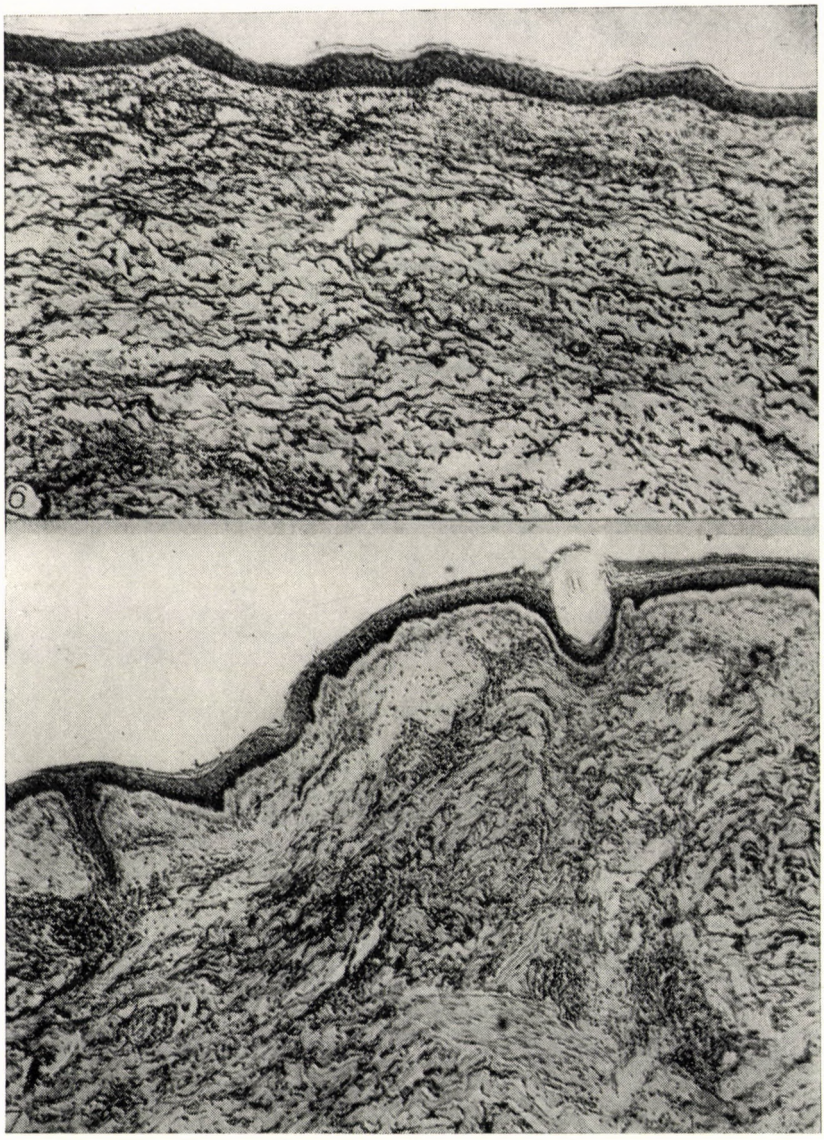


Fig. 6. Case I. Lesions indicative of dermatitis atrophicans. Note well-preserved elastica!
Fig. 7. Case II. Elastolysis in the upper part of corium. Resorcin-fuchsin stain

tolysis, a marked relative hyperplasia of the elastica (Fig. 6.), a phenmenon characteristic of scleroderma. In the deeper layer of the corium there were arterioles with thickened walls, likewise a characteristic feature of scleroderma.

Case II. S. Sz., female, 56 years of age, had become aware of cutaneous changes 4 years before admission ; bluish pigmentation and thinning of the skin of the feet, the shank, thigh and gluteal area. A few round, mildly yellow, indurated foci were observable on the skin of the trunk, some of which were surrounded by a marginal hyperemia, the so-called "lilac-ring" characteristic of scleroderma. All these lesions were diagnosed as indicative of morphea. Histological examination showed an atrophied epidermis, a flattened papillary layer and a lymphocytic infiltration around the capillaries in the upper part of the corium. The network of collagenous fibres in the corium was found to be reduced, and the number of interfibrillar fibrocytes increased. Contrary to expectation, the upper part of the corium

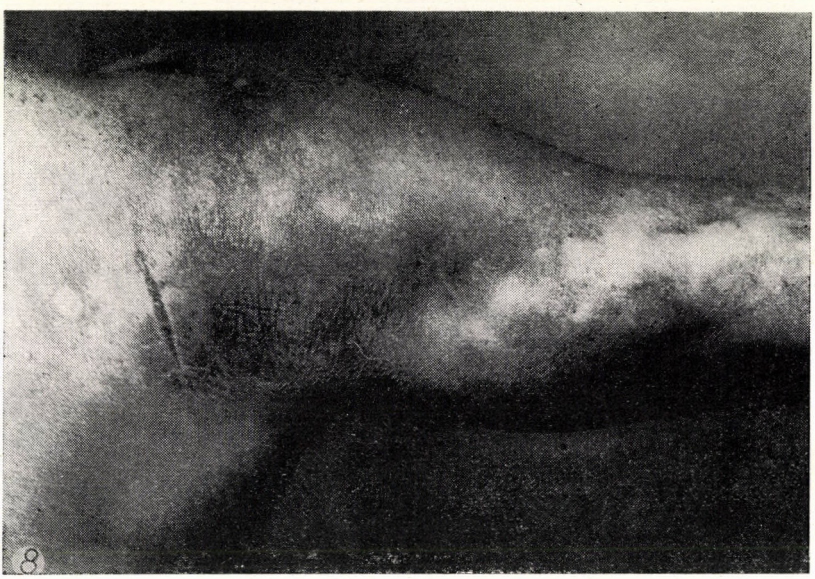


Fig. 8. Scleroderma on right arm with morphoea guttata. Dermatitis atrophicans of both elbows and the dorsal surface of both hands

was devoid of elastic matter (elastolysis, Fig. 7), while its relative hypertrophy was seen in the deeper layers. Histological analysis of the muscles showed an increased number of sarcolemmal nuclei, as also a loss of myofibrillar striation at several points (parenchymatous alterations) ; the capillaries of the endomysium and perimysium were dilated in some places. Laboratory tests : no pathological changes in urine or blood ; erythrocyte sedimentation rate 27/50 per hour. There was no significant response to treatment with penicillin. After 2 ½ months Aralen treatment resulted in a considerable improvement of the cutaneous disorders. The case was considered an intermediate form between dermatitis atrophicans and scleroderma combined with parenchymatous myositis : sclerodermatomyositis complicated with dermatitis atrophicans.

*Case III.** A. K., male, 38 years of age, had noticed the first cutaneous lesion in March, 1958, a yellow pigmentation of the right shoulder which had made him visit the outpatient department of Miskolc Hospital. There the tentative diagnosis : dermatitis atrophicans was made. He was admitted to our department on January 19, 1959. There was a 5 cm wide band-shaped, yellow induration of the skin, starting from the right scapula and running along the right upper arm ; it was interrupted at the elbow by a palm-sized atrophied patch beyond

* Published by L. SZODORAY in the Derm. Wochenschr. *138*. 653, 1959.

which the sclerosed bundle continued along the extensor surface of the lower arm right down to the wrist. Several lentil-sized, round, in some place depressed, whitish and markedly indurated papules were scattered along the edges of the sclerosed area. The skin showed bluish pigmentation and was markedly thinned over the left elbow, at an area similar in size to that around the right elbow, as also on the dorsal surface of both hands. Unilateral scleroderma "en bandes" was diagnosed on the right side, while the symptoms seen on the elbows and the dorsal surface of the hands pointed to symmetrical dermatitis atrophicans *(Fig. 8.)*. A round, penny-sized depigmented area: *vitiligo* occurred around the right eyebrow. Neurological and internal examinations gave negative results. Since the sclerodermal lesions showed a segmental arrangement, corresponding to the VIIth and VIIIth cervical segments, we made radiographs which showed a flattening of the cervical lordosis. *Histological analysis* of the skin taken from around the elbows revealed an atrophied epidermis, a flattened papillary layer, lymphocytic infiltration around the capillaries in the upper part or the corium, and a reduction of elastic fibres, all symptoms characteristic of dermatitis atrophicans. Sections prepared from the skin of the right upper arm revealed the typical features of scleroderma: thinning of the epidermis and thickening of the corium. The collagenous fibers were coalescent and homogenized; the elastic fibres were preserved or showed signs of elastolysis. A thickening of the arteriolar walls (also a feature characteristic of scleroderma), moderate proliferation of the intima and increased elastic were also present.

The case is a good example of the simultaneous occurrence of scleroderma "en bandes", morphea guttata, dermatitis atrophicans and vitiligo; it was in many respects similar to the case published by RICHTER, and those observed by JABLONSKA.

Summary

(I) Syndromes, classified in the group of collagen diseases, frequently appear in forms that constitute transitions from one to the other member of the group. This is one of the reasons why it is justified to place them in a separate nosological group.

(II) Such classification is in conformity with the frequent association of scleroderma and dermatitis atrophicans, a phenomenon which had given rise to certain controversies in earlier literature.

(III) Whether inflammation is followed by sclerosis or by atrophy depends, according to our examinations by means of Haitinger's fluorochrome method, on the character of the initial inflammatory process. If the inflammation is associated with cellular infiltration, the appearance of atrophy may be expected, while sclerosis is to be expected if exudative factors are prevailing in the initial inflammatory process.

REFERENCES

1. ALLEN, A. G.: (1954) The skin. Mosby Co. St. Louis. p. 128. — 2. BANGA, I. (1958) Börgy. Vener. Szemle *34.* 150. — 3. BETTLEY, R.: (1950) Localised panatrophy. Brit. J. Derm. *62.* 330. — 4. BUGÁR—MÉSZÁROS, K.: (1929) Capillarmikroskopos megfigyelések sklerodermiánál. Orv. Hetil. *73.* 60. — 5. GOTTRON, H. A.: (1954) Skleromyxödem. Arch. Derm. Syph. (Berl.) *199.* 71. — 6. HAITINGER, M.: (1938) Die Fluoreszensmikroskopie. — 7. JABLONSKA, S., BUBNOW, B., u. B. LUKASIAK: (1957) Auswertung von Chronaxiemessungen bei Sclerodermie. Derm. Wschr. *136.* 821. — 8. JABLONSKA, S., BUBNOW, B., B. LUKASIAK: (1959) Acrosclerosis: a disease sui generis or a variety of diffuse scleroderma. Brit. Derm. *71.* 123. — 9. KEINING, E., O. BRAUN—FALCO: (1959) Zur Klinik u. Pathogenese der Skelromyxödems. Acta Derm.-Venereol. (Stockholm) *36.* 37. — 10. KLEMPERER, P.: (1955) General Considerations of Collagen Diseases. Acta Med. Scand. *312.* 261. — 11. KORTING, G. W.: (1958) Dermatologie und Venerologie. Editors: Gottron u. Schönfeld Bd. II/2. 5. 898. — 12. LONGHI, A.: (1954) Contributo allo studio malattir sclerodermica. Nota IV. La situazion vascolare cutanea. Arch. Ital. Derm. *26.* 287. cit: Zbl. Haut- u. Geschlkr. *91.* 337. 1955. — 13. MÁRAMAROSI, GY., NAGY, E.: (1957) Kapillármikroskópos vizsgálatok sclerodermiás betegeken. Börgy. Vener. Szle. *33.* 195. — 14. PAUTRIER, L. M.: (1929) Les rapports de la dermatite chronique atrophiante de l'anetodermie et de la sclerodermie. L'étude des troubles du métabolisme du tissu conjonctif. Bull. Soc. Franc. Derm. Syph. 973. — 15. PEARSON: (1926) Acrodermatitis chronica atrophicans with scleroderma. Arch. Derm. Syph. *13.* 690. — 16. PETRÁNYI, GY.: (1958) Naturgeschichte des Lupus erythematosus und die klinischen

Zusammenhänge der rheumatischen Erkrankungen. Acta Med. Hung. *12.* 85. — 17. PETRÁNYI, GY. : (1958) Cardialis elváltozások a kollagen betegségekben. Orv. Hetil. *99.* 329. — 18. REICH : (1950) Histologische Untersuchungen bei diffuser (progressiver) Sklerodermie, circumscripter Sklerodermie und sklerodermieähnlichen Veränderungen der Acrodermatitis chronica atrophicans. Arch. Derm. Syph. *191.* 505. — 19. ROMHÁNYI, GY. : (1958) Felszólalás a M. D. T. Kollagen-symposiumján. 1957. dec. 20. Bőrgyógy. Vener. Szemle *34.* 150. — 20. RICHTER, W. : (1937) Pseudosklerodermie in Vorlauf der Akrodermatitis chronica atrophicans, in ihrer Stellung zur Sklerodermie. Arch. Derm. Syph. *175.* 123. — 21. SCHWITZER and LAYMAN : (1935) Acrodermatitis chronica atrophicans and scleroderma. Arch. Derm. Syph. (Chicago) *31.* 194 — 22. SCHULTZE, W., E. KURUCZ : (1954) Kritische Bemerkungen zur Panaatrophia Localisata, Derm. Wschr. *133.* 865. — 23. SULZBERGER, M. B. : (1958) Multiple Factors in the Causation of Diseases and the Implications of this Concept for their Understanding and Management. Dermatologica. *117.* 407. — 24. SZODORAY, L. : (1959) Über den Zusammenhang zwischen Sklerodermie und Dermatitis atrophicans. Derm. Wschr. *139.* 653. — 25. WYDROFF, HIGHBERGER cit. by Musso : (1954) A contribution to the pathogenesis of the changes in the collagen ground substance equilibrium in morphea (scleroderma). Brit. J. Derm. *66.* 377. — 26. WORINGER, F. et P., LAUPIER : (1955) L'histologie des sclerodermies. Bull. Soc. franc. Derm. Syph. *64.* 497. 612.

Table 1

Transitions and simultaneous occurrence of collagenous diseases in the same patient
(Review of the literature)

1. *L. erythematodes with sclerodermia:*
   H. L. Arnold: Arch. Derm. *76.* 427. 1957.
   Lutz, W. and U. F. Wartmann: Dermatologica *108.* 451. 1954.
   Sertoli, P.: Mesenchimopatia collagenica polisin. Minerva med. *32.* 241. 1957.
2. *Erythematodes with M. Raynaud and polyarthritis:*
   Sharp, A. A.: Brit J. Derm. *69.* 50. 1957.
3. *Scleroderma with polyarthritis:*
   Zadek: Berl. Klin. Wschr. No. 2. 1917.
4. *Rheumatoid arthritis with L. E. phenomenon:*
   Cohen and Cadman 6 cases, Friedeberg et al. 2 cases, Shearn and Pirovek 4 cases (cit. Talbot H. and R. Ferrandi : Collagen Diseases.
5. *Poikilodermatomyositis with periarteritis nodosa and panniculitis:*
   Manus M. D. and W. E. Wooldridge: Arch. Derm. Syph. (Chicago) *62.* 131. 1950.
6. *Sclerodermatomyositis:*
   Duperrat, B. et coll.: Bull. Soc. fran. Derm. Syph. *62.* 438. 1956.
   Szodoray L. and J. Petrányi: Sclerodermatomyositis with erythematodes see *Petrányi* Orv. Hetil. *99.* 329. 1958.
   Szodoray L.: Dermatomyxomyositis. Demonstrated at the Meeting of the Hungarian Dermatological Society 1958.
7. *Scleropoikilodermatomyositis:*
   Lutz, W. and Wartmann: Dermatologica 108. 452. 1954.
8. *Sclerodermatomyositis with erythaematodes dissemin:*
   Pagel, W. and S. C. Treip: Collagenosis-viscerocutanea. J. Clin. Path. *8.* 1. 1953.
9. *The so called "Panatrophy"*
   Bettley R.: Brit. J. Derm. *62.* 330. 1950.

СКЛЕРОДЕРМИЯ И ЧАСТИЧНАЯ АТРОФИЯ ЭЛАСТИЧЕСКОЙ ТКАНИ КОЖИ (DERMATITIS ATROPHICANS)

Л. СОДОРАИ и П. ДАРОЦИ

1. Картины болезни, относимые в группу коллагеновых заболеваний, нередко показывают переходы. Наряду с прочими аргументами данное явление также объясняет их причисление в одну нозологическую группу.

2. На основе такой классификации становится понятным переплетение процессов склеродермии и частичной атрофии эластичной ткани кожи у одного и того же лица, что впрочем в прежней литературе было предметом обширных дискуссий.

3. Авторы на основе проведенных исследований того мнения, что возникновение склероза или атрофии определяется характером *начальных воспалительных изменений*. Поскольку для воспаления были характерны, главным образом, клеточные инфильтрации, то можно ожидать наступление атрофии. Если, однако, в воспалении играли роль также экссудативные факторы, то возникнет склероз. Данный тезис, повидимому, подкрепляется также исследованиями авторов, проведенными флуорохромированием клеток по методу Хайтингера.

SKLERODERMIE UND DERMATITIS ATROPHICANS

L. SZODORAY und P. DARÓCZY

1. Die in die Gruppe der Kollagenen Erkrankungen gereihten Krankenheitsbilder zeigen häufig Übergänge. Neben anderen Argumenten ist ihre Einordnung in eine nosologische Gruppe auch durch diese Tatsache begründet.

2. Auf Grund dieser Klassifikation wird die Verflechtung der Prozesse von Sklerodermie und Dermatitis atrophicans bei ein und derselben Person, — welcher Umstand im übrigen Gegenstand ausgedehnter Diskussionen in der früheren Literatur bildete — verständlich.

3. An Hand ihrer Versuchsergebnisse sind Verfasser der Meinung, dass die Entstehung von Sklerose oder Atrophie durch den Charakter der einleitenden entzündlichen Veränderungen bestimmt wird. Ist diese Entzündung hauptsächlich von zelliger Infiltration gekennzeichnet, so ist das Auftreten von Atrophie zu erwarten. Spielen dagegen in der Entzündung auch exsudative Faktoren eine Rolle, so wird Sklerose entstehen. Diese Thesen scheinen durch Untersuchungen mittels der Haitingerschen Fluorchrom-Methode eine Bestätigung zu finden.

Prof. Lajos SZODORAY
Dr. Pál DARÓCZY
Debrecen, 12. Bőrklinika, Hungary.

Chaire d'Anatomie et de Chirurgie Opératoire de l'Institut d'Enseignement Supérieur de Médecine et de Pharmacie de Marosvásárhely. (Directeur: prof. T. MAROS)

ALTÉRATIONS DES NERFS PÉRIPHÉRIQUES DÉTERMINÉES PAR DES LÉSIONS MÉCANIQUES

L. LÁZÁR et T. MAROS

(Reçu le 16 mars, 1959)

C'est un fait connu que les nerfs périphériques sont extrèmement sensibles aux lésions mécaniques, nous n'avons néanmoins pas trouvé dans la littérature des données concernant les altérations microscopiques, démontrant des altérations caractéristiques, dues aux lésions mécaniques.

Selon l'opinion générale, les fibres nerveuses réagissent par les mêmes réactions morphologiques aux lésions les plus différentes.

Les fibres nerveuses différenciées en vue de la conduction des excitations ne présentent pas d'altérations morphologiques s'il s'agit de lésions légères, par contre, elles répondent par la dégénération, s'il s'agit de lésions plus importantes, quelle que soit la nature de ces lésions.

Après les influences mécaniques au cours desquelles les éléments de soutien et les éléments nutritifs des nerfs ne sont pas lésés, on ne constate que la dégénérescence des fibres nerveuses. Nous ne pouvons parler dans ces cas de nevrite traumatique, puisqu'il ne s'agit ici que de dégénérescence.

A la suite d'influences mécaniques persistantes, mais légères, ce sont surtout les éléments conjonctifs et le système circulatoire des nerfs qui présentent des altérations, tandis que les fibres restent relativement intactes. Dans ce cas, le problème de nevrite est discutable, même du point de vue de l'histopathologie.

En dépit de ces faits, lors de l'examen microscopique de pièces opératoires humaines, nous avons constaté des altérations des fibres nerveuses qui peuvent être considérées comme conséquence d'influences mécaniques.

Les expériences qui suivent ont été pratiquées dans le but d'étudier l'origine et la nature des altérations observées sur le matériel opératoire humain.

Matériel et méthode d'expérimentation

Nos expériences ont été pratiquées sur 31 chiens, 15 rats blancs, 27 cobayes et 18 lapins. Nous avons comparé les résultats de ces expériences avec les constatations faites lors de l'étude de 26 pièces opératoires et de 5 pièces d'autopsie. Nous avons étudié les altérations de forme et de structure survenant à la suite d'élongations, d'étirements répétés, de compression, d'écrasement, de déchirure et de section du nerf.

Dans une partie de nos expériences nous avons pratiqué l'élongation et la compression directe par des poids (de 25, 50, 100, 500, 1000, 2000) et de 5000 g. suspendus par un fil de soie, les surcharges ayant une durée de 2, 5, 10, 15, 20 et de 30 minutes.

Dans la partie du nerf étant en contact direct avec le fil de soie, nous avons étudié les signes de compression, tandis qu'un peu plus loin, nous avons étudié les conséquences de l'élongation.

Nous avons en plus étudié séparément l'influence de la compression, en reliant le nerf sciatique et les muscles environnants par un coussinet rempli d'air, relié à un manomètre, que nous avons maintenu pendant 3, 5, 8, respectivement 10 heures, sous une pression de 200 mm Hg.

Lors de ces expériences nous avons étudié les conséquences immédiates de ces manipulations et nous avons étudié les altérations réactives ultérieures dans une autre série d'expériences, en étudiant les nerfs d'animaux ayant subi des manipulations identiques et sacrifiées 10 jours plus tard.

En vue de reproduire les états morbides survenant en pathologie humaine, de compressions nerveuses persistantes et d'étirements répétés, nous avons pratiqué des expériences sur des lapins.

Dans une partie des expériences, nous avons relié au muscle biceps femoris le nerf sciatique par une ligature lâche en soie. Dans d'autres cas, nous avons pratiqué des brisures du plexus brachial du lapin à l'aide de lobes musculaires pédonculées. Le degré des étirements répétés, ou de la brisure, variait selon les actions musculaires au cours de la marche.

Nous avons maintenu cet état pendant plusieurs mois et nous avons examiné les altérations des nerfs une fois que les lésions trophiques de l'extrémité correspondante se sont développées.

Nous avons fixé les substances nerveuses excisées dans du formole dilué à 1 pour 4 en moyenne pendant 5 à 30 jours. Nous avons examiné les coupes congelées de 5 à 15 microns avec la technique de coloration de la gaine de myéline, d'impregnation d'argent, d'hématoxyline-éosine et, si cela était nécessaire, par des colorations graisseuses.

Résultats et discussion des résultats

I. Altérations réactives survenantes après élongation et étirements répétés

A) Après étirements énergiques répétés à l'aide de deux pinces vasculaires du nerf sciatique, les fibres nerveuses ne montrent pas d'altération morphologique. Cette constatation n'est pas valable pour la région avoisinante du pincement, où on peut observer les conséquences de la compression. Les fibres nerveuses ne présentent pas d'altérations structurales, même lorsque nous pratiquons des élongations sur le nerf sciatique des animaux d'expériences, avec des poids allant de 25 à 500 gr., pendant 2 à 30 minutes. Nous avons constaté un cas exceptionnel, où le nerf sciatique d'un chien pesant 13 kg 900, s'est rompu au bout de deux minutes, après une surcharge de 5000 gr. Dans ce cas sur une étendue de 4 à 6 mm au-delà de l'extrémité rompue, les fibres nerveuses se sont amincies et étaient finement ondulées. Entre les fibres on peut voir des petites formations, des mottes de formes différentes, s'impregnant intensivement et dont le diamètre varie de 20 à 40 microns. (Fig. N° 1)

Selon notre avis, cet aspect est dû au fait que l'axoplasme comprimé par ses propres gaines pendant l'élongation s'écoule et forme ces mottes, lors de la rupture de la fibre nerveuse.

Nous considérons que les petites ondulations des fibres nerveuses sont dues au fait que les fibres allongées et amincies sous l'influence de la traction ne sont plus capables de se raccourcir lorsque cet effet ne se fait plus sentir.

Nous voulons noter que M. L. Borovski a également constaté ces ondulations fines des fils axiaux aux endroits, où il a pratiqué dans les nerfs des injections de vitamine B_1, sans attacher d'importance à ce phénomène.

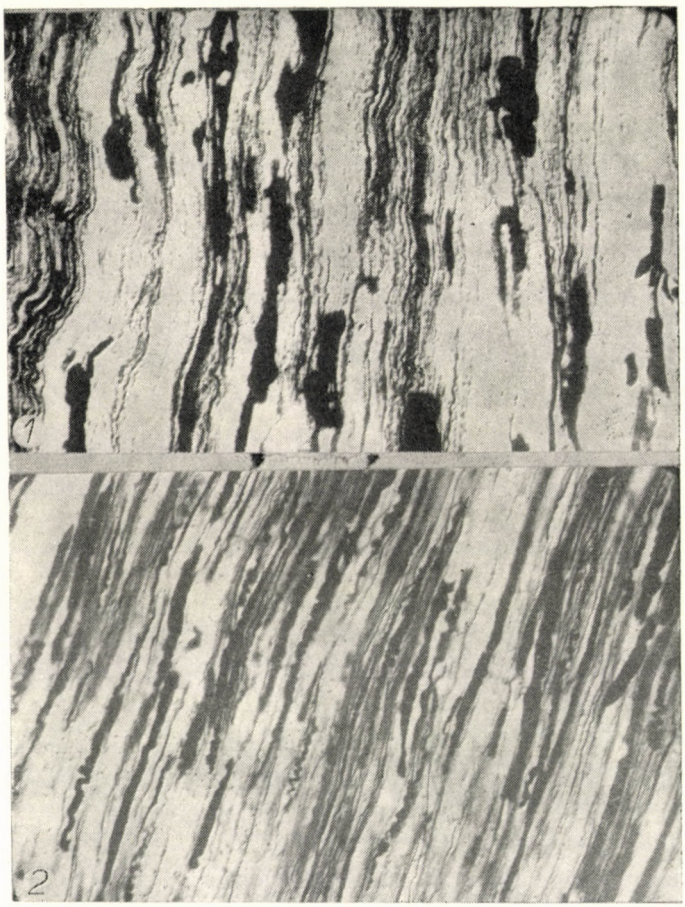


Fig. 1. Chien. Nerf sciatique. Après une surcharge de 5000 g après deux minutes, le moignon central du nerf s'est déchiré. Entre les fils axiaux amincis et finement ondulés, des mottes hyperargentophiles (axoplasme) Impregnation à l'argent, Obj. 24/O,42, Oc. 6 ×

Fig. 2. Chien. Nerf sciatique. Voisinage immédiat du secteur nerveux écrasé. La majorité des fils axiaux sont soit enflés, soit en forme de tire-bouchon. Impregnation à l'argent, Obj. 24/O, 42, Oc. 6 ×

Dans les préparations colorées pour mettre en évidence la gaine de myéline, on constate, en dehors des petites ondulations, l'absence de la structure de ces gaines.

Au-delà de la région décrite, vers le centre, apparaissent sur la gaine des incisures du type Schmidt-Lantermann particulièrement béantes.

Aux mêmes endroits, les fils axiaux présentent des enflures régulières et des parties amincies qui alternent.

Dans le stroma du nerf on ne constate aucune altération notable en dehors de petites hémorragies.

B) La charpente conjonctive des fibres et du nerf n'a montré d'altérations morphologiques considérables, même lorsque en répétant les expériences mentionnées, nous avons laissé le nerf, qui a subi l'élongation, dans l'organisme pendant 10 jours. Cette constatation n'est valable que pour la partie du nerf situé vers le centre, au-delà du lien de la surcharge, car au lieu même où sont accrochés les poids, et plus bas, vers la périphérie, on voit apparaître les signes consécutifs de la compression.

C) Dans nos expériences de longue durée, où nous avons soumis les nerfs (plexus brachial, nerf sciatique) à un effet dynamique non mesuré, nous avons constaté des altérations qui peuvent être expliquées par la compression. Nous les décrirons plus loin.

En nous basant sur ces faits, nous sommes d'avis que, l'élongation et les étirements répétés, (surtout s'il sont de courte durée) ne lèsent pas les fibres nerveuses, jusqu'à ce que la charpente conjonctive du nerf amortit l'influence subie.

II. Altérations survenantes sous l'influence de la compression

A) La simple préhension du nerf à l'aide d'un instrument peut avoir comme conséquence l'ouverture des incisures de Schmidt—Lantermann, ainsi que l'apparition des enflures à répétition régulière des fils axiaux dans les couches superficielles en contact avec l'instrument.

Sous l'influence du serrement et de l'écrasement apparaît l'amincissement extrême des fibres nerveuses, ainsi que leur fine ondulation. A ces endroits on ne peut souvent même pas mettre en évidence la gaine de myéline.

Dans le voisinage de la partie écrasée, la gaine de myéline est enflée, dépourvue de structure, sa coloration est foncée.

Les fils axiaux sont enflés et rapellent souvent la forme d'un tire-buchon (Fig. N° 2). Les hémorragies des nerfs sont de règle lors de l'écrasement et fréquentes, lorsque la préhension est brutale.

Sous l'influence de la compression indirecte à l'aide d'un tourniquet, dans les nerfs d'extrémités humaines réamputées, nous n'avons pas constaté d'altérations morphologiques.

Nous avons fait des constatations identiques sur nôtre matériel d'expérience, lorsque nous avons soumis le nerf sciatique entouré de ses muscles environnants, 3, 8, ou 10 heures, sous une pression de 200 mm Hg. En main-

tenant la pression pendant 10 heures, nous avons constaté dans les couches superficielles du nerf des fibres ondulées, ainsi que, par-ci, par-là, des hémorragies.

On voit les mêmes altérations dans les couches superficielles, que l'on constate lors de la préhension et le serrement du nerf lorsqu'on le soumet

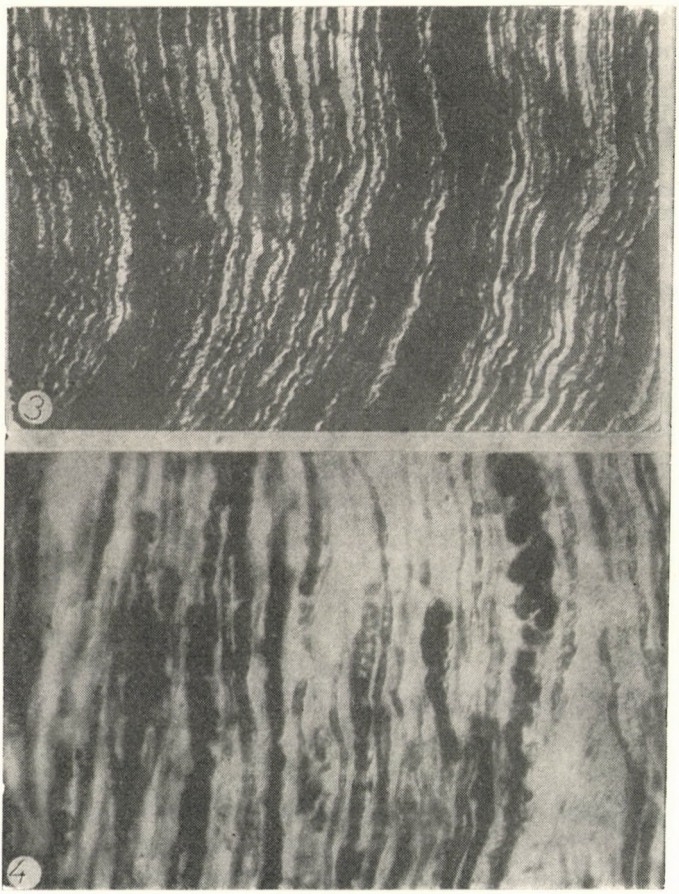


Fig. 3. Cnien. Nerf sciatique. Couche superficielle du nerf ayant subi une surcharge avec 50 g pendant 30 minutes. On voit la fine ondulation des fils axiaux. Impregnation à l'argent, Obj. 24/O,42, Oc. 6s.

Fig. 4. Racine de moelle épinière humaine (compression par spondylite). La gaine médullaire sombrement colorée s'est fragmentée en boules inégales. Coloration de la gaine médullaire. Obj. 24/O,42, Oc. 6 ×

à une surcharge de 50 g pendant 30 minutes (Fig. N° 3). Lorsqu'on surcharge le nerf avec un poids plus grand, pendant un temps plus prolongé, on voit apparaître les mêmes altérations morphologiques, que lors de l'écrasement.

Le degré et l'étendue des altérations sont directement proportionelles avec l'intensité et la durée de la surcharge.

Après une surcharge avec un poids de 500 g. et d'une durée de 10 minutes, le nerf subit (chez le chien) un écrasement transversal total.

B) Lorsqu'après la répétition des mêmes expériences, nous laissons pendant 10 jours dans l'organisme le nerf comprimé, on voit apparaître, — — suivant le degré de la surcharge — une lésion partielle, ou transversale totale du nerf, ainsi que la dégénérescence secondaire de la partie périphérique. Ainsi, après une surcharge avec 50 g d'une durée de 30 minutes, on voit apparaître dans les couches superficielles de la partie périphérique de la dégénérescence secondaire des fibres, dégénérescence, qui ne touche pas les fibres minces. Avec une surcharge de 500 g pendant 10 minutes, on voit apparaître (chez le chien) l'aspect morphologique de la lésion transversale totale du nerf. Avec une surcharge de 100 g pendant 20 minutes (chez le chien) au lieu même, où l'effet de compression du fil de soie a agi sur les couches superficielles, on ne peut mettre en évidence ni gaine de myéline, ni fil axial. Plus profondément il n'y a que des fibres tout à fait minces, dépourvues de gaine de myéline. A l'intérieur du nerf — entre les fibres minces, semblant intactes et entourées de gaines, — la gaine des fibres épaisses se présente sous la forme de fragments de boules.

Du côté opposé de la compression on ne constate aucune altération pathologique des fibres nerveuses.

On peut constater sur toute l'épaisseur du nerf une congestion sanguine, ainsi que la multiplication des éléments cellulaires. Aux endroits, où les fibres présentent des altérations, la prolifération des cellules de Schwann est remarquable. Au delà de la compression, vers la périphérie, on voit apparaître l'aspect typique de la dégénérescence du type Waller.

C) Dans nos expériences reproduisant les tableaux pathologiques de la compression survenant en pathologie humaine, nous avons pu observer les conséquences de compressions non mesurées persistantes pendant plusieurs mois.

Ainsi, contrairement à nôtre attente, dans l'expérience modèle du syndrome de scalène, nous n'avons trouvé que des altérations insignifiantes des fibres nerveuses. Par contre, nous avons constaté une multiplication importante du tissu conjonctif, traduit également par le relâchement des fibres nerveuses.

L'hyperplasie du tissu conjonctif endoneural et l'élargissement de l'espace périneurale sont surtout marqués à la partie périphérique.

Au lieu même de la cassure l'espace périneurale disparaît, le tissu conjonctif épineural se multiplie et des microneuromes apparaissent.

Au de là de ce point, vers le centre, mais encore plus vers la périphérie, nous constatons la dégénérescence des fibres épaisses.

Nous avons trouvé des altérations semblables aussi dans ces cas, où nous avons pratiqué des étirements répétés persistants du nerf sciatique, à l'aide d'une ligature lâche.

Dans ces cas, au lieu même des étirements, nous avons trouvé uniquement des fibres minces intactes et, vers le centre et distalement, un grand nombre de fibres épaisses dégénérées.

La multiplication des cellules de Schwann est plus prononcée dans la partie distale du nerf, correspondant à la désagrégation plus intense de la fibre nerveuse.

D) Lors de l'étude du matériel opératoire humain nous avons trouvé en dehors de ces altérations, dans tous les cas de compression persistante, des altérations de la gaine de myéline, altérations, que nous n'avons pas pu reproduire expérimentalement. La plus caractéristique de ces altérations est la désagrégation de la gaine de myéline épaissie en boules inégales, de couleur foncée, boules, qui ne sont pas identiques avec les boules de myéline, secondaires et apparaissant lors de la dégénérescence retrograde (Fig N° 4). Nous avons observé ces altérations à des endroits, où, sous l'effet de la compression persistante, la circulation du sang et de la lymphe était rendue difficile. (Dans un cas de sarcome du plexus brachial, dans plusieurs cas de compressions radiculaires et dans de nombreux cas de névromes englobés de cicatrices.)

Nous sommes d'avis, que dans ces cas, la désassimilation de la myéline, désagrégée en boules, est entravée.

III. *Altérations survenant lors de la section du nerf*

A la suite de la section du nerf par une lame de rasoir bien tranchante, nous n'avons constaté sur le nerf aucune altération importante.

Après section à l'aide de ciseaux, ou d'autres instruments à effet concasseur, on voit sur le plan de la section des gaines de myéline barbouillées et des débris d'axoplasme.

Dans le voisinage immédiat du plan de section, les fibres s'amincissent et éventuellement deviennent finement ondulées et des mottes de neuroplasme apparaissent par endroits. A ces mêmes endroits, les fils axiaux en tire-bouchon sont fréquents.

Dans le mince secteur qui suit, on voit des gaines de myéline enflées, se colorant de couleurs foncées, puis, sur un secteur de quelques millimètres apparaissent des incisures de Schmidt—Lantermann béantes, même lorsque ces phénomènes ne peuvent être observés sur les autres parties du nerf (Fig. N° 5). Correspondant à ce phénomène, des enflures régulières apparaissent sur les fils axiaux, qui manquent également sur les autres parties du nerf (Fig. N° 6).

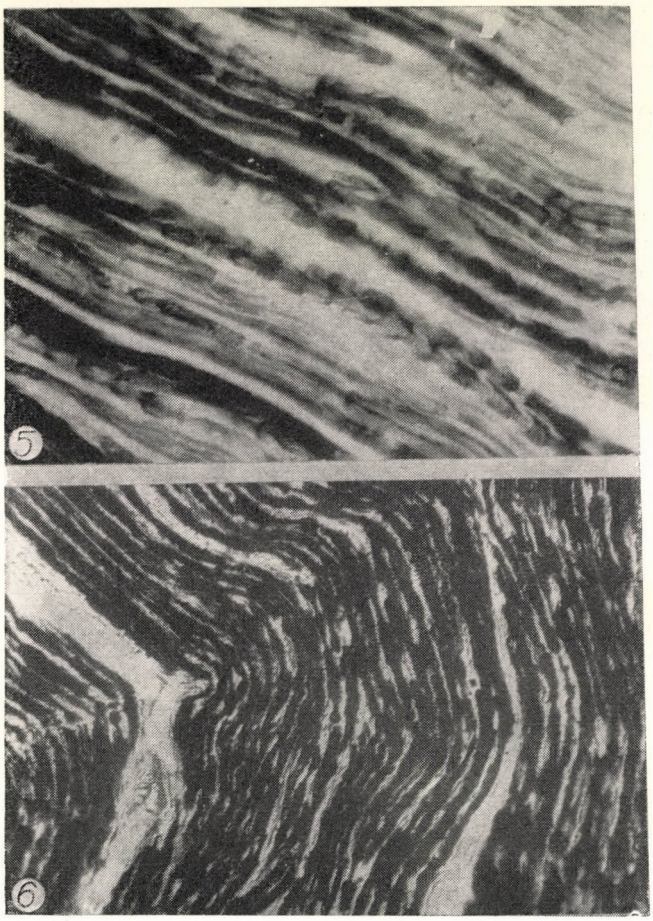


Fig. 5. Racine de moelle humaine au voisinage de la section. Les incisures de Schmidt-Lantermann sont remarquablement entrouvertes. Coloration de la gaine de myéline. Obj. 24/O,42, Oc. 6 ×

Fig. 6. Racine de moelle humaine, au voisinage de la section. Les enflures régulières des fils axiaux se répètent. Impregnation au nitrate d'argent, Obj. 24/O,42, Oc. 6 ×

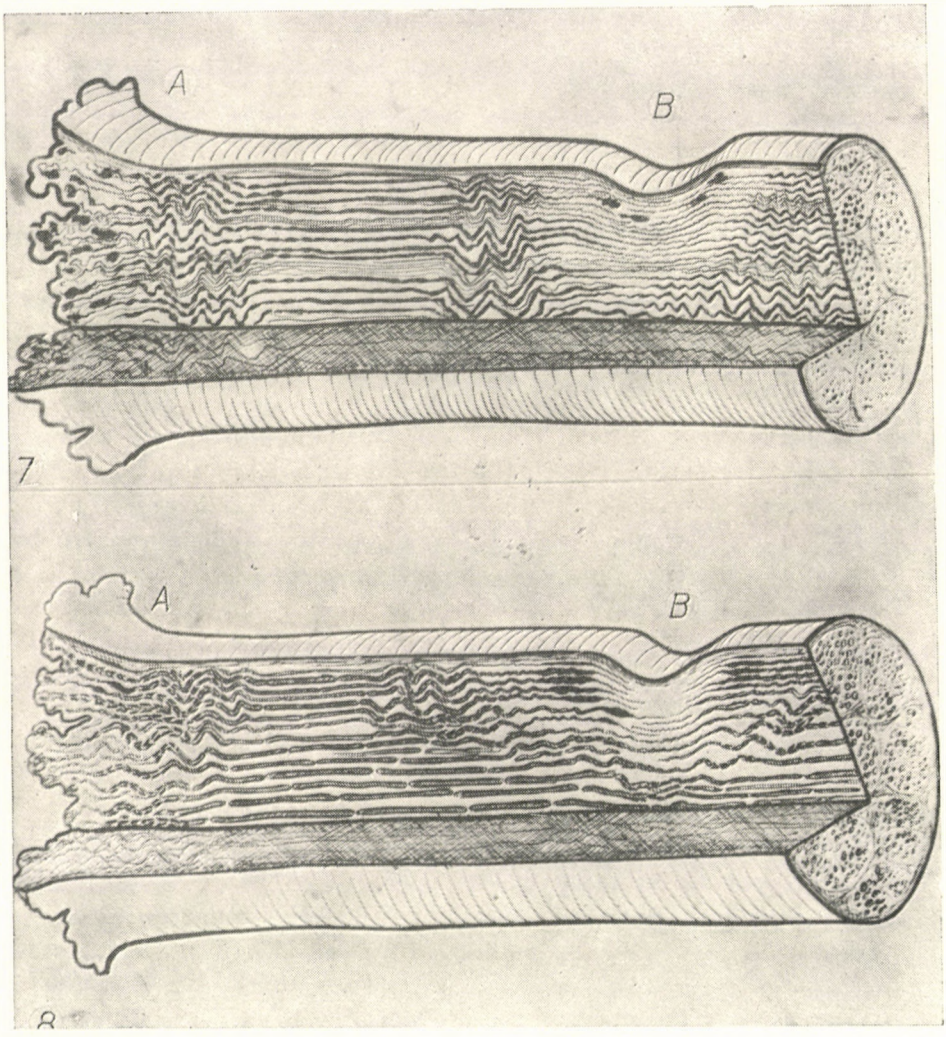


Fig. 7. Le dessin représente la localisation des altérations des fils axiaux, survenant immédiatement sous effet d'influences mécaniques. A = extrémité du nerf sectionné à l'aide d'un instrument concasseur. B = localisation de l'effet compresseur d'un poids suspendu par un fil de soie

Fig. 8. Le dessin représente la localisation des altérations de la gaine de myéline, survenant immédiatement sous effet d'influences mécaniques. A = extrémité du nerf sectionné à l'aide d'un instrument concasseur. B = localisation de l'effet compresseur d'un poids suspendu par un fil de soie

Conclusions

1. Les altérations morphologiques n'apparaissent sur les fibres nerveuses, — à la suite de l'élongation et des étirements répétés, — que si la charpente et l'enveloppe conjonctives du nerf sont déjà lésées à la suite de l'élongation.

2. Lorsque les fibres nerveuses se rompent à la suite de l'élongation, le neuroplasme des fibres, — qui sont fortement amincies et qui présentent des petites ondulations — s'écoule, et forme des mottes, qui, lorsqu'on les colore, s'imprègnent de couleurs foncées.

3. Les fibres nerveuses sont incomparablement plus sensibles à la compression, car la charpente conjonctive du nerf ne peut amortir cet effet, par contre les fibres nerveuses résistent beaucoup mieux à l'élongation.

4. L'amincissement des fibres nerveuses et l'apparition des fines ondulations sont caractéristiques pour les influences mécaniques.

5. La désagrégation de la gaine de myéline en boules qui prennent une coloration foncée, est caractéristique de la compression persistante.

6. La compression persistante légère a pour conséquence un trouble de la circulation des nerfs, ainsi qu'un bouleversement de son système conjonctif, même si on ne peut mettre en évidence de la part des fibres nerveuses d'altérations notables.

7. L'élongation altère moins l'unité de la structure nerveuse que la compression. Tandis qu'à la suite d'une élongation avec un poids de 5000 g pendant 10 minutes, aucune altération ne peut être démontrée sur le secteur central, après une compression de 10 minutes avec 50 gr., des altérations morphologiques apparaissent sur la couche superficielle du nerf.

8. La béance des incisures de Schmidt—Lanterman s'explique dans la plupart des cas par des influences mécaniques.

9. Les incisures béantes de Schmidt—Lantermann apparaissent au même endroit, où on voit également les enflures régulièrement répétées des fils axiaux.

10. Les fibres minces, surtout celles qui sont dépourvues de gaine de myéline, résistent beaucoup mieux aux influences mécaniques, que les fibres épaisses, possédant des gaines médullaires.

Résumé

Les auteurs, lors de l'étude microscopique du matérial opératoire, ont observé des altérations qu'ils considèrent comme étant caractéristiques des influences mécaniques. Dans la présente publication ils font connaître la série de leurs expériences, qui prouvent l'origine mécanique de ces altérations. Ils constatent que l'amincissement et les fines ondulations des fibres nerveuses sont caractéristiques des influences mécaniques aigues. Lors de la rupture, après élongation, des fils axiaux, des mottes d'axoplasme apparaissent. Le système conjunctif amortit les effets de l'élongation et des étirements répétés, de sorte, que le parenchyme du

nerf n'est pas touché. En l'absence d'une telle protection, les fibres nerveuses s'altèrent plus facilement lors de la compression. La compression faible, mais persistante et répétée détermine des troubles circulatoires et déclenche une réaction du tissu conjonctif, même si les fibres ne présentent aucune altération morphologique considérable. La béance des incisures de Schmidt-Lantermann de la gaine de myéline apparaît le plus souvent sous l'influence d'effets mécaniques, en même temps que les enflures à répétition régulière des fils axiaux. Les fibres épaisses pourvues de gaines de myéline sont plus sensibles aux influences mécaniques, et s'altèrent plus rapidement que les fibres minces.

BIBLIOGRAPHIE

1. Боровский, М. Л.: (1952) Реандрация нерва и трофика. Изд. А. М. Н. СССР. Москва. — 2. Дойников, Б. С.: (1953) Общая гистология и гистопатология периферической нервной системы. Избр. труды по неироморфол. и неиропатол. — 3. Графова, Г. Й.: (1957) Реактивные изменения нервных елементов системы спинного мозга при повреждениах. Арх. Анат., гистол. и ембриол. 1. *34.*, 67—78. — 4. Lubarsch, O., Henke, F., Röszle, R.: (1955) Handbuch der speziellen Pathol. Anat. und Histol. Vol. XIII. 5. Springer, Berlin.

ИЗМЕНЕНИЯ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НЕРВОВ, ВЫЗВАННЫЕ МЕХАНИЧЕСКИМИ ПОВРЕЖДЕНИЯМИ

Л. ЛАЗАР и Т. МАРОШ

При микроскопическом изучении полученного в ходе операций материала, авторы наблюдали такие изменения, которые по их мнению типичны для механических повреждений. В настоящем сообщении они дают описание опытов, которые подтверждают механическое происхождение этих изменений. Они устанавливают, что для острого механического воздействия характерно утоншение нервных волокон и их тонкая волнистость.

При обусловленном растяжением разрыве осевых цилиндров появляются аксоплазматические глыбки. Удлиняющие и растягивающие действия воспринимаются соединительнотканной системой нерва, и следовательно паренхима нерва не повреждается. Однако, вследствие отсутствия данной защиты при сдавлении, нервные волокна легче повреждаются.

Повторяющееся продолжительное слабое сдавление нерва вызывает растройства кровообращения и реакцию соединительной ткани даже в том случае, когда волокна не показывают значительных морфологических изменений.

Раскрытие Шмидт-Лантерманновых надрезок миэлиновых оболочек появляется, в большинстве случаев, в результате механических воздействий совместно с регулярно повторяющимся набуханием осевых цилиндров.

Толстые миэлиновые волокна более чувствительны к механическим воздействиям и легче повреждаются, чем тонкие волокна.

DIE DURCH MECHANISCHE LÄSIONEN BEDINGTEN VERÄNDERUNGEN DER PERIPHEREN NERVEN

L. LÁZÁR und T. MAROS

Bei der mikroskopischen Untersuchung von Operationsmaterial wurden Veränderungen beobachtet die als typisch für mechanische Schädigungen angesehen werden.

In der vorliegenden Mitteilung wird eine Versuchsserie veröffentlicht, die den mechanischen Ursprung der Veränderungen bestätigt. Es wird festgestellt, dass für die akute mechanische Einwirkung eine Verdünnung und feine Welligkeit der Nervenfasern kennzeichnend ist.

Bei den durch Dehnung bedingten Rissen der Achsenzylinder erscheinen Axoplasmaschollen. Die Dehn- und Streckwirkungen werden von dem Bindegewebssystem der Nerven aufgefangen und auf diese Weise erfolgt keine Schädigung des Nervenparenchyms. Hingegen

werden die Nervenfasern im Falle von Kompression infolge des Fehlens eines solchen Schutzes leichter beschädigt.

Eine wiederholte anhaltende schwache Kompression verursacht Kreislaufstörungen und löst Bindegewebsreaktionen aus, selbst in dem Falle, wenn die Fasern keine wesentlichen morphologischen Veränderungen aufweisen.

Die Öffnung der Schmidt-Lantermannschen Einkerbungen der Markscheide erfolgt in der Mehrzahl der Fälle auf mechanische Einwirkungen, gemeinsam mit den regelmäßig sich wiederholenden Anschwellungen der Achsenzylinder.

Die dicken markhaltigen Fasern sind mechanischen Einwirkungen gegenüber viel empfindlicher und ihre Beschädigung erfolgt schneller, als die der dünnen Fasern.

Dr. László LÁZÁR
Prof. Tibor MAROS
Tîrgu-Mureş, Str. Universităţii 38. Romînia

A kiadásért felel az Akadémiai Kiadó igazgatója Műszaki felelős: Farkas Sándor
A kézirat nyomdába érkezett: 1959. X. 14. — Terjedelem: 9,75 (A/5) ív, 79 ábra (35 színes), 10 melléklet

1960/50130 — Akadémiai Nyomda, Budapest — Felelős vezető: Bernát György

The Acta Morphologica publish papers on experimental medical subjects in English German, French and Russian.

The Acta Morphologica appear in parts of varying size, making up volumes.

Manuscripts should be addressed to:

Acta Morphologica Budapest IX., Tűzoltó u. 58.

Correspondence with the editors and publishers should be sent to the same address.

The rate of subscription to the Acta Morphologica is 110 forint a volume. Orders may be placed with "Kultura" Foreign Trade Company for Books and Newspapers (Budapest VI. Népköztársaság útja 21. Account No. 43-790-057-181) or with representatives abroad.

Les Acta Morphologica paraissent en français, allemand, anglais et russe et publient des travaux du domaine des sciences médicales expérimentales.

Les Acta Morphologica sont publiés sous forme de fascicules qui seront réunis en volumes.

On est prié d'envoyer les manuscrits à l'adresse suivante:

Acta Morphologica, Budapest IX., Tűzoltó u. 58.

Toute correspondance doit être envoyée à cette même adresse.

Le prix de l'abonnement est de 110 forints par volume.

On peut s'abonner à l'Entreprise du Commerce Extérieur de Livres et Journaux «Kultura» (Budapest, VI., Népköztársaság útja 21. Compte-courant No. 43-790-057-181) ou à l'étranger chez tous les représentants ou dépositaires.

«Acta Morphologica» публикуют трактаты из области экспериментальных медицинских наук на русском, немецком, английском и французском языках.

«Acta Morphologica» выходят отдельными выпусками разного объема. Несколько выпусков составляют один том.

Предназначенные для публикации авторские рукописи следует направлять по адресу:

Acta Morphologica, Budapest IX., Tűzoltó u. 58.

По этому же адресу направлять всякую корреспонденцию для редакции и администрации.

Подписная цена «Acta Morphologica» — 110 форинтов за том. Заказы принимает предприятие по внешней торговле книг и газет «Kultura» (Budapest VI., Népköztársaság útja 21. Текущий счет № 43-790-057-181) или его заграничные представительства и уполномоченные.

30,— Ft

INDEX

MORPHOLOGIA NORMALIS ET EXPERIMENTALIS

Smirnova, S. N.: Changes of the Nerve Cells in the Human Fascicular, Gasserian and Spinal Cervical Ganglia in the Extrauterine Life, Related to Age. — *Смирнова, С. Н.:* Возрастные изменения нервных клеток пучковидного, Гассерова и шейных спинномозговых узлов у человека после рождения 133

Bogdanow, K. P.: Der Ductus thyreoglossus und seine Derivate in der postnatalen Periode (Anatomie und Syntopie) — *Богданов, К. П.:* Ductus thyreoglossus и его дериваты в постнатальном периоде (Анатомия и синтопия) 143

Hámori, J.: Gewebsreaktionen und Funktionsänderungen des Hypophysenmittellappens der Albinoratte nach Hypothalamus- und Hypophysenstiellăsion. — *Хамори, Й.:* Тканевые реакции и изменения функции средней доли гипофиза у белых крыс после повреждения гипоталамуса и ножки гипофиза 155

Mindubajew, J. Ch.: Morphologie des Nervus vagus und seiner Verzweigungen bei Wiederkäuern. — *Миндубаев, Ю. Х.:* Морфология блуждающих нервов и их разветвлений у жвачных 161

Horváth, L.: Some Data Concerning the Submicroscopic Morphology of Mast Cells. II. — *Хорват, Л.:* Данные к субмикроскопической морфологии тучных клеток. II. 179

Csaba, Gy.—Törő, I.—Ács, T.—Kiss, F. I.: The Behaviour of the Thymus in Conditions Associated with Tissue Proliferation. — *Чаба, Дь.—Тёрё, И.—Ач, Т.—Киш, Ф.:* Поведение зобной железы в состояниях, сопровожденных разрастанием ткани 187

Csaba, Gy.—Törő, I.—Kapa, E.: Provoked Tissue Reaction of the Thymus in Tissue Culture. — *Чаба, Дь.—Тёрё, И.—Капа, Э.:* Искусственно вызванная тканевая реакция зобной железы в тканевых культурах 197

PATHOLOGIA

Gáspárdy, G.—Nemeskéri, J.: Paleopathological Studies on Copper Age Skeletons Found at Alsónémedi. — *Гашпарди, Г.—Немешкери, Я.:* Результаты палеопатологических исследований скелетов из медного века, обнаруженных при раскопках в Алшонемеди (Пецельская культура) 203

Szodoray, L.—Daróczy, P.: Correlations between Scleroderma and Dermatitis atrophicans. — *Содораи, Л.—Дароци, П.:* Склеродермия и частичная атрофия эластической ткани кожи (dermatitis atrophicans) 221

Lázár, L.—Maros, T.: Altérations des nerfs périphériques déterminées par des lésions mécaniques. — *Лазар, Л.—Марош, Т.:* Изменения периферических нервов, вызванные механическими повреждениями 233

1538

ACTA MORPHOLOGICA

ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE

ADIUVANTIBUS
J. BALÓ, K. FARKAS, L. HARANGHY, B. KELLNER, J. SZENTÁGOTHAI

REDIGIT
I. TÖRŐ

TOMUS IX FASCICULI 3–4

AKADÉMIAI KIADÓ BUDAPEST

1960

ACTA MORPHOLOGICA

A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA ORVOSTUDOMÁNYI KÖZLEMÉNYEI

SZERKESZTŐSÉG ÉS KIADÓHIVATAL: BUDAPEST V., ALKOTMÁNY UTCA 21.

Technikai szerkesztők:
Dr. Kiszely György és Dr. Somogyi Endre

Az Acta Morphologica német, angol, francia és orosz nyelven közöl értekezéseket a kísérletes orvostudomány tárgyköréből.

Az Acta Morphologica változó terjedelmű füzetekben jelenik meg. Több füzet alkot egy kötetet.

A közlésre szánt kéziratok a következő címre küldendők:

Acta Morphologica, Budapest IX., Tűzoltó u. 58.

Ugyanerre a címre küldendő minden szerkesztőségi és kiadóhivatali levelezés.

Az Acta Morphologica előfizetési ára kötetenként belföldre 80, külföldre 110 Ft. Megrendelhető a belföld számára az Akadémiai Kiadónál (Budapest V., Alkotmány utca 21. Bankszámla 05-915-111-46), a külföld számára pedig a »Kultúra« Könyv- és Hírlap Külkereskedelmi Vállalatnál (Budapest VI., Népköztársaság útja 21. Bankszámla: 43-790-057-181), vagy annak külföldi képviseleteinél és bizományosainál.

Die Acta Morphologica veröffentlichen Abhandlungen aus dem Bereiche der experimental-medizinischen Wissenschaften in deutscher, englischer, französischer und russischer Sprache.

Die Acta Morphologica erscheinen in Heften wechselnden Umfanges. Mehrere Hefte bilden einen Band.

Die zur Veröffentlichung bestimmten Manuskripte sind an die folgende Adresse zu senden:

Acta Morphologica, Budapest IX., Tűzoltó u. 58.

An die gleiche Anschrift ist auch jede für die Schriftleitung und den Verlag bestimmte Korrespondenz zu richten.

Abonnementspreis pro Band: 110 Forint. Bestellbar bei dem Buch- und Zeitungs-Außenhandels-Unternehmen »Kultura« (Budapest VI., Népköztársaság útja 21. Bankkonto Nr: 43-790-057-181) oder bei seinen Auslandsvertretungen und Kommissionären.

Institut für pathologische Anatomie der Universität in Cluj, Rumänische Volksrepublik

EXPERIMENTELLE BEITRÄGE ZUM PROBLEM DER ALKALISCHEN LEBERPHOSPHATASE

A. Rosenberg, I. Schächter und V. Daghie

(Eingegangen am 25. März 1959)

Die Bestimmung der alkalischen Phosphatase (AP) ist eine wertvolle Methode zur Beurteilung der Leberfunktion, besonders aber zur Differenzialdiagnose der verschiedenen Formen von Gelbsucht. Trotzdem wird sie seltener benützt als die anderen üblichen Leberfunktionsteste. Dies hat seinen Grund darin, dass weder der Ursprung der AP noch die diesbezügliche Rolle der Leberzellen völlig geklärt sind. Dasselbe trifft auch für die Bedeutung der histochemisch bestimmten AP der Leber zu.

Die AP ist das einzige Ferment, welches durch die Galle ausgeschieden wird. Nach einigen Autoren stammt es aus dem Blutserum und wird über die Leber bzw. Galle in den Darm ausgeschieden. Für diese Annahme sprechen mehrere Tatsachen: Normalerweise findet man AP nur in den Kupfferschen Sternzellen und im Epithel der Gallenwege. Nach intravenöser Verabreichung wird die AP mit der Galle ausgeschieden. Nach Choledochusligatur steigt ihre Menge in Leber und Serum an (Freeman). Die AP ist in der Leber bei epidemischer Hepatitis vermehrt. Sie fehlt im acholischen Stuhl während sie im normalen Stuhl vorhanden ist.

Andere Tatsachen dagegen sprechen für einen intrahepatischen Ursprung dieses Fermentes. So fand Sulkin nach Leberresektion ein Ansteigen der AP in der Regenerationsleber und Koch—Weser und Mitarbeiter stellten AP in den Leberzellen von mit Tetrachlorkohlenstoff behandelten Tieren fest.

Schliesslich gibt es auch Beobachtungen, die weder mit der exkretorischen Theorie, noch mit der Annahme eines intrahepatischen Ursprunges des Fermentes in Einklang gebracht werden können: Z. B. dass die Menge der AP bei eiweissarmer Ernährung, bzw. Hungerzustand im Serum und in der Leber zunimmt, während in den normalen Leberzellen kein AP nachzuweisen ist.

Um einen weiteren Einblick in dieses Problem zu gewinnen, haben wir die AP bei einer Versuchsanordnung verfolgt, wo die normalen Zusammenhänge zwischen Blut und Gallenzirkulation blockiert wurden. In dieser Versuchsreihe wollten wir eine Antwort auf die Frage bekommen, ob die AP in den Leberzellen nachzuweisen ist oder nicht. In einer weiteren Versuchsreihe verwendeten wir nach der Technik von Koch und Mitarbeiter Tetrachlor-

kohlenstoff, um das Erscheinen der AP in den Leberzellen hervorzurufen, und feststellen zu können, ob nach Leberzellenblockade die AP in den Zellen erscheint. Das erste Ergebnis würde für einen zellulären, das zweite für einen hämatogenen Ursprung des Fermentes sprechen.

Material und Methode

Im Experiment wurden insgesamt 50 weisse erwachsene Ratten von einem Körpergewicht von 100—250 g verwendet. Die Tiere wurden in drei Versuchsgruppen eingeteilt.

I. Gruppe: 20 Tiere mit Tetrachlorkohlenstoff-Hepatitis.
II. Gruppe: 10 Tiere mit Lithiumkarmin-Blockade.
III. Gruppe: 20 Tiere mit Tetrachlorkohlenstoff-Hepatitis und gleichzeitiger Lithiumkarmin-Blockade.

Um die Veränderungen der Leber dynamisch verfolgen zu können, wurden die Tiere je nach dem bei der jeweiligen Gruppe verfolgten Ziele, binnen 2—3 Wochen in Abständen von 1—2 Tagen durch Dekapitieren getötet.

Die AP wurde mit der von *Hoffmann—Epstein* modifizierten Methode von *Gomori* nachgewiesen. Daneben untersuchten wir auch Thymo- und Ribonukleinsäure, Eisen, Glykogen, die Kollagenen und die retikulären Phasern.

Befunde

Bei den Versuchstieren der ersten Gruppe haben wir wie KOCH und Mitarbeiter mit einer einzigen subkutanen Dosis von 0,1 ml Tetrachlorkohlenstoff pro 20 g Körpergewicht eine experimentelle Hepatitis ausgelöst. Die für Hepatitis charakteristischen Veränderungen, d. h. periportale polyblastische Infiltrate, Auflockerung der lobulären Struktur, runde volle »Korbzellen«, zentrilobuläre Miniatürnekrosen wurden regelmässig vorgefunden. — In der dritten Woche erfolgte eine praktisch vollkommene Restitution in allen untersuchten Tieren mit der der Ausnahme von zwei die noch periportale Infiltrate aufwiesen.

Ohne auf das Verhalten der anderen histologisch und histochemisch verfolgten Komponenten (Lipoide, Mukopolysaccharide, Nukleinsäure, Gitterfaser usw.) einzugehen, können wir die die AP betreffenden Befunde folgendermassen zusammenfassen. Im Gegensatz zu den normalen Tieren, bei denen die AP nur in den Kupfferschen Sternzellen und im Epithel der Gallenwege doch nie in den Leberzellen zu finden ist, fanden wir bei den Tieren unserer Versuchsreihe am zweiten bis vierten Tag, d. h. zur Zeit der stärksten Ausbildung der beschriebenen Veränderungen eine stark positive AP-Reaktion in den periportalen und perizentrilobulären Leberzellen sowie auch in den portalen Gefässwänden. Eine Ausnahme bildeten nur die zwei erwähnten Tiere mit residualen Infiltraten. Bei diesen zeigten aber die Infiltratzellen eine intensive Reaktion. Unsere Feststellungen bestätigen also in grossen Zügen die Befunde von KOCH und Mitarbeiter.

Bei den Tieren der zweiten Versuchsgruppe wurde mit der Methode von ROMEIS durch Lithiumkarmin eine praktisch vollkommene intravitale

Blockade erreicht. Die Tiere wurden innerhalb von 11 Tagen untersucht. Wir fanden, dass die Kupfferschen Sternzellen eine umso schwächere positive AP-Reaktion zeigten, je mehr Karmingranula sie enthielten. Dagegen zeigten die schwach oder nicht blockierten Sternzellen eine starke AP-Reaktion. Die phosphatase-positiven Zellen waren entweder an den Wänden der Sinusoide fixiert oder wurden mobil und gerieten in das Lumen der Kapillaren, wo sie eine ovale oder zackige Form annahmen. Sie waren auch merklich vergrössert. Wir möchten hervorheben, dass die Leberparenchymzellen zwar bedeutende Veränderungen (Glykogen, Nukleinsäuren, Eisen) aber niemals eine positive AP-Reaktion aufwiesen.

Die Tiere der dritten Versuchsgruppe wurden zuerst mit Lithiumkarmin blockiert und nachher mit Tetrachlorkohlenstoff behandelt. Trotz der Blockade erschienen die oben beschriebene für Hepatitis charakteristische Veränderungen. Diese Veränderungen waren bei den blockierten Tieren jedoch viel schwächer als bei den nicht blockierten. Anscheinend wurden weniger Leberzellen und auch diese in geringerem Masse geschädigt. Auch der Regenerationsprozess war dementsprechend weniger aktiv.

Die AP-Reaktion ergab dieselben Befunde wie bei den Tieren mit Blokkade aber ohne Tetrakohlenstoff-Behandlung. Die vollkommen blockierten Sternzellen gaben überhaupt keine Reaktion, die schwach blockierten Zellen eine schwache und die nicht blockierten fixen oder mobilisierten Kupfferzellen eine starke Reaktion. In den Leberzellen konnte keine AP nachgewiesen werden. Eine einzige Ausnahme bildete ein Tier, welches einen Tag nach der Tetrachlorkohlenstoff-Injektion untersucht wurde; bei diesem wiesen die peripheren Leberzellen eine ausgesprochene und das Epithel der Gallenwege eine im Vergleich zu den anderen Versuchstieren schwächere Reaktion auf.

Die histochemischen Veränderungen waren im grossen und ganzen dieselben wie bei den anderen Versuchsgruppen, nur war in den Leberzellen der Glykogenschwund geringer.

Besprechung

Der Vergleich der AP-Reaktion bei den beschriebenen Versuchsgruppen erlaubt gewisse Schlüsse zu ziehen hinsichtlich des Verhaltens der AP unter verschiedenen vaskulobilären Bedingungen. Aus der Tatsache, dass nach Blokkade sowohl mit gleichzeitiger wie auch ohne Tetrachlorkohlenstoff-Verabreichung, d. h. im Falle einer sozusagen physiologischen Sperre zwischen Blut- und Gallenzirkulation, das Ferment in den Leberzellen nicht nachzuweisen war, schliessen wir, dass es nicht in den Leberzellen gebildet wird. Für diese Auffassung sprechen auch die klinischen Beobachtungen von MAGYAR und Mitarbeiter, die in einigen Fällen von hypertrophischer Leberzirrhose (HANOT)

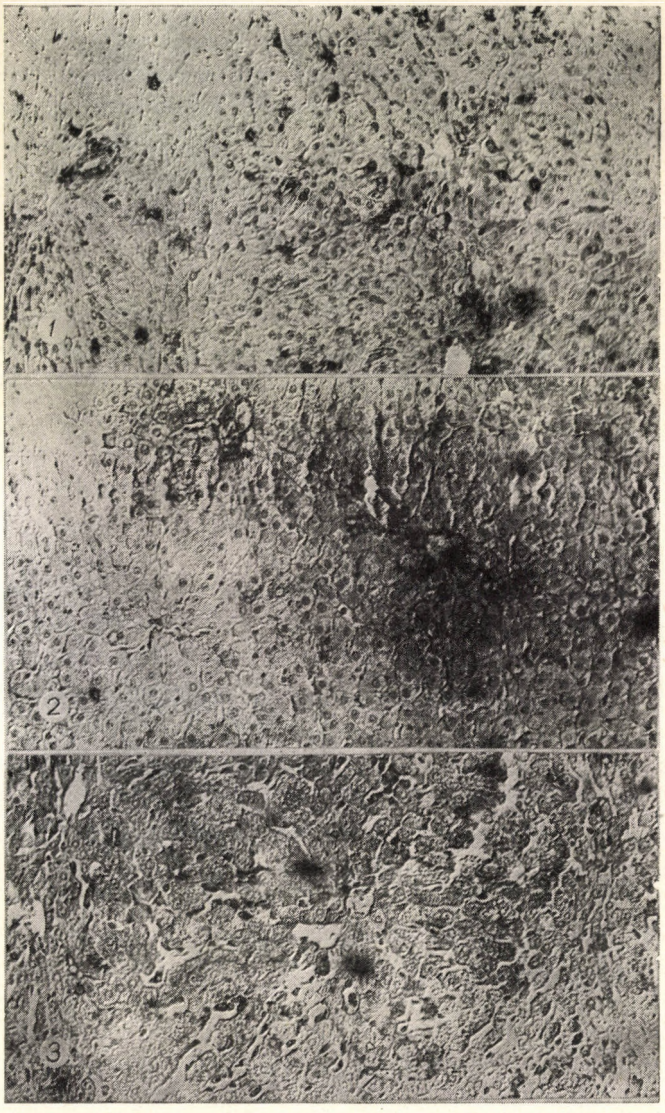


Abb. 1. Leber einer mit Lithiumkarmin blockierten Ratte. (Romeissche Methode) Die Kupfferschen Zellen gequollen, mobilisiert, intensiv Phosphatase-positiv (Obj. 7, ok. 9.)

Abb. 2. Leber einer mit Tetrachlorkohlenstoff behandelten Ratte. Intensiv positive AP in den peripheren Leberzellen. Gomorische Methode modifiziert nach Hoffmann—Epstein. (Obj. 20, ok. 9)

Abb. 3. Leber einer blockierten und mit Tetrachlorkohlenstoff behandelten Ratte. AP nur in den teils mobilisierten Kupfferschen Zellen positiv. In der Mitte zwei Artefakte. Gomorische Methode modifiziert nach Hoffmann—Epstein. Blockade mit Lithiumkarmin nach Romeis (Obj. 20, ok. 9)

ein Ansteigen des AP im Blut feststellten. Bekannterweise findet man bei diesem Typ der Leberzirrhose eine intralobuläre retikulär-bindegewebige Proliferation, welche innerhalb gewisser Grenzen an Bedeutung und Effekt unserer experimentellen Blockade ähnlich ist. In den stark blockierten Zellen, könnte das als ein Kompensations-Phänomen aufgefasst werden, indem die nicht blockierten Zellen die blockierten funktionell ersetzen würden.

Für die exkretorische Funktion der Leber spricht auch die schwach positive Reaktion des Gallengangepithels bei den Tieren der dritten Versuchsgruppe.

Bei allen untersuchten Tieren zeigten sich bedeutende Veränderungen im Nukleoproteidstoffwechsel und bei den Tieren der zweiten und dritten Versuchsgruppe auch im Glykogenstoffwechsel. Einen Zusammenhang zwischen diesen Stoffwechselveränderungen und der AP-Reaktion konnten wir aber nicht feststellen. Eine einzige Ausnahme bildete jenes Tier der dritten Versuchsgruppe, bei dem die peripheren Leberzellen eine positive Reaktion gaben. Dies könnte aber auch durch eine ungenügende Blockade zu erklären sein.

Wir erwähnten das Erscheinen von AP in den periportalen Rundzellinfiltraten. Dies dürfte wahrscheinlich mit den Zellteilungen in Zusammenhang stehen.

Zusammenfassung

1. Zur Klärung der Frage des intra- oder extrahepatischen Ursprunges der Leberphosphatase wurde die alkalische Phosphatase-Reaktion in drei verschiedenen Versuchsanordnungen untersucht. (Durch Tetrachlorkohlenstoff verursachte Hepatitis, Blockade durch Lithiumkarmin, Lithiumkarmin-Blockade mit nachträglicher Tetrachlorkohlenstoff-Intoxikation.)

2. Die mit Tetrachlorkohlenstoff behandelten Tiere zeigten eine positive alkalische Phosphatase-Reaktion der Leberzellen. Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen von Koch und Mitarbeitern überein.

3. Bei den mit Lithiumkarmin blockierten Tieren gaben weder die Leberzellen noch die Sternzellen eine positive Reaktion. In den wenig oder überhaupt nicht blockierten Sternzellen konnte aber alkalische Phosphatase nachgewiesen werden.

4. Die blockierten und nachher mit Tetrachlorkohlenstoff behandelten Tiere ergaben dasselbe Bild wie jene bei denen nur Lithiumkarmin aber kein Tetrachlorkohlenstoff angewandt wurde. Der einzige Unterschied war eine schwächere Reaktion des Gallenepithels bei den kombiniert behandelten Tieren.

5. Obige Befunde und die Tatsache, dass schwere histochemische Veränderungen aufweisende Leberzellen kein Ferment enthalten, scheinen die Auffassung zu bekräftigen, wonach die alkalische Phosphatase ein durch die Leber ausgeschiedenes aber nicht von den Leberzellen hergestelltes Ferment ist.

LITERATUR

1. Freeman, S. (1951): Comparison of Effects of Hepatectomy and of Common Bile Duct Obstruction on Serum Phosphatase of Adult Dogs. Amer. J. Physiol. *164*, 792. — 2. Koch-Weser, D., de la Huerga, J. and Popper, H. (1951): Relation between Serum and Hepatic Enzymes in Experimental Liver Damage. J. Lab. clin. Med. *328*, 825. — 3. Sulkin: Zit. nach Magyar, I.—Fischer, A. (4). — 4. Magyar, I.—Fischer, A. (1956): A máj és epeutak. Akadémiai Kiadó Budapest. — 5. Romeis, B. (1928): Taschenbuch der mikroskopischen Technik. Oldenburg, Berlin.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ О ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЕ ПЕЧЕНИ

А. РОЗЕНБЕРГ, И. ШЭХТЕР и В. ДАГИ

При различных экспериментальных условиях проводились исследования на белых крысах о роли и значении щелочной фосфатазы в печеночной дольке.

В обработанной четыреххлористым углеродом группе животных щелочная фосфатаза была обнаружена — в полном согласии с наблюдениями Коха и сотрудников — в перипортальных печеночных клетках:

В блокированной литиевым кармином второй группе животных, далее в третьей группе, где кроме блокирования животных давали им также четыреххлористый углерод, фермент появился в звездчатых, но отсутствовал в печеночных клетках. В случае сочетания блокирования с обработкой четыреххлористым углеродом реакция фермента ввиду отсутствия желчевыводящих каналов была гораздо слабее, чем у контрольных животных.

Отсутствие щелочной фосфатазы в печеночных клетках после блокады и после одновременного применения блокады и четыреххлористого углерода позволяет делать тот вывод, что в печени происходит не производство (секреция), а только выделение (экскреция) данного фермента.

DONNÉES EXPÉRIMENTALES CONCERNANTES LA PHOSPHATASE ALCALINE HÉPATIQUE

A. ROSENBERG, I. SCHÄCHTER et V. DAGHIE

Afin d'élucider le rôle et l'importance de la phosphatase alcaline dans les lobules du foie, des rats blancs ont été examinés dans différentes conditions expérimentales.

Dans le groupe d'animaux traités au carbotetrachlorure — conformément aux observations de Koch et de ses collaborateurs, — la phosphatase alcaline a été retrouvée dans les cellules periportales.

Dans le second groupe d'animaux bloqués par du lithine-carmin, ainsi que dans le troisième groupe, dans lequel le blocage a été accompagné d'administration simultanée de carbotetrachlorure, le ferment est apparu dans les cellules de Kupffer, mais manquait dans les cellules hépatiques. Lors du traitement simultané carbotetrachlorure - blocage — en l'absence des canaux déférents de la bile — la réaction du ferment est beaucoup plus faible, que dans les cas de contrôle.

L'absence de la phosphatase alcaline dans les cellules hépatiques après le blocage, ainsi qu'après l'application simultanée du blocage - carbotetrachlorure, permet de tirer la conclusion, que le ferment n'est pas produit par le foie, mais seulement excrété.

Dr A. Rosenberg
Dr I. Schächter
Dr V. Daghie

Cluj, Str. Mikó Nr 3. Rumänien

Department of Anatomy of the University Medical School, Pécs
(Director: Prof. J. SZENTÁGOTHAI)

CONTROL OF ADRENOCORTICOTROPHIC FUNCTION BY DIRECT INFLUENCE OF PITUITARY SUBSTANCE ON THE HYPOTHALAMUS

B. HALÁSZ and J. SZENTÁGOTHAI

(Received May 14, 1959)

The possibility of a direct action upon the hypothalamus of some substance produced by the anterior pituitary has emerged from two observations made in this department. TÖRÖK [15] investigating hypophyseal blood circulation in the living dog has noticed that in a few smaller veins of the posterior surface of the anterior pituitary blood-flow is directed upwards, *i. e.* from the hypophysis to the median eminence. The same author described a direct connection of the "capillary-loops" of the median eminence and proximal part of the stalk with the capillary net surrounding the infundibular recess of the 3rd ventricle. Erroneously the blood was considered to flow in these connections from the hypothalamus to the capillary loops. Later investigations [10] however furnished evidence for the reverse direction, *i. e.* from the capillary loops to the capillary network of the infundibular recess. — SZENTÁGOTHAI and SZÉKELY [11] observed in lizzards that the known Bodian-positive argentaffine substance of the anterior lobe is secreted from the pars tuberalis into the median eminence, where it is absorbed. — Thus the possibility of drainage of at least a small fraction of the blood from the anterior pituitary over the capillary net of the hypothalamus is given, as also the incorporation of a substance elaborated by the anterior lobe into the median eminence is indicated. Since there must be some relation between the secretion of the Bodian-positive argentaffine material by the anterior pituitary and adrenocorticotrophic activity [8, 12, 14], the idea is not far-fetched that the incorporation of anterior pituitary material into the median eminence may serve the control of adrenocorticotrophic function.

To test this hypothesis, small pieces of anterior pituitary were homografted into the hypothalamus of albino rats by the stereotaxic technique, a method successfully employed by FLERKÓ and SZENTÁGOTHAI [1] with ovary tissue. If the above-mentioned idea is correct, there must occur a depression of adrenocorticotrophic activity of the host's pituitary.

Materials and Methods

The experiments were carried out on 82 adult male wistar rats of our own breeding, kept under strictly uniform environmental conditions and on a standard diet. They were divided into 7 groups.

A) Untreated controls, 8 animals.
B) Autografts of small pieces of adrenal cortex into the hypothalamus, 10 animals.
C) Autografts of small pieces of muscle tissue into the hypothalamus, 9 animals.
D) Homografts of anterior pituitary tissue into the hypothalamus, 35 animals[1],
E) Homografts of anterior pituitary tissue into the brain (thalamus, subcortical areas), 6 animals.
F) Homografts of anterior pituitary tissue into the spleen, 6 animals.
G) Homografts of anterior pituitary tissue under the renal capsule, 8 animals.

The technique of implantation into the hypothalamus and other parts of the brain was made as described by FLERKÓ and SZENTÁGOTHAI [1]. Generally two implants were made in one animal, the amount of implanted tissue was less than 1 cu. mm. After transplantation the animals and the untreated controls were kept for 25 days under strictly uniform environmental conditions, especially at a temperature of 27 $\pm$ 1° C. After the animals were sacrificed, the weight of the hypophysis, adrenals, thyroids and gonads was determined on a torsion balance and these organs and the brain were fixed in formalin. The localisation of the hypothalamic grafts was studied on serial sections of the diencephalon, stained alternatively with haematoxylin-eosin and the MAN method, in order to differentiate also the several cell-types of the hypophyseal grafts. The hypophysis, thyroids and gonads were investigated histologically according to routine methods. One adrenal was embedded into celloidin-paraffin and sections 6 μ thick were stained with haematoxylin-eosin for the determination of nuclear size spectra, the other was cut into frozen sections for the investigation of lipids in polarized light or after staining with Sudanblack.

The nuclear size spectra were determined in the zona fasciculata according to the method of JACOBJ [7]. The diameter of 200 nuclei was measured in each case from different parts of the zona fasciculata. The nuclei being spheroid it generally suffices to measure one diameter, but if a slight irregularity was noticed the mean value of the longest and the smallest diameter was determined. To secure equal conditions during technical procedures all material was always treated together in the same chemicals.

Recently it has been reported that nuclear size in the zona fasciculata can be considered as a very good measure of adrenocorticotrophic activity [2, 4, 13, 5, 6]. Swelling of the nuclei occurs with enhanced adrenocorticotrophic activity, *e. g.* in all cases of stress or ACTH treatment, whereas a shrinkage of nuclei is found after hypophysectomy or cortisone treatment, *i. e.* when ACTH secretion is inhibited. The nuclear size is a more sensitive test than adrenal weight, since 0.1 mg ACTH/100 g body weight/day brings about a significant increase of nuclear size in 3 days. The nuclear swelling in response to increased ACTH activity (in the physiological dose range) develops after a stage of initial swelling (24 hrs; [1st phase]), then shrinking (48 hrs; [2nd phase]) and the final swelling (from the 3rd day; [3rd phase]) reaching its equilibrium on the 5th day, which is maintained in case of daily administration of the same dose (0.1 mg) for long periods [6]. The nuclear-size-test is therefore a valuable means for evaluating the level of adrenocorticotrophic activity in experiments of longer (1—4 weeks) duration. — Since nuclear swelling or shrinkage has in this case nothing to do with the so called "rhythmic" growth of nuclear volume, we do not convert the diameter into nuclear volume and in the diagram of nuclear size spectra the diameters are simply plotted on the abscissa in linear order.

Results

The weight of adrenals, thyroids and testes showed no appreciable change in groups A (controls), B (autografts of adrenal tissue), C (autografts of muscular tissue), D (homografts of anterior pituitary tissue into the hypothala-

[1] In 12 animals of this group the graft was implanted into the basal region of the anterior hypothalamus, in order to secure a connection of their blood supply with the capillary loops of the median eminence (Subgroup D_3).

mus), E (homografts of anterior pituitary tissue into non-hypothalamic parts of the brain), F and G (homografts of pituitary tissue into the spleen and under the renal capsule). The weight of the hypophysis as seen from Table 1 was practically uniform in groups A, B, C, F and G, but significantly reduced in groups D and E. No significant change was noticed in the qualitative histological picture of the adrenals in any of the groups, only in some cases of group D was there a marked reduction of birefringent lipids in the zona fasciculata. Thyroids and testes appeared histologically normal in all groups. No significant difference in histological structure was observed in the adenohypophysis.

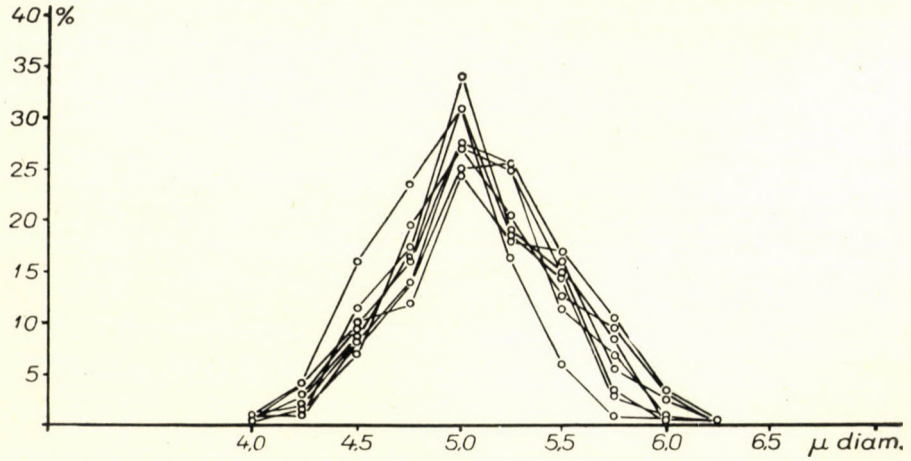


Fig. 1. Nuclear size spectra of the zona fasciculata of 8 normal male albino rats. The nuclear diameter is plotted on the abscissa, the percentual frequency of diameter classes on the ordinate

Fig. 1 shows the fairly uniform nuclear size spectra in the zona fasci culata of the adrenal cortex of normal controls (group A) with the empirical maximum in the 5 μ group.

After implantation of adrenal (group B) or muscular tissue (group C) into the hypothalamus the nuclear size in the zona fasciculata was increased in all cases without exception (Fig. 2). (A diagram showing the size spectra of group C has been omitted, being exactly the same as in Fig. 2.)

After implantation of anterior pituitary tissue into the hypothalamus (group D) the change at first appeared irregular since in about half of the cases the nuclei were enlarged and in the other half they were shrunken. After the cases had been grouped according to localization and histological character of the graft it became clear that in all cases when a graft with preserved histological structure was situated in the infundibular recess of the 3rd ventricle (Fig. 3a) the nuclear size decreased (Subgroup $D_1 = 11$

Table I

Hypophyseal weights of male albino rats of 200 ± 10 *g body weight*

Exp. group	Implanted tissue and localization of the grafts	Number of animals	Mean weight of hypophysis		
A	Normal	8	7.9 ± 0.3*		
B	Autografts of adrenal tissue in the hypothalamus	10	7.8 ± 0.1	t = 5.62 p < 0.01	
C	Autografts of muscle tissue in the hypothalamus	9	8.2 ± 0.3		t = 3.06 p < 0.01
D	Homografts of anterior pituitary tissue in the hypothalamus	35	6.0 ± 0.1		
E	Homografts of anterior pituitary tissue in non-hypothalamic parts of the brain	6	6.0 ± 0.4		
F	Homografts of anterior pituitary tissue in the spleen	6	8.1 ± 0.2		
G	Homografts of anterior pituitary tissue under the renal capsule	8	8.1 ± 0.3		

* Standard error

animals, Fig. 4) and whenever the graft was situated in the hypothalamus outside the third ventricle (Fig 3b) or had lost its histological character the nuclei were mostly enlarged (subgroup $D_2 = 12$ animals, Fig. 5). The only case in this group with shrunken nuclei was one in which the graft was situ-

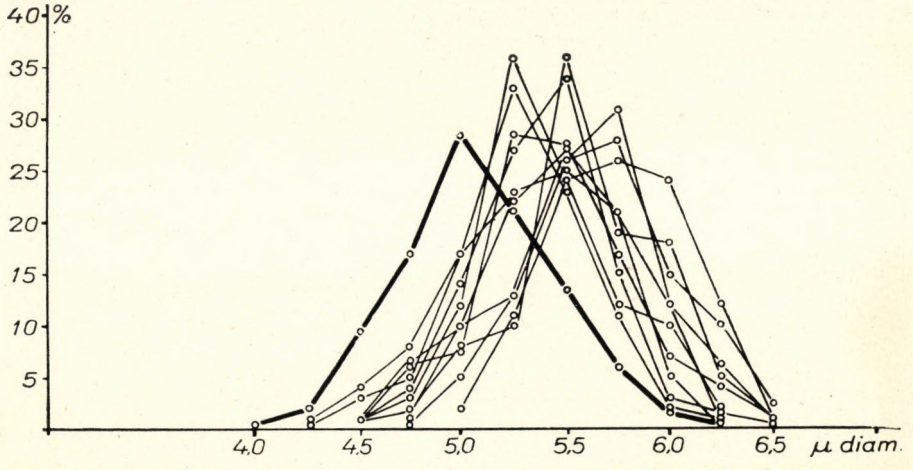


Fig. 2. Nuclear size spectra of the zona fasciculata of 10 male albino rats bearing grafts of adrenal tissue in the hypothalamus. Heavy line = average nuclear size distribution in normal group

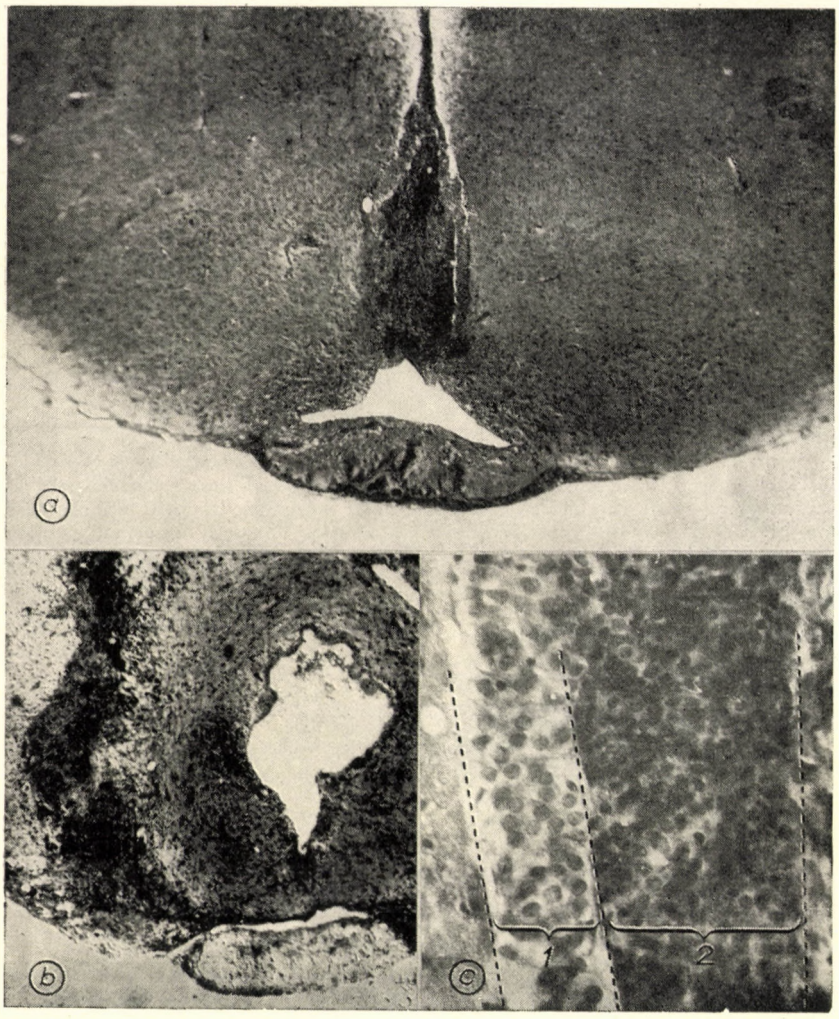


Fig. 3. a) Hypophyseal homograft in the 3rd ventricle protruding into the infundibular recess *b)* Hypophyseal homograft in premamillary region of the hypothalamus, outside the 3rd ventricle. *c)* Hypophyseal homograft in 3rd ventricle with larger magnification 1 = hyperplastic ependymal layer, 2 = grafted anterior pituitary tissue

ated in the infundibular recess but had not vascularized and was in a state of decomposition. Whenever the graft was localized in the anterior hypothalamus, and generally some part of it protruded into the 3rd ventricle but not into its infundibular recess (subgroup D_3 = 12 animals), the nuclear size was normal or somewhat decreased. Most of the hypophyseal grafts (Fig. 3c) were richly vascularized and their basophilic and acidophilic cells well preserved.

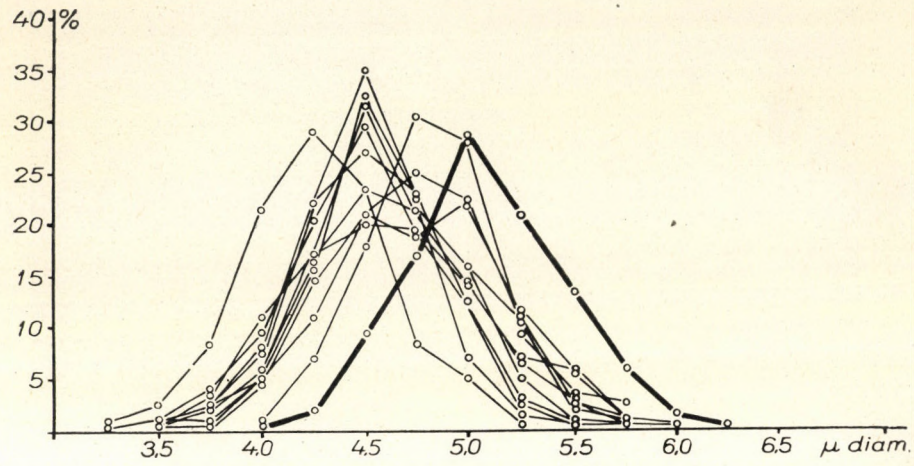


Fig. 4. Nuclear size spectra of the zona fasciculata of 11 male albino rats bearing well preserved hypophyseal homografts in the 3rd ventricle, protruding into the infundibular recess (see Fig. 3a). Heavy line = average size distribution of nuclei in normal group

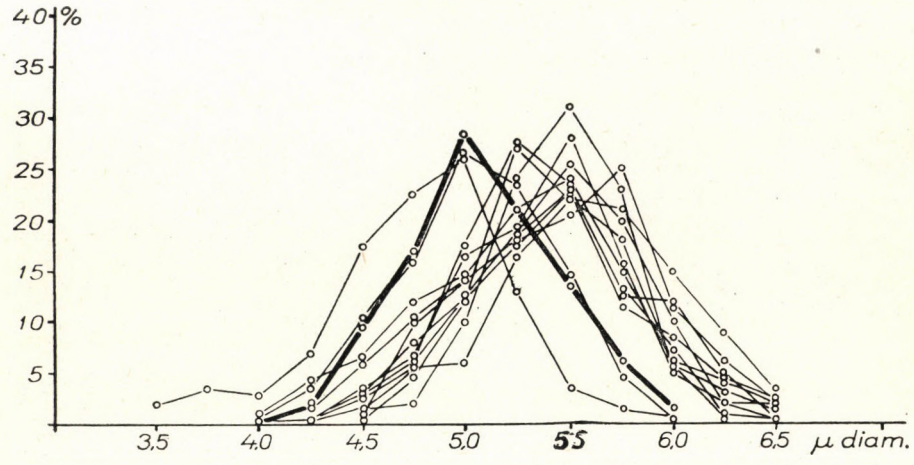


Fig. 5. Nuclear size spectra of the zona fasciculata of 12 male albino rats with hypophyseal homografts of well preserved histological structure in the hypothalamus, but outside the 3rd ventricle, or with necrosed or atrophied homografts in the 3rd ventricle. Heavy line = average nuclear size distribution in normal group

In group E with anterior pituitary homografts in non-hypothalamic parts of the brain the nuclei of the zona fasciculata were mostly but irregularly increased (Fig. 6).

From Fig. 7, where the assembled "nuclear-size-spectra" of the different groups are compared, it appears that the nuclear size was uniformly enlarged in groups B, C, E and subgroup D_2, when the hypophyseal homograft was

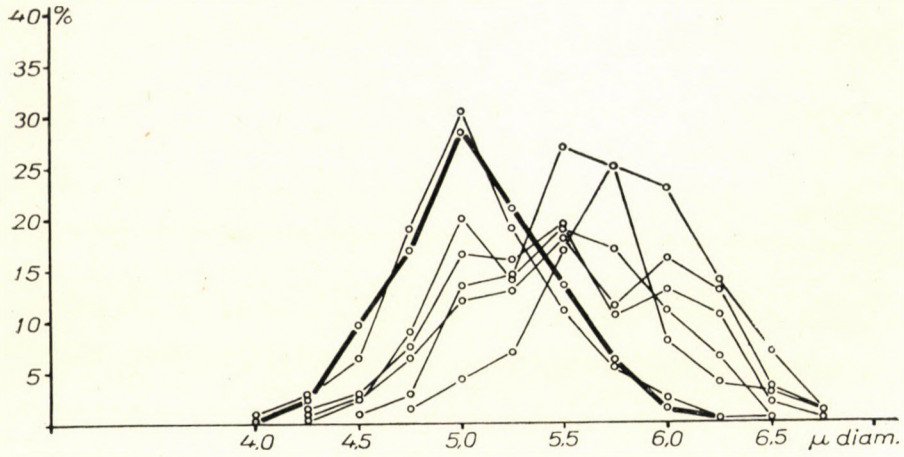


Fig. 6. Nuclear size spectra of 6 male albino rats bearing hypophyseal homografts in non-hypothalamic parts of the brain. Heavy line = average nuclear size distribution in normal group

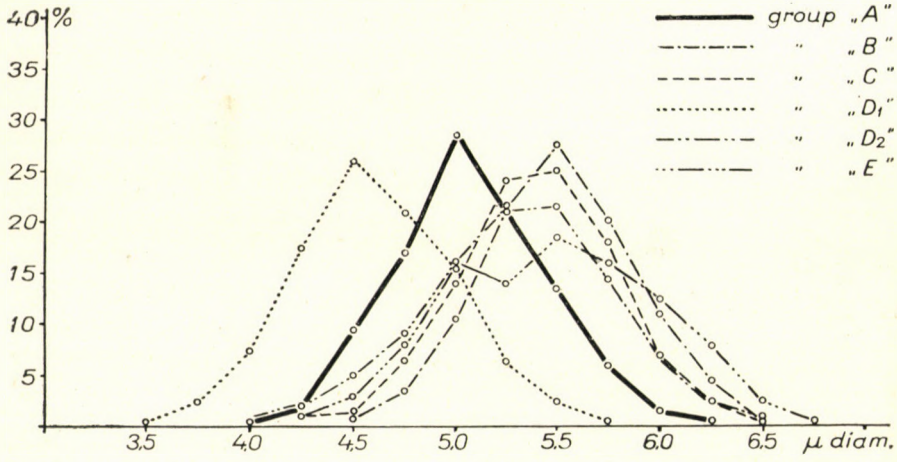


Fig. 7. Average nuclear spectra of the zona fasciculata in the experimental groups. Heavy line = average nuclear size distribution in normal group. The nuclear size is enlarged in all groups excepting subgroup D_1 (with hypophyseal homografts in the infundibular recess of the 3rd ventricle), in which nuclear size is clearly reduced

not in the infundibular recess, and decreased in subgroup D_1 with hypophyseal grafts of preserved histological structure in the infundibular recess. Statistical evaluation revealed the change of nuclear size to be significant in all groups, against group A being $t = 8.400$, $p < 0.01$ in group B; $t = 16.912$, $p < 0.01$ in group C; $t = 8{,}707$, $p < 0{,}01$ in subgroup D_1; $t = 2.976$, $p < 0{,}01$ in subgroup D_2 and $t = 4.710$, $p < 0.01$ in group E.

Discussion

As reported first by FÜLÖP [2], experimental lesions of the hypothalamus and the midbrain produce a marked increase of nuclear size in the zona fasciculata of the adrenal cortex. This enlargement of the nuclei lasts for about 3 months. The changes observed in our groups B, C and E therefore can be considered as non-specific effects of brain lesions. As mentioned in the description of the methods, nuclear enlargement of the same character is brought about by chronic administration of small doses [0.1 mg/100 g body weight/day] of ACTH. We must therefore infer that especially with hypothalamic lesions, but also with lesions in several other parts of the brain, there must occur an elevation of adrenocorticotrophic activity. — With respect to the influence exerted by adrenal corticoids on the hypothalamus, the results of group B are of some interest, — showing that adrenocortical hormones liberated directly in the tuberal region of the hypothalamus cannot depress the adrenocorticotrophic activity elevated by the lesion effect of the intrahypothalamic transplantation, as seen from the same effect produced by implantation of indifferent tissue (group C). It is of course questionable whether the adrenal implants with often not too well preserved histological structure are secreting sufficient amounts of hormone to produce any appreciable effect. But the finding is well in accord with the observation that adrenal weight [9] and nuclear size in the zona fasciculata [5] are equally depressed by cortisone administration in intact animals and animals with hypothalamic lesions.

Shrinkage of the nuclei is a much more specific effect. It is experienced exclusively after hypophysectomy, interruption of the hypophyseal stalk, or cortisone treatment. This effect can therefore be considered as a very reliable sign of depressed adrenocorticotrophic function in experiments of longer duration. This depression is the more significant, since the lesion effect of intrahypothalamic transplantation in itself enhances adrenocorticotrophic activity.

From the results of subgroup D_1 it appears that richly vascularized anterior pituitary implants with well preserved histological structure localized in the infundibular recess of the 3rd ventricle always induce this depression of adrenocorticotrophic activity, while hypophyseal implants in other regions of the hypothalamus (subgroup D_2) as well as in other parts of the brain (group E) do not bring about such an effect. This makes it clear that the effect is not caused by the hypophyseal graft itself, but by a direct action of some substance liberated by the graft at a certain site of the hypothalamus.

At present two explanations could be proposed. The blood of the graft, through connections established with the capillary loops of the median eminence, might be drained towards the portal vessels of the hypophysis. If so, some hormone — probably ACTH itself — liberated by the graft could act directly on the anterior lobe of the host and might depress adrenocortico-

trophic activity. This would correspond with the results of GEMZELL and HEIJKENSKJÖLD [3] according to which in adrenalectomized rats large doses of ACTH depress the ACTH content of the hypophysis. In this case, however, it would be difficult to explain why adrenocorticotrophic activity should not soon be stabilized on the original level. Also this assumption would not be consistent with the results of subgroup D_3, gained from a series of experiments specially designed to ascertain wether pituitary grafts, being in connection with the capillary loops of the median eminence, would influence adrenocorticotrophic function. When the pituitary graft was situated in the anterior hypothalamus, especially just behind the optic chiasma, and was connected directly with the capillary loops of the median eminence, there was no clear shrinkage, or much less than in cases of typical localization of the graft in the infundibular recess (Fig. 3a) without a connection with the capillary loops.

Another and a more probable explanation would be that some substance (probably ACTH) secreted by the hypophyseal graft might exert an influence upon nervous elements situated in the close neighbourhood of the infundibular recess, which finally results in inhibition of the ACTH secretion of the host's hypophysis. This explanation would be more consistent with the two observations mentioned in the introduction, especially with the fact that small part of the venous blood of the anterior lobe is drained trough the capillary net immediately surrounding the infundibular recess of the 3rd ventricle. The findings of GEMZELL and HEIJKENSKJÖLD [3] could be explained also in this way.

Should this explanation, which naturally cannot be considered more than a working hypothesis, stand the test of further investigations, we had a most interesting example of direct automatic self-control of pituitary function by hormonal feed-back action. A fraction of the blood draining from the hypophysis would by irrigating the region surrounding the infundibular region thus influence nervous elements according to its content of ACTH or some other substance liberated from the anterior pituitary. An automatic self-control of adrenocorticotrophic functions would be achieved if an elevation of the ACTH content of the blood returning to the hypothalamus would exert an inhibitory effect upon the nervous elements responsible for the stimulation of ACTH secretion or release.

From the data of Table 1 it is obvious that homotransplantation of hypophyseal tissue into the brain has a depressant effect on hypophyseal weight. Since about one third of an anterior lobe is grafted and generally not the whole implanted tissue survives, it can be calculated from the data that by loss of hypophyseal weight the total amount of hypophyseal tissue might be restored to the normal level.

The weight loss of the hypophysis, however, is completely independent

of the localization of the graft, hypothalamic and non-hypothalamic transplants being equally effective in this respect. This effect therefore is obviously in no connection with the depressing influence of hypothalamic pituitary grafts upon adrenocorticotrophic activity. — Implants of pituitary tissue into the spleen and below the renal capsule do not bring about such an effect. No explanation of this phenomenon can be proposed at present. It might be that only intracerebral transplants of anterior pituitary tissue can sufficiently retain their function to bring about this effect. The histological character of pituitary implants in the brain seems indeed to be better preserved than in implants of other localization.

Summary

Homotransplantation of small pieces of anterior pituitary tissue into the infundibular recess of the 3rd ventricle leads to a significant decrease of nuclear size in the zona fasciculata of the adrenals, indicative of depressed adrenocorticotrophic function. Transplantation of other tissues into this region, or homotransplantation of anterior pituitary tissue into other parts of the hypothalamus, induces nuclear enlargement in the adrenal cortex, a sign of elevated adrenocorticotrophic activity. The possibility of an automatic self-control of adrenocorticotrophic function by a direct hormonal feed-back action from the pituitary on the hypothalamus is discussed on the basis of the results.

REFERENCES

1. Flerkó, B.—J. Szentágothai (1957): Oestrogen sensitive nervous structures in the hypothalamus. Acta Endocr. (Kbh) *26*, 121. — 2. Fülöp, T. (1952): Veränderungen der Korngrösse in der Nebennierenrinde nach Hypothalamus-Läsionen. Acta morph. hung. *1*, 41. — 3. Gemzell, C. A.—F. Heijkenskjöld (1957): Effect of corticotrophin on the content of corticotrophin in the pituitary glands of adrenalectomized rats. Acta Endocr. (Kbh.) *24*, 249. — 4. Halász, B.—L. Szőllőssy (1953): Einfluss peripherischer Denervation auf den hypothalamischen Kernvergrösserungseffekt der Zona fasciculata der Nebennierenrinde. Acta morph. hung. *3*, 1. — 5. Halász, B. (1955): Die Rückwirkung von Cortisonzufuhr auf den Bau der Nebennierenrinde nach Hypothalamusläsion. Acta morph. hung. *6*, 119. — 6. Halász, B. (1958): Der zeitliche Ablauf von Veränderungen des Kernvolumens in der Nebennierenrinde. Acta morph. hung. *8*, 193. — 7. Jacobj, W. (1935): Die Zellkerngrösse beim Menschen. Ein Beitrag zur quantitativen Cytologie. Z. mikr.-anat. Forsch. *38*, 161. — 8. Knigge, K. M. (1955): Cytological changes in the hypophysis of intact and thyroidectomized rats subjected to stress. Anat. Rec. *122*, 295. — 9. Szentágothai, J. (1956): Die Rolle diencephaler Mechanismen bei der Rückwirkung von Schilddrüsen-, Nebennierenrinden- und Sexualhormonen auf die Funktion des Hypophysenvorderlappens. Pathophysiologia Diencephalica Internationales Symposion, Mailand. Springer Wien, S. 560. 1958. — 10. Szentágothai, J.—I. Rozsos—J. Kutas (1957): A hypophysis hátsó lebenyének szerepe a mellső lebeny vérkeringésében (Venous blood drainage through posterior lobe vessels of the anterior pituitary) Magy. Tud. Akad. Biol. és Orvosi Tud. Oszt. Közl. *8*, 104. — 11. Szentágothai, J.—Gy. Székely (1958): Resorption argentaffiner Substanz der Hypophyse in die Eminentia medialis bei Lacertilien. Acta biol. hung. *8*, 295. — 12. Székely, Gy.—E. Endrőczi—J. Szentágothai (1958): Erscheinen der argentaffinen Substanz und Beginn der Sekretion adrenocorticotrophen Hormons in der Hypophyse von Hühnerembryonen. Acta biol. hung. *8*, 283. — 13. Tonutti, E.—F. Bahner—E. Muschke (1954): Die Veränderungen der Nebennierenrinde der Maus nach Hypophysektomie und nach ACTH Behandlung, quantitativ betrachtet am Verhalten der Zellkernvolumina. Endokrinologie *31*, 266. — 14. Tóth, N.—P. Simon—Gy. Székely (1958): Abhängigkeit der frühen geweblichen Differentiation der Nebennierenrinde von der Hypophyse bei Hühnerembryonen. Acta biol. hung. *8*, 289. — 15. Török, B. (1954): Lebendbeobachtung des Hypophysenkreislaufes an Hunden. Acta morph. hung. *4*, 83.

НЕПОСРЕДСТВЕННОЕ ОБРАТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДИМОГО ПЕРЕДНЕЙ ДОЛЕЙ ГИПОФИЗА ВЕЩЕСТВА НА ГИПОТАЛАМУС, И ПРОИЗВОДСТВО АДРЕНОКОРТИКОТРОПНОГО ГОРМОНА

Б. ХАЛАС и Й. СЕНТАГОТАИ

После гомотрансплантации небольшого куска ткани передней доли гипофиза в углубление воронки на дне III. мозгового желудочка величина клеточных ядер волокнистой зоны коры надпочечников сигнификантно снижается, что указывает на уменьшенную активность АКТГ. После имплантации другой ткани в данную область, или имплантации ткани передней доли гипофиза в другую область гипоталамуса, величина клеточных ядер коры надпочечников нарастает, что является признаком повышенной активности АКТГ. На основе результатов исследований выдвигается возможность саморегуляции производства АКТГ путем непосредственного действия гормона гипофиза на гипоталамус.

UNMITTELBARE RÜCKWIRKUNG EINES DURCH DEN HYPOPHYSENVORDER. LAPPEN SEZERNIERTEN STOFFES AUF DEN HYPOTHALAMUS UND DIE ADRENO. CORTICOTROPHE FUNKTION

B. HALÁSZ und J. SZENTÁGOTHAI

Homoiotransplantation kleiner Gewebsfragmente des Hypophysenvorderlappens in den Recessus infundibuli des III. Hirnventrikels ruft in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde Kernschrumpfung hervor, was auf eine Herabsetzung der adrenocorticotrophen Hormonsekretion der Hypophyse hindeutet. Nach Transplantation anderer Gewebe an die gleiche Stelle, oder von Hypophysengewebe in andere Gebiete des Hypothalamus entwickelt sich in der Zona fasciculata eine Kernschwellung, was auf eine erhöhte adrenocorticotrophe Tätigkeit deutet. — Auf Grund dieser Befunde wird die Möglichkeit einer unmittelbaren Autoregulation der adrenocorticotrophen Hormonsekretion mittels humoraler Rückwirkung im Vorderlappen sezernierter Stoffe auf den Hypothalamus diskutiert.

Dr Béla Halász
Prof. Dr János Szentágothai
Pécs, Dischka Gy. u. 5. Hungary

Institut für Histologie und Embryologie der Medizinischen Universität, Budapest
(Vorstand: Prof. I. Törő)

ÜBER EINIGE FRAGEN DES ALTERNS DER MENSCHLICHEN PLAZENTA

Mária Nagy

(Eingegangen am 15. Mai 1959)

In der Literatur über die menschliche Plazenta benutzen viele Autoren, wenn sie von der ausgetragenen Plazenta sprechen, gern den Ausdruck alt oder gealtert, und zwar einmal etwas zweifelnd und in Anführungsstrichen, ein andermal ohne diese.

Bereits Virchow setzte voraus, dass es junge Gewebe auch im Altern gibt und alte Gewebe im Fetus angetroffen werden können [31]. Grosser [11] und Cowdry [8] waren ebenfalls der Meinung, die Plazenta sei ein alterndes Organ. Törő [28] betrachtet die Plazenta und Nabelschnur als alternde Organe, deren Leben an die Bedingungen des intrauterinen Lebens gebunden ist. Ähnlicher Ansicht ist auch Warthin [29]. Bürger [6] hält die menschliche Plazenta für ein günstiges Objekt zur Untersuchung der Fragen des Alterns. In seinem Vortrag im Fortbildungskurs 1958 der Abteilung für Gerontologie der Ungarischen Biologischen Gesellschaft äusserte auch Kiszely [15] die Auffassung, die Plazenta altere am Ende der Schwangerschaft.

Unsere Untersuchungen verfolgten den Zweck, die mit fortschreitender Gravidität zustande kommenden Veränderungen der Plazenta zu studieren und mit den Ergebnissen zu vergleichen, die in der gerontologischen Literatur im Zusammenhang mit dem Altern anderer Gewebe bzw. Zellen anzutreffen sind. Infolgedessen teilen wir nicht nur die eigenen Erfahrungen mit, sondern erörtern auch die Literaturangaben, die in diesen Zusammenhang von Interesse sein dürften.

Material und Methoden

Unsere Untersuchungen erfolgten an 29 menschlichen Plazentas, die aus folgenden Schwangerschaftsperioden stammten: Vom Graviditätsbeginn bis zur 20. Woche 18 Stück durch Kürettage gewonnene, und 11 Stück aus der 20—40. Woche stammende Materialien. Sowohl die Kürettagen als auch die von ausgetragenen Schwangerschaften stammenden Plazentas rührten von normalen Graviditäten, von gesunden Müttern bzw. normalen Entbindungen her. Die Materialien wurden in Carnoy-Lösung fixiert und über Methylbenzoatcelloidin in Paraffin eingebettet. Wir stellten 6—8 μ dicke Schnitte her, die nach folgenden Verfahren gefärbt wurden:

Zur allgemeinen Orientierung	Zur Bindegewebsfärbung	Für Metachromasie	Neutr. Polysaccharide	Saure Mukopolysaccharide	Für degenerative Substanzen
Hämatoxylin-Eosin	Azan	Toluidinblau	PAS Hämatox.	Alcianblau	*Weigert van Gieson*
	Mallory	grün lila		Hyaluronidase	Kongorot *Endes*
	Endes	*Giemsa*		10—20—50—70—450 E. Diastase	Toluidinblau, PAS

In bezug auf das in der Plazenta enthaltene Hyaline bzw. Fibrinoid stellten wir bei Anwendung obiger Verfahren folgendes fest:

Hyaline	färbt sich	in Übereinstimmung (+) bzw. im Gegensatz (—) zu den Angaben von
mit Azan	blau	
nach *Mallory*	blau	
nach *Endes*	blau	*Kiszely—Barka* +
(phosphorsaures Hämatoxylin)		*Lillie* +
nach *Weigert*	blau	*Kiszely—Barka* +
		Lillie +
Frisches Hyalin		
nach *Endes*	rot	*Kiszely—Barka* +

Fibrinoid	färbt sich	in Übereinstimmung (+) bzw. im Gegensatz (—) zu den Angaben von
mit Eosin	rot	*Kiszely—Barka* +
nach *Endes*	lila	„ „ +
nach van *Gieson*	gelb	„ „ +
mit Toluidinblau	grün metachr.	*Wislocki—Dempsey* +
nach *Weigert*	blau	*Kiszely—Barka* +
mit PAS	schwach pos.	
mit Toluidinblau	lila metachr.	*Lillie* —

Die PAS-Reaktion der sauren Mukopolysaccharide bzw. der kollagenen Fasern ergab folgende Resultate:

Saure Mukopolysaccharide	färben sich	in Übereinstimmung (+) bzw. im Gegensatz (—) zu den Angaben von
mit Toluidinblau	lila metachrom.	*Pearse* +
		Kiszely—Barka +
mit Alcianblau	grün (nicht spezif.)	*Kiszely—Barka* +

Kollagene Fasern	PAS positiv	in Übereinstimmung (+) bzw. im Gegensatz (—) zu den Angaben von
,,	,,	*Pearse* +
,,	,,	*Baker—Abrams* +
,,	,,	*Wislocki—Dempsey* +

Zur genaueren chemischen Bestimmung der ermittelten sauren Mukopolysaccharide benutzten wir das Hyaluronidase-Präparat »Hyason«-Organon, indem wir sie 1 Stunde mit 10—20—50—70 E und 3 Stunden mit 450 E inkubierten. Mit aus menschlichem Speichel stammender Diastase verdauten wir die sauren Mukopolysaccharide 60 Minuten bei 37° C. Mit Kongorot suchten wir Amyloid in der Plazenta, aber da wir keines fanden, kommen wir auf diese Frage nicht mehr zurück. In Ergänzung der vorliegenden Untersuchungen führen wir auch u. a. bereits im Jahre 1956 an 40 Materialien mit Methylgrün-Pyroninfärbung, mit der Feulgenschen Reaktion, Sudan III und Sudanschwarz Färbung, sowie mit Bestschem Karmin durchgeführte Arbeiten an.

Ergebnisse

Vom Gesichtspunkt unserer Zielsetzungen können wir die Schwangerschaft in zwei Perioden teilen. Die erste erstreckt sich vom Erscheinen der Chorionzotten bis zum 4—4,5. Schwangerschaftsmonat, die zweite vom 4,5. Monat bis zur Entbindung. Dementsprechend werden wir unsere Ergebnisse im Rahmen dieser beiden Gruppen besprechen.

1. *Die Veränderung der Decidua in der ersten Schwangerschaftshälfte*

Die deciduale Umgestaltung des Endometriums ist zu erkennen. Die Zellen sind geschwollen und mit Bestschem Karmin gefärbt erscheint ihr Plasma glykogenreich. Die Kerne sind verhältnissmässig gross und enthalten lockeres Chromatin. Die Zellen liegen ziemlich weit voneinander, und die zwischen ihnen befindliche interzelluläre Substanz färbt sich nach Giemsa lila, mit Toluidinblau zeigt sie lila Metachromasie und färbt sich auch mit Alcianblau. Diese Substanz widersteht der Verdauung mit Hyaluronidase. In dieser im

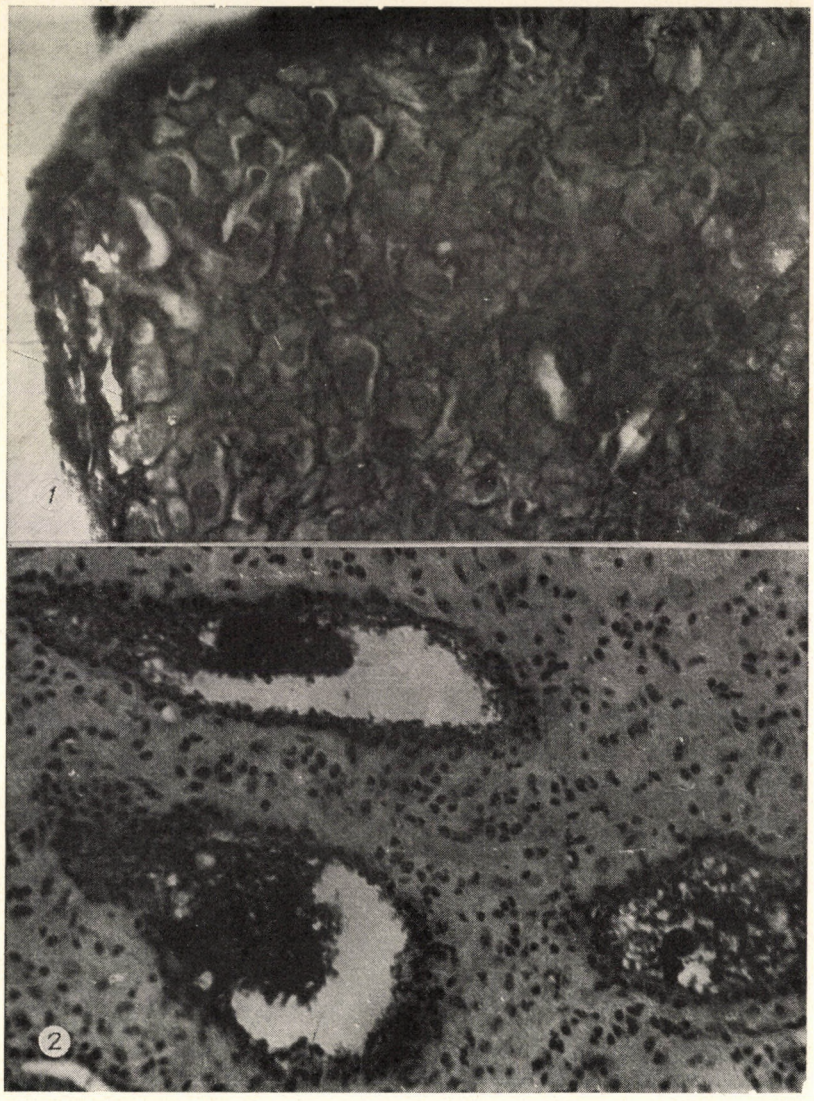


Abb. 1. Kollagene Fasern zwischen den Zellen der Decidua basalis, 2—3. Monat der Schwangerschaft. Azan-Färbung

Abb. 2. PAS-positive Substanz in den Drüsen der Decidua. PAS-Reaktion. 2—3. Monat der Schwangerschaft

Gelzustand befindlichen interzellulären Substanz sind mit Bindegewebsfärbung zahlreiche feine kollagene Fasern eingebettet anzutreffen. Auch bei der PAS-Reaktion fallen diese Fasern auf. Nach Literaturangaben sind die kollagenen Fasern auch im Elektronenmikroskop zu sehen [33]. Der Inhalt der Drüsen färbt sich mit Alcianblau, gibt positive PAS-Reaktion und mit

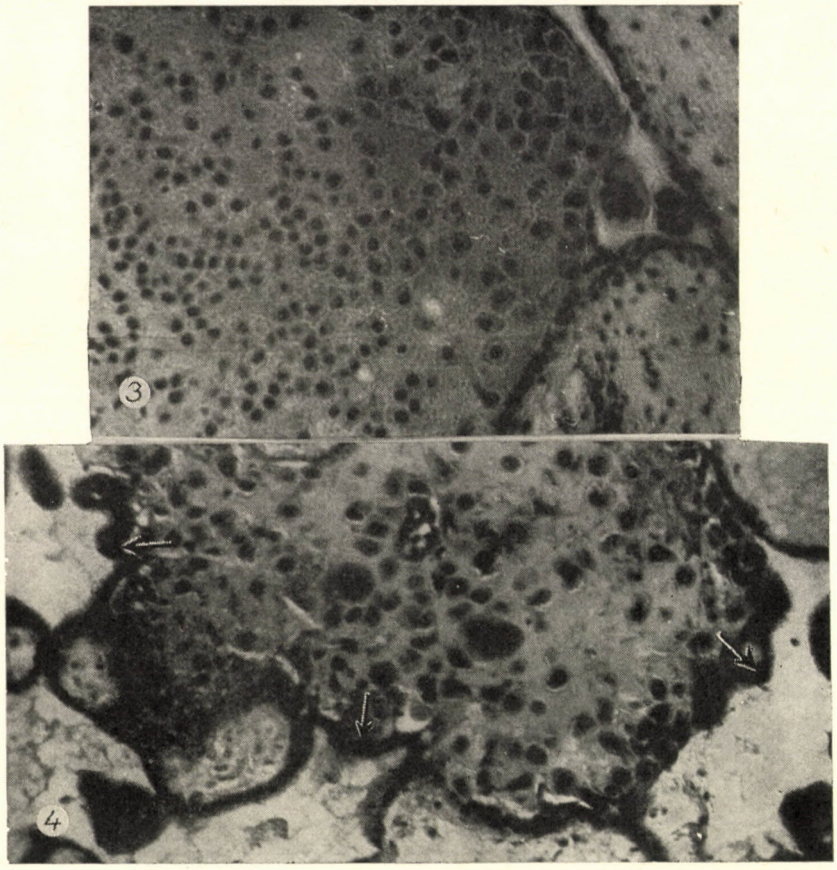


Abb. 3. PAS-positive Substanz an der Stelle der destruierten Deciduazellen bzw. zwischen den Deciduazellen. Zweimonatige Schwangerschaft. PAS-Reaktion

Abb. 4. Fibrinoid- bzw. Hyalinvermehrung an der Stelle zugrunde gehender Decidua-Inseln. Das »Synzytium« der die Decidua abbauenden Zotten bedeckt die Oberfläche der Decidua-Insel. Die Pfeile deuten auf die »Synzytium«-Schicht. Aus 1—2monatiger Schwangerschaft. Färbung nach *Endes*

Toluidinblau lila Metachromasie. Diese Metachromasie widersteht auch der Hyaluronidaseverdauung. Daraus folgt, dass es sich bei der einen Komponente des in den Drüsen anwesenden Sekretes um ein saures Mukopolysaccharid und bei der anderen um Mucin handelt. Dies beweisen sowohl die Untersuchungen von WISLOCKI und DEMPSEY [32] wie unsere eigenen mit Diastaseverdauung und Bestscher Karminfärbung gewonnenen Resultate. Die PAS-Positivität des Drüsensekretes bleibt auch nach Diastaseverdauung erhalten, so dass hier ausser Mucin und sauren Mukopolysacchariden möglicherweise auch neutrale Mukopolysaccharide anwesend sind.

2. *Unter der Wirkung von Chorionzotten zustande gekommene Veränderungen an den von der Decidua basalis abgelösten Decidua-Inseln*

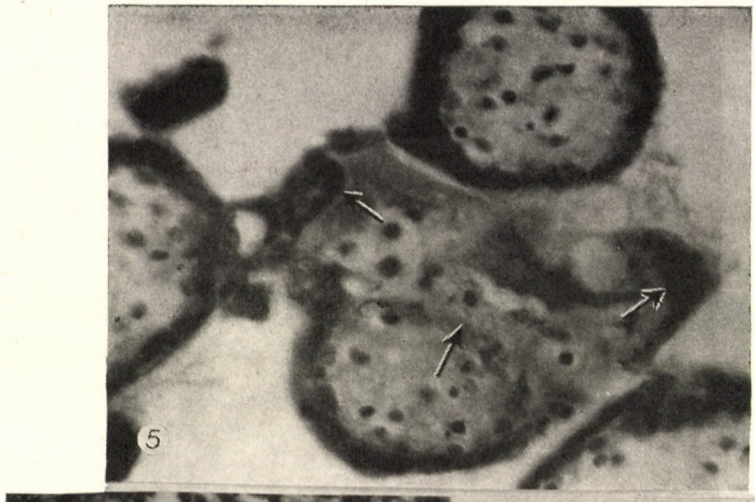
Das Ausmass der zustande gekommenen Veränderungen hängt vom Zeitpunkt der Ablösung von der Decidua basalis ab. Es finden sich auch Decidua-Inseln, deren Zellen in überwiegender Mehrzahl noch erhalten sind. In diesem Fall gibt die interzelluläre Substanz mit Toluidinblau lila Metachromasie und färbt sich mit Alcianblau. An der Stelle der abgebauten Zellen ist diese Substanz ebenfalls zu finden, die auch den Raum zwischen den Trophoblastteilen und den Decidua-Inseln ausfüllen kann. Daraus darf geschlossen werden, dass diese Substanz der zytolysierenden Wirkung der Trophoblasten lange widersteht. Es kommt auch vor, dass die Substanz noch zwischen den Trophoblastzellen anzutreffen ist. In allen Fällen sieht man, dass das »Synzytium«* der die Decidua abbauenden Zotten die Oberfläche der Decidua-Insel bedeckt und von den Zotten nur die Trophoblastschicht unmittelbar mit der Decidua in Berührung steht. Wenn sich die Decidua-Insel von der Decidua basalis schon lange abgelöst hat, so sind ihre Zellen zum grössten Teil destruiert, so dass sich zwischen den anscheinend weit voneinander liegenden Zellen interzelluläre Substanz angesammelt hat, und zwar Fibrinoid bzw. junges lipoidhaltiges Hyalin. Diese Erscheinung ist auch an sehr kleinen Decidua-Inseln von 50—100 μ zu beobachten.

3. *Die Umgestaltung der Chorionzotten in der ersten Schwangerschaftshälfte*

a) *Die Veränderung der Trophoblasten.* Der Bürstensaum des an der Oberfläche der Chorionzotten befindlichen »Synzytiums« verschwindet allmählich mit fortschreitender Gravidität. Dieser Bürstensaum besteht elektronenmikroskopisch aus Mikrozotten, die grösstenteils resorbiert werden [33].

Der Durchmesser der »synzytialen« Schicht stimmt zu diesem Zeitpunkt ungefähr mit der Schichtdicke der Zytotrophoblasten überein. Das Plasma des »Synzytiums« ist ausgesprochen basophil. Diese Basophilie beruht, wie bei Methylgrün-Pyroninfärbung deutlich sichtbar, auf dem Ribonukleinsäuregehalt des Plasmas. Die Plasmakerne finden sich gleichmässig verstreut und enthalten etwas massiveres Chromatin als die Kerne der Zytoblastschicht. Das Volumen der 6wöchigen Kerne macht 113 μ^3 aus [13]. Im »Synzytium« sind weder Mitose noch andere Teilungsformen anzutreffen. Mit Sudan III und Sudanschwarz finden wir mit fortschreitender Schwangerschaft im Plasma

* Die Oberfläche der Chorionzotten bedeckende Epithelschicht bezeichnen wir deshalb in Anführungsstrichen als »Synzytium«, weil die neuesten elektronenmikroskopischen Untersuchungen ergeben haben, dass es sich um kein Synzytium handelt, obwohl es im Lichtmikroskop so erscheint und in der Literatur diese Benennung benutzt wird.



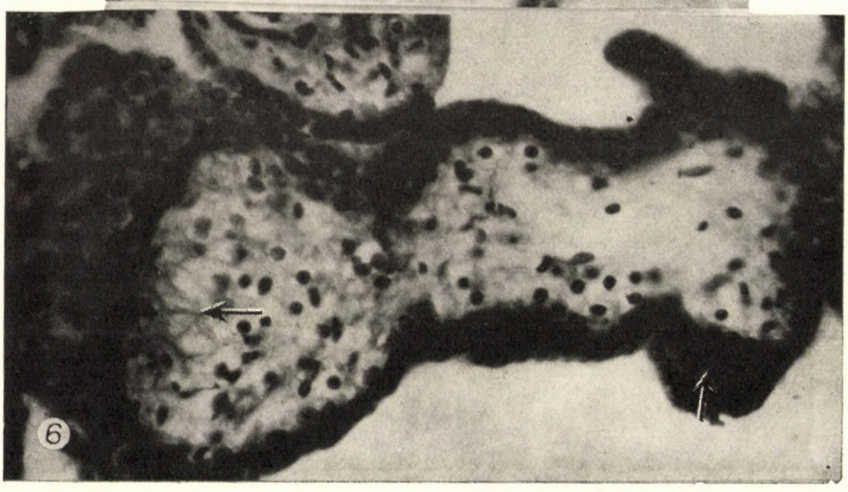


Abb. 5. Fibrinoid abbauende Chorionzotte. Das grüne Metachromasie zeigende Fibrinoid sieht man zwischen dem Zytotrophoblast und dem »Synzytio«-Trophoblast. Die Pfeile deuten auf das Zyto-bzw. »Synzytio«-Trophoblast. Aus 1—2monatiger Schwangerschaft. Toluidinblaufärbung

Abb. 6. Metachromasie aufweisende junge Fasern unter der Schicht der sich teilenden Zytotrophoblasten. Zwischen den Zyto- und »Synzytio«-Trophoblastzellen sieht man grüne Metachromasie gebendes Fibrinoid. Die Pfeile deuten auf das Fibrinoid bzw. auf die jungen Fasern hin. Aus 1—2monatiger Schwangerschaft. Toluidinblaufärbung

des »Synzytiums« immer weniger neutrales Fett bzw. Lipoide. Die hier anwesenden Lipoide stellen die Präkursoren der plazentaren Steroidhormone dar [32]. Zwischen den »synzytialen« Trophoblasten und den Zytotrophoblasten ist bei den unserseits angewandten Färbungsverfahren Fibrinoidanhäufung zu sehen. Als selbständige Schicht finden wir die Zytotrophoblastschicht etwa bis zum 4. Monat der Schwangerschaft. Später können von den

Zytotrophoblasten einzelne Zellen oder Zellinseln erhalten bleiben. In der Schicht der Zytotrophoblasten sieht man mitotische Zellteilungen. Mit Bestscher Karminfärbung finden wir je nach dem Individuum mehr oder weniger Glykogen in den Zytotrophoblastzellen, während mit Methylgrün-Pyronin pyroninophile Granula in ihnen zu sehen sind. Das Epithel ist vom Zottenstroma durch eine Basalmembran getrennt, die sich bei jungen Zotten mit Toluidinblau metachromatisch und auch mit Alcianblau färbt. Die Zytotrophoblastschicht nimmt an der Bildung des »Synzytiums« teil, und nach dem Verschwinden der Schicht liegt die Membrana basalis unter dem »Synzytium«.

b) *Die Veränderung des Chorionzottenstromas.* Das Zottenstroma weist zwei Zelltypen auf: Hofbauersche und unregelmässige Zellformen. Die Hofbauerschen Zellen, deren Plasma nach Giemsa lila und mit Alcianblau färbbare Körnchen enthält, sind nur in der ersten Schwangerschaftshälfte anzutreffen. Das Plasma der unregelmässigen Zellen kann PAS-positive Körnchen enthalten. Die Zahl der Zottenstromzellen ändert sich bis zu einem gewissen Grade mit fortschreitender Schwangerschaft. Anfangs ist das Zottenstroma zellarm, dann vermehren sich die Zellen, und in der Mitte der Schwangerschaft enthält das Stroma die meisten Zellen. In der ersten Graviditätshälfte entwickeln sich auch die Bindegewebsfasern im Stroma. Nach Toluidinblaufärbung sehen wir Zotten, deren Inneres mit einer metachromatischen Gelsubstanz angefüllt und zellarm ist. Diese Substanz färbt sich mit Alcianblau sehr intensiv. Solche Zotten erscheinen nach Bindegewebsfärbung hell, fasernarm, ihr Stroma gibt keine PAS-Reaktion. Bei anderen Zotten weist die metachromatische Substanz ein sehr lockeres Netz auf, und hier finden wir bei der Färbung mit Azan oder nach Mallory bzw. nach Endes bereits schwach gefärbte feine kollagene Fäserchen. Am häufigsten sehen wir am mittleren Abschnitt des Zottenstromas nach Bindegewebsfärbung gut entwickelte kollagene Fasern, während die Zottenspitze und der Randabschnitt keine oder nur sehr wenige feine kollagene Fasern enthalten. Anderseits ist in diesem Bereich lila Metachromasie und Alcianblaureaktion anzutreffen. Diese Metachromasie verschwindet nach Inkubation mit 450 E Hyaluronidase, woraus hervorgeht, dass hier die Entwicklung der kollagenen Fasern des Zottenstromas stattfindet. Für diese Annahme zeugt auch die Literaturangabe, dass bei der Bildung der kollagenen Fasern die interzelluläre Hyaluronsäure mit Eiweissen in Kontakt kommt [25]. Diese Hyaluronsäure befindet sich hier wahrscheinlich im Gelzustand, weil sie nur so Metachromasie ergibt [4]. Nachdem sich die kollagenen Fasern aus der Grundsubstanz gebildet haben, verlieren sie ihre Metachromasie. Im Gegensatz zur Auffassung von Baker und Abrams [4] fanden wir, dass in der Produktion dieser metachromatischen Grundsubstanz Zytotrophoblastzellen die Hauptrolle spielen. Diese Auffassung stützen wir auf die Lage der metachromatischen Substanz, die fast immer unter

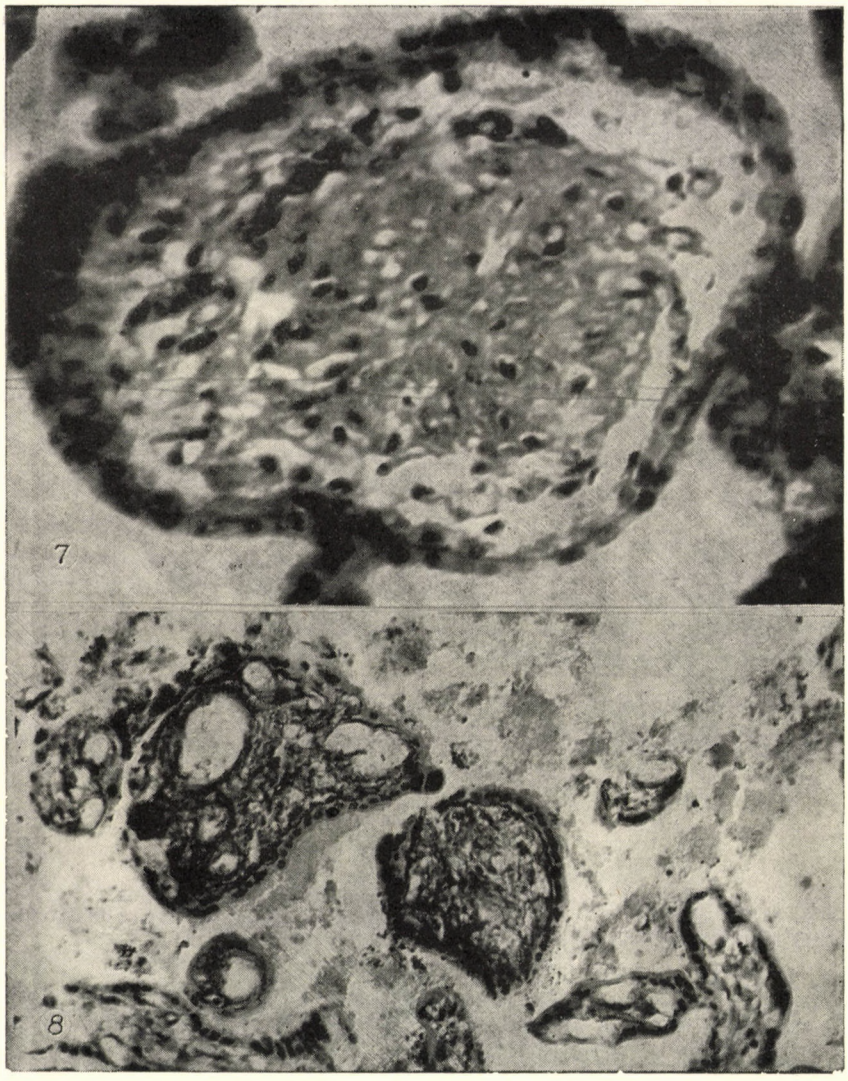


Abb. 7. Bürstensaum an der Synzytiumoberfläche. Die Zellkerne des »Synzytiums« liegen gleichmässig in seinem Protoplasma. Die Zytotrophoblasten bilden eine besondere Schicht. Im Zentrum des Zottenstromas haben sich kollagene Fasern gebildet, während zum Zottenrand hin keine oder nur sehr wenige kollagene Fasern zu sehen sind. Aus 1—2monatiger Schwangerschaft. Azan-Färbung

Abb. 8. Fibrinoide Degeneration und Verdickung der Membrana basalis im Stroma der Chorionzotte einer ausgetragenen Plazenta. Neunmonatige Schwangerschaft. Färbung nach *Weigert*

den Zytotrophoblasten zu finden ist. Daraus schliessen wir, dass die Bindegewebsfasern des Zottenstromas nicht nur durch das einwachsende Mesoderm, sondern auch lokal entstehen können. GROSSER [11] definiert diesen Prozess in der Weise, dass die Form der Zotten nicht von der Proliferation des Mesenchyms abhängt, sondern die beim Wachsen der Trophoblasten entstandene Höhle mit Mesoderm angefüllt wird. Auch elektronenmikroskopisch ist zu sehen, dass die kollagenen Fasern von der Zytotrophoblastschicht gebildet werden [33]. Im Gegensatz zu den Untersuchungen von WISLOCKI und DEMPSEY [32] halten wir die in den jungen Zotten anwesende metachromatische Substanz nicht für degenerativ, weil sie in zahlreichen, hauptsächlich in jungen und völlig intakten Zotten angetroffen werden kann und wir sie — wie oben bereits erwähnt wurde — als eine an der Entwicklung des Zottenstromas teilnehmende Substanz betrachten.

4. *Veränderungen in der ausgetragenen Plazenta*

a) *Erscheinungen in der Decidua capsularis und im Septum placentae.* An der zu den intervillösen Höhlen blickenden Oberfläche der Decidua basalis einer 22wöchigen Plazenta sind die Zellen zugrunde gegangen, und an ihrer Stelle befindet sich Fibrinoid. Mit Färbung nach Endes finden wir unter dieser fibrinoid degenerierten Partie in geringer oder grösserer Zahl Zellschatten und unter ihnen vermehrtes Hyalin. Ähnliche Erscheinungen sieht man auch auf der zum intervillösen Raum blickenden Oberfläche der Septum placentae. In den tieferen Schichten der Decidua, wo die Zellen intakt sind, ist die interzelluläre Substanz erhalten, und mit Toluidinblau kommt Metachromasie und mit Alcianblau positive Reaktion zustande.

In der Decidua basalis der ausgetragenen Plazenta ist ein grosser Teil der Zellen zugrunde gegangen und der Fibrinoidstreifen an der zur intervillösen Höhle blickenden Oberfläche verbreitert. Bei Färbung nach Endes finden wir anstelle der destruierten Zellen Hyalinvermehrung. Zwischen dem Fibrinoid und dem Hyalin besteht keine scharfe Grenze. Die fibrinoide Veränderung der Septum placentae ist noch ausgeprägter, und intakte Zellen sehen wir jetzt nur noch im Inneren der Septen.

b) *Die Veränderungen der Zottenhaut.* Das Epithel der Zottenhaut ist stellenweise ganz endothelartig abgeflacht, aber immer erhalten. Subepithelial liegt der Hypochorialstreifen. In dieser Masse sind stellenweise intakte, anderwärts die Fragmente zugrunde gegangener Zellen anzutreffen. Die Fasern des chorialen Mesoderms haben ihre für echte kollagene Fasern bezeichnende Struktur verloren und sich zu einer beinahe homogenen hyalinen Masse umgewandelt. Das Bindegewebe unter dem Amnionepithel hat seine faserige Struktur etwas besser bewahrt, aber einige Fasern sind auch hier hyalin degeneriert.

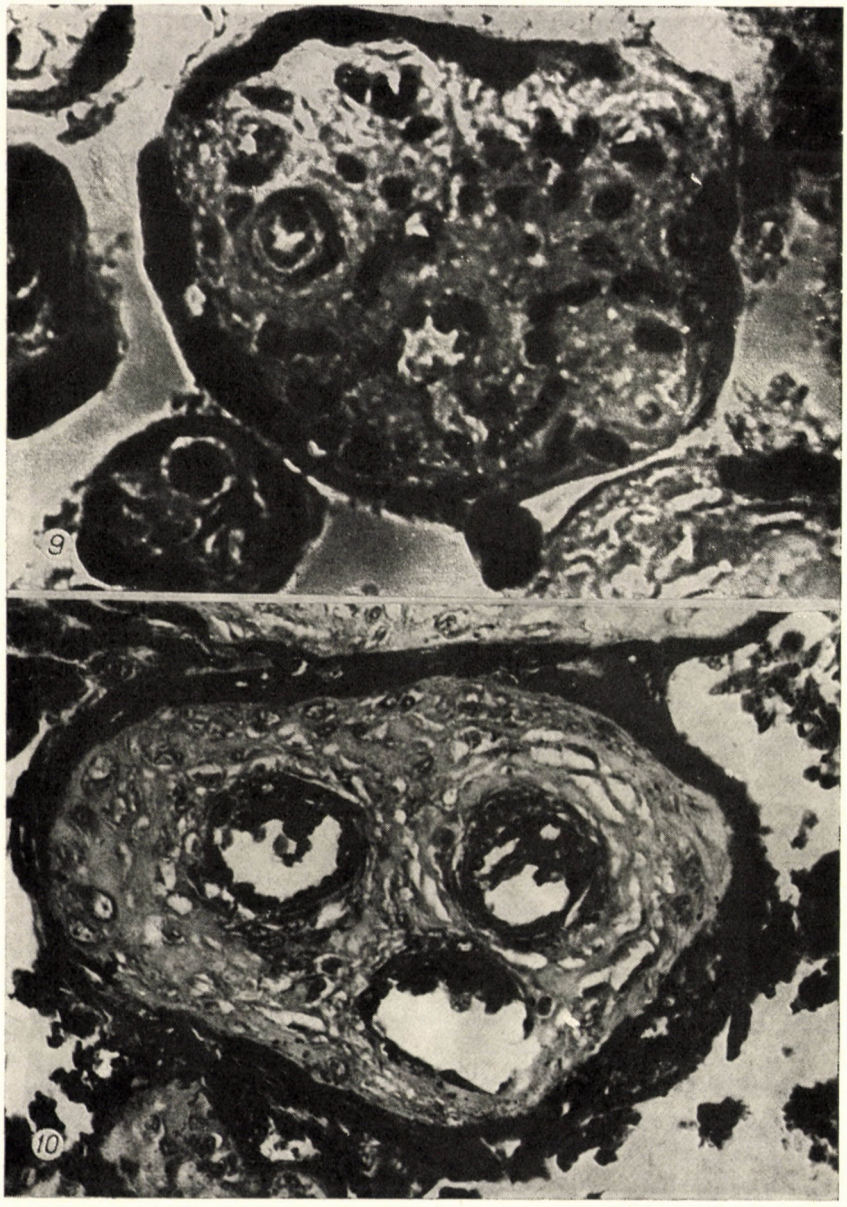


Abb. 9. Chorionzotte einer ausgetragenen Plazenta. Die Zellkerne der schmaler gewordenen »synzytialen« Schicht liegen unregelmässig im Protoplasma und bilden dort Kerngruppen. Das Zottenstroma ist verhältnismässig arm an Zellen und Fasern, aber reich an Gefässen. Neunmonatige Schwangerschaft. HE-Färbung

Abb. 10. Hyaline Degeneration des Zottenstromas. Neunmonatige Schwangerschaft. Färbung nach *Endes*

c) *Die Veränderung der Chorionzotten mit fortschreitender Schwangerschaft.* Am Ende der Gravidität findet man in den Präparaten mehr kleinere Zottenquerschnitte. Das Stroma einzelner — hauptsächlich kleinerer — Zotten ist homogen und fibrinoid degeneriert. An der Oberfläche dieser Zotten ist das Epithel oft noch vorhanden. In den intakten Zotten fällt ihre Stromaarmut sowie der Umstand auf, dass die verbliebenen Fasern hauptsächlich am Aufbau der Gefässwände teilnehmen, und zwar zusammen mit den Bindegewebszellen. Die Kapillaren liegen subepithelial, über ihnen ist das Epithel verschmälert und enthält oft keine Kerne. Zwischen einzelnen Zotten finden wir eine homogene Substanz (Fibrin), welche diese Zotten zusammenklebt. Wahrscheinlich handelt es sich hier um Infarktbildung.

d) *Die Veränderung der Trophoblasten.* Die Oberfläche der 22 Wochen alten Zotte ist nur noch mit »Synzytium« bedeckt. Das Plasma des »Synzytiums« mancher Zotten ist bereits azidophil, das anderer schwach basophil. Das »Synzytium« der ausgetragenen Plazentas ist stark verschmälert und hat keinen Bürstensaum. Sein Protoplasma ist ausgeprägt azidophil, was bei Färbung mit Methylgrün-Pyronin im Verlust der Pyroninophilie zum Ausdruck kommt. Die stark gefärbten kleinen Zellkerne bilden Gruppen im Protoplasma. Ihre Zahl ist anscheinend grösser als die der Kerne in der jüngeren »synzytialen« Schicht, wenn wir sie zu einem gewissen Plasmabereich ins Verhältnis setzen. Das Kubikvolumen der Kerne ist 48—65 μ^3 [13]. Mit der Feulgenschen Reaktion sind Kernfragmente zu sehen.

e) *Die Veränderung des Stromas der Chorionzotten.* Das Stroma der 22 Wochen alten Zotte enthält sehr viele Zellen. Bereits zu diesem Zeitpunkt ist zu beobachten, dass die Fasern am Mittelabschnitt der Zotten verdickt und einzelne Fasern hyalin degeneriert sind. Man sieht ferner die fibrinoide Degeneration einzelner kleiner Zotten. Das Stroma der ausgetragenen Zotten ist verhältnismässig zellarm. Die Fasern sind verdickt, haben ihre ursprüngliche, für kollagene Fasern bezeichnende Struktur verloren und sind in ziemlich grosser Zahl hyalin degeneriert. Viele kleine Zotten sind homogen, strukturlos geworden und fibrinoid degeneriert. Mit Endesscher Färbung ist deutlich zu sehen, dass das am Zentralabschnitt der Zotten befindliche Stroma ausgeprägtere hyaline Veränderungen aufweist, während die Fasern des subepithelialen Bindegewebes besser erhalten sind, obschon auch unter diesen frisches Hyalin enthaltende Fasern angetroffen werden können. Die degenerativen Veränderungen der Fasern der aus verschiedenen Schwangerschaftsstadien stammenden Plazentas sind nicht von gleichem Ausmass, die Ausdehnung der Degeneration steht mit der Zahl der Stromazellen im Zusammenhang.

Kurz zusammengefasst wurde folgendes festgestellt. Die Zellen und Drüsen der Decidua basalis enthalten viel Glykogen. Interzellulär und im Lumen der Drüsen sind schwefelhaltige saure Mukopolysaccharide anwesend. In diese Substanz sind kollagene Fasern eingebettet. Auf Wirkung der Tropho-

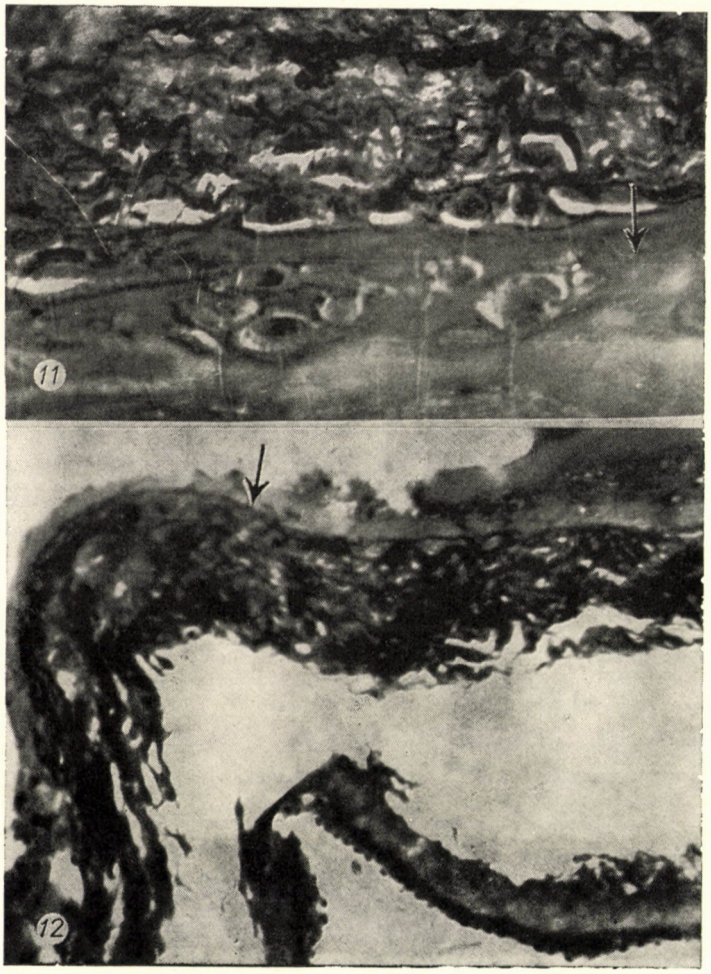


Abb. 11. Fibrinoid am Randabschnitt der Decidua basalis, in den tieferen Schichten hingegen Hyalin. Neunmonatige Schwangerschaft. Färbung nach *van Gieson*. Der Pfeil deutet auf das an der Oberfläche der intervillösen Höhle anwesende Fibrinoid

Abb. 12. Zottenhaut mit chorialem Mesoderm. An der Oberfläche sieht man den hypochorialen Fibrinoidstreifen und die hyaline Degeneration der Mesodermfasern. Unter dem Amnioepithel ist das Bindegewebe gleichfalls hyalin degeneriert. Der Pfeil deutet auf den hypochorialen Fibrinoidstreifen. Neunmonatige Schwangerschaft. Färbung nach *van Gieson*

blasten geht ein grosser Teil der Zellen zugrunde, und an ihrer Stelle vermehrt sich eine hyalin- bzw. fibrinoidhaltige degenerative Substanz, deren Abbau sehr langsam vor sich geht. Diese hyaline bzw. fibrinoide Veränderung ist in der ausgetragenen Plazenta auch an der Decidua basalis und an den Septum placentae deutlich zu sehen. Die Anzeichen dieser Veränderung vermag man bereits in der 22 Wochen alten Plazenta wahrzunehmen.

An den Chorionzotten können wir mit fortschreitender Schwangerschaft folgende Veränderungen beobachten: Die Schicht der hauptsächlich Glykogen und weniger Ribonukleinsäure sowie etwas Lipoid enthaltenden Zytotrophoblasten verschwindet nach dem 4. Monat und wird in das »Synzytium« aufgenommen. Lediglich in dieser Schicht (d. h. der Zytotrophoblastenschicht) findet mitotische Zellteilung statt. Das »Synzytium« ist anfangs reich an Ribonukleinsäure, Lipoiden und neutralen Fetten und enthält diese Stoffe später in immer geringerer Menge. Schliesslich schlägt die Basophilie des Protoplasmas im »Synzytium« in Azidophilie um. Die »synzytiale« Schicht wird schmaler, und Zellteilungen sind in ihr nicht mehr vorzufinden.

Die subepitheliale Membrana basalis ist verdickt. Das ganze Leben der Bindegewebsfasern des Zottenstromas läuft in den 9 Monaten der Schwangerschaft ab. Sie entstehen hier aus der Wechselwirkung der Hyaluronsäure und der Gitterfasern, dann funktionieren sie und bilden die Wand der Zottengefässe, und schliesslich kommt es zu ihrer hyalinen Degeneration. Das Ausmass der hyalinen Degeneration steht mit der Zahl der zwischen den Fasern anwesenden Zellen im Zusammenhang, weil die hyaline Degeneration durch die Anwesenheit der Zellen verzögert wird. Von den Stromazellen verschwinden die Hofbauerschen Zellen bereits am Anfang der Schwangerschaft, während die Zahl der unregelmässigen Zellen bis zur Mitte der Gravidität zu- und dann abnimmt. In der Zahl der Zellen und im Ausmass der hyalinen Degeneration sind individuelle Schwankungen zu beobachten. Die Stromafasern können sich nicht nur hyalin, sondern auch fibrinoid umgestalten. Die schwerste hyaline Veränderung und fibrinoide Degeneration sehen wir in der Zottenhaut.

Besprechung

Wir wollen versuchen, die beim Altern anderer Organe bzw. Zellen eintretenden Veränderungen mit den anlässlich des »Alterns« der Plazenta gefundenen zu vergleichen. Am häufigsten kommen folgende Erscheinungen vor:

1. Atrophie.
2. Umbildung der Nukleinsäuren, Eiweisse, Kolloide [Verschiebung des isoelektrischen Punktes (I. E. P.)].
3. Aufhören der Zellteilung, Verschiebung des Kern-Plasma-Verhältnisses.
4. Vermehrung pathologischer Stoffwechselprodukte, Mineralisation.
5. Veränderung der Mitochondrien mit fortschreitender Schwangerschaft.

1. Vermag man in der alternden Plazenta Atrophie wahrzunehmen? Bei anderen Organen bedeutet die Atrophie, dass sich die zelluläre Substanz bzw. das Parenchym vermindert und das Bindegewebe vermehrt. Ein anderes Zeichen der Atrophie ist die Gewichtsabnahme der Gewebe. EHRENBERG und

LIEBENOW [9] untersuchten die Veränderungen des Trockensubstanzgewichtes der Plazenta mit fortschreitender Schwangerschaft und fanden, dass das Trockensubstanzgewicht bis zum 7. Schwangerschaftsmonat zu- und dann langsam abnimmt, was ihrer Ansicht nach auf der Atrophie des Plazentargewebes beruht. Aus diesem Grunde sagt man, dass die Plazenta zwischen dem 7. und 9. Schwangerschaftsmonat altert. Ein Beweis der Atrophie, die Senkung des Trockensubstanzgewichtes, ist demnach vorhanden, doch ist auch die Verminderung der Zellzahl anzutreffen, was besonders für die Bindegewebszellen des Zottenstromas gilt, von denen wir nicht zu sagen vermögen, was aus ihnen wird, während sich die Atrophie der Trophoblasten in der Verschmälerung der Trophoblastschicht äussert, die bisweilen so stark in Erscheinung tritt, dass die »synzytiale« Schicht endothelartig dünn wird. Die Bindegewebsvermehrung in der gealterten Plazenta fällt gerade wegen des speziellen Aufbaus der Zotten nicht auf. Nach GRAY [10] ist in der ausgetragenen Plazenta am auffallendsten, dass das Bindegewebe resorbiert wird, aber das die Gefässe bildende Bindegewebe erhalten bleibt. In Anpassung an die vermehrte Blutmenge dilatieren die Gefässe, und das überflüssige Bindegewebe wird resorbiert. Diese Erscheinung ist zweifellos zu beobachten. Wir können also daraus die Schlussfolgerung ziehen, dass die Plazenta ebenso wie die anderen alternden Organe atrophisch wird, aber die Atrophie im Zusammenhang mit der speziellen Funktion des Organs etwas anders zustande kommt.

2. Die zweite Gruppe der mit dem Altern verbundenen Erscheinungen ergibt sich aus den Veränderungen der am Aufbau der Zellen und Gewebe teilnehmenden Eiweisse, Ribonukleinsäuren und Kolloide mit dem Alter. SINGER und WISLOCKI [26] untersuchten die Affinität des »Synzytiums« zu den sauren und basischen Farbstoffen und stellten fest, dass die Basophilie des »Synzytiums« mit fortschreitender Gravidität abnimmt und sich der IEP des »Synzytiums« mit dem Altern der Eiweisse in alkalischer Richtung verändert. Bei Methylgrün-Pyroninfärbung sahen auch wir, dass das Protoplasma des »Synzytiums« am Anfang der Schwangerschaft sehr ausgeprägt pyroninophil ist; diese Pyroninophilie wird zum Ende der Schwangerschaft hin schwächer, ja selbst die Basophilie schlägt bei Färbung mit Hämatoxilin-Eosin in Eosinophilie um. Diese Erscheinung kann zwei Ursachen haben. Erstens findet im »Synzytium« am Anfang der Gravidität sehr aktive Eiweisssynthese statt, bis diese Aufgabe von der Leber des Embryos übernommen wird. Zweitens kommen in den Nukleoproteiden des »Synzytiums« ähnliche Veränderungen zustande, wie sie in alterden Zellen festgestellt wurden. ANDREW [1] beschreibt, dass sich die Nisslsche Substanz in den Nervenzellen mit der Zeit schwächer färbt. Laut NIKITIN, BASSINA u. a. [23] wird der IEP der Zellen durch die Anwesenheit der Nukleinsäure stark in saurer Richtung verschoben, bei einer Verminderung der Nukleinsäuren kommt es hingegen zur Verschiebung des IEP in alkalischer Richtung. WOJNAR [35], NIKITIN und LJUBANOWA

[24] sowie die obigen Autoren haben die Verschiebung des IEP in alkalischer Richtung beim Altern festgestellt. Da die Menge der Nukleinsäuren in enger Beziehung zum Zellstoffwechsel steht, kann ihre Menge den indirekten Massstab des Zellstoffwechsels bilden. Ein direkter Beweis steht zwar nicht zur Verfügung, aber aus vorstehenden Ausführungen darf geschlossen werden, dass mit fortschreitendem Alter der Plazenta in ihrem Trophoblast Veränderungen zustande kommen, die auf Umbildungen ihrer Eiweisse und Kolloide hinweisen und den beim Altern der Eiweisse festgestellten Veränderungen entsprechen.

3. Mit obiger Frage hängt die des Aufhörens der Zellteilungen bzw. der Kernpyknose zusammen. MEDWEDJEW [20] fand, dass das Ausmass des Stoffwechsels der Zellen zwischen zwei Zellteilungen eine regelmässige Kurve beschreibt. Bei der Zellteilung kommt es zu einer jähen Erhöhung des Zellstoffwechsels, der dann bis zur folgenden Zellteilung langsam abnimmt. Die folgende Teilung der beiden neuen Zellen findet schon nicht zur gleichen Zeit statt, sondern die der einen erfolgt etwas später als die der anderen. Diese Erscheinung beruht darauf, dass bei der Zellteilung eine Mutter- und eine Tochterzelle entsteht. Dieser Beobachtung kommt nach dem letztgenannten Autor grosse Bedeutung zu, weil seiner Meinung nach in der Interphase die Aggregation der Zelleiweisse erfolgt und bei der Zellteilung Desaggregation und »Autodispersion« stattfinden.

Die zweite grundlegende Frage beim Altern ist die Änderung des Kern-Plasma-Verhältnisses im Zusammenhang mit dem Wachstum der Zellkerne [28]. Die Untersuchung dieser Frage steht in enger Beziehung zur Frage der Entstehung des »Synzytiums«. Mit fortschreitender Schwangerschaft vergrössert sich die »synzytiale« Oberfläche auf 6,5 m^2 [27]. Sowohl nach den Beobachtungen anderer Autoren als auch nach eigenen sind indessen Mitosen lediglich in den bis zum 4. Schwangerschaftsmonat anwesenden Zytotrophoblasten anzutreffen. Die Entwicklung der synzytialen Zellen lässt sich also auch damit nicht ganz erklären, dass die Zytotrophoblasten vom »Synzytium« aufgenommen werden. MAGROT [19] hat bei der Untersuchung der amitotischen Teilungen in der menschlichen Plazenta beobachtet, dass im »Synzytium« am Anfang der Schwangerschaft »regenerative«, an ihrem Ende »degenerative« Amitosen vorkommen. Wir vermochten im »Synzytium« weder Mitosen noch Amitosen zu beobachten, sahen aber, dass die Zellkerne im »Synzytium« der ausgetragenen Plazenta nicht gleichmässig verteilt, sondern in Gruppen anwesend sind (was eventuell als Zeichen der Amitose oder einer anderen Zellvermehrungsform aufgefasst werden kann). ANDREW [1] fand beim Altern von Nervenzellen amitotische Zellteilungen von »defensivem« Charakter. Die Zellkerne in den »Synzytien« sind klein, ihr Kubikvolumen macht 48—65 μ^3 gegenüber dem Kubikvolumen von 113 μ^3 der Kerne im 6 Wochen alten »Synzytium« aus [13]. Nach eigenen ebenso wie nach Be-

obachtungen von WISLOCKI, DEMPSEY und FAWCETT [34] sind die Kerne hyperchromatisch. Diese Erscheinung hängt wahrscheinlich mit der Kernpyknose zusammen, wofür auch der Umstand spricht, dass wir bei Anwendung der Feulgenschen Reaktion die Fragmente zerfallener Kerne im Plasma gefunden haben. Die Verschiebung der Kern-Plasma-Relation ist wahrscheinlich ebenfalls anzutreffen. Bei der menschlichen Plazenta stösst die Bestimmung des Kern-Plasma-Verhältnisses auf Schwierigkeiten, weil es sich lichtmikroskopisch in der Plazenta um ein »Synzytium« handelt, so dass wir uns nur auf subjektive Resultate stützen können. Wir beobachteten indessen, dass das Protoplasma des »Synzytiums« schmaler wird und sich die Zahl der Zellkerne im Vergleich zu den frühen Stadien relativ, aber möglicherweise auch absolut vermehrt; wenn wir daher die Gesamtheit der Zellkerne der Protoplasmamasse gegenüberstellen, so verschiebt sich der Quotient sehr wahrscheinlich zugunsten der Kerne. Nachdem den Zellkernen eine sehr grosse Bedeutung im Stoffwechsel der Zelle zukommt, kann angenommen werden, dass diese Vermehrung der Zellkerne auch hier als eine »defensive« Veränderung anzusehen ist.

4. Es wird angenommen, dass das Stabilwerden der Eiweissbindungen und die Verlangsamung des Stoffwechsels, die zur Vermehrung gewisser Substanzen führt, mit dem Altern zusammenhängt. In anderen alternden Organen handelt es sich bei diesen Substanzen z. B. um Fett oder irgendein Salz, gegebenenfalls um andere degenerative Stoffe. In Verbindung damit müssen wir auf zwei Fragen eingehen. Erstens auf den Ursprung des in der Plazenta anwesenden Fibrins bzw. Fibrinoids, zweitens auf die Frage der Veränderung des Stromas der Chorionzotten und der Basalmembran des »Synzytiums«. Unter den vermehrten degenerativen Substanzen der Plazenta ist das Fibrin bzw. Fibrinoid am meisten und längsten umstritten. Es gibt viele Auffassungen in dieser Frage. GROSSER [11] hält das plazentare Fibrinoid für eine erhalten gebliebene und degenerierte Zytotrophoblastinsel, die später von einer ähnlichen Degeneration des »Synzytiums« begleitet wird. TÖRŐ [27] hält das Fibrinoid gleichfalls für das Produkt zerfallener Zellen. Laut GRAY [10] ist im Umkreis der Zotten Fibrinoid anwesend, während die Zotten hyalin degenerieren. Auch LATTA und BEBER [17] glauben, die an der Zottenoberfläche anwesende Substanz sei fibrinoid. CLARK [7] und andere sind nicht dieser Ansicht, und halten mit BAHRMANN [3] sowie PEARSE, [25], dass das Fibrinoid nekrotisches Kollagen sei. Nach PEARSE [25] kommt das Fibrinoid bei der physikalischen Läsion der kollagenen Fasern zustande. SINGER und WISLOCKI [26] meinen, Fibrin sei eine körnige oder fibrilläre, Fibrinoid eine homogene glasartige Substanz, doch könne es sich auch umgekehrt verhalten. Im Zusammenhang mit der Fibrinoidbildung sind wir der Auffassung, dass es tatsächlich aus der Läsion der kollagenen Fasern bzw. der interzellulären Substanz entsteht, zu der sich auch der Rest der destruierten Zellen gesellt,

dass aber diese Läsion nicht nur mechanischer, sondern auch chemischer Natur sein kann. Im Laufe unserer Untersuchungen fanden wir, dass in den Decidua-Inseln, deren Chorionzotten bereits angegriffen sind, viele Zellen zugrunde gehen und an ihrer Stelle ebenfalls eine interzelluläre Substanz erscheint, die sich vermehrt und der Abbautätigkeit der Trophoblasten gegenüber lange resistent bleibt.

Mittlerweile verändert sich völlig die Natur dieser Substanz im Vergleich zu der der bisher angetroffenen interzellulären Substanz, die lila Metachromasie mit Toluidinblau geht verloren, statt dessen ist grüne Metachromasie zu beobachten. Mit Hyaluronidase wird sie nicht verdaut, von Alcianblau nicht gefärbt, dagegen färbt sie sich mit PAS und den üblichen Fibrinoidfärbungen. Diese Substanz, Fibrinoid, ist auch im Inneren sehr junger Zotten zwischen »Synzytium« und Trophoblasten zu beobachten, was sich damit erklären lässt, dass von den Chorionzotten auch grössere, beinahe makroskopisch sichtbare Decidua-Inseln von der Decidua basalis abgelöst werden. Das »Synzytium« bedeckt die Oberfläche der Decidua-Insel und nur die Zytotrophoblasten stehen mit der Decidua in unmittelbarem Kontakt. Es verhält sich aber nicht nur bei derart grossen Decidua-Inseln auf diese Weise, sondern auch bei 50—100 μ grossen Inseln, wenn der Abbau nur von einer Zotte oder nur dem Abschnitt einer Zotte durchgeführt wird. Dieser Abbauprozess kann auch sehr langsam vor sich gehen, so dass die Zytotrophoblasten bereits längst verschwunden sind und das aus den Decidua-Inselchen stammende Fibrinoid noch immer zwischen dem »Synzytium« und Stroma der Zotte eingeschlossen ist. Dieses Fibrinoid hemmt die Blutversorgung der Zotte. Obige Erscheinung schliesst nicht die Möglichkeit aus, dass auch das Stroma der alten Zotten fibrinoid degeneriert. Dass es sich bei der fibrinoiden Umbildung der Decidua um die Folge einer chemischen Wirkung handeln kann, geht daraus hervor, dass die fibrinoide Umgestaltung auch an der zu den intervillösen Höhlen blickenden Oberfläche der Decidua basalis zustande kommt, während die tieferen Schichten eher hyalin degenerieren. Ebenso findet man fibrinoide Degeneration auch an den Randteilen der Septum placentae, wo die chemische Wirkung der Chorionzotten zur Geltung kommt. Ferner beweist die Entstehung des Hypochorialstreifens, dass sich auch das Kollagen des Chorialstromas fibrinoid umbilden kann.

Die andere Gruppe von Phänomenen, mit denen wir uns befassen wollen und der wir in der Frage des Alterns der Plazenta grosse Bedeutung beimessen, betrifft die Umbildung des Stromas der Chorionzotten. Wir haben bereits darauf hingewiesen, dass im Stroma der Chorionzotten eine zunehmende Rückentwicklung beobachtet werden kann, aber die Fasern, welche die Wand der Gefässe bilden, erhalten bleiben. Die Wand der Gefässe und auch das Zottenstroma besteht hauptsächlich aus kollagenen Fasern, die gegen Ende der Schwangerschaft ihren ursprünglichen Aufbau verlieren und hyalin de-

generieren. Ebenso verändert sich die Basalmembran, die sich sehr stark verdickt und hyalin wird. Diese Umgestaltung des Zottenstromas wurde auch von GRAY [10] und COWDRY [8] wahrgenommen. Laut COWDRY kann diese Erscheinung nicht die Ursache der Zotteninvolution sein. Naturgemäss kann diese Veränderung nicht die einzige Ursache der Involution darstellen, doch unterliegt es keinem Zweifel, dass sie eine grosse Rolle im Zustandekommen der Veränderungen spielt, die in den Chorionzotten stattfinden. Laut BOGOMOLETZ [5] ist das Bindegewebe das Verbindungsglied zwischen den Kapillaren und den Geweben, und bei der Insuffizienz des Bindegewebes sei der Stoffwechsel der Gewebe schwer geschädigt. HUZELLA [14] äussert über die Bindegewebsfasern, sie könnten nicht starr sein, weil sie dann die Zustandsveränderungen der Organe nicht zulassen würden. Diese Frage erscheint noch komplizierter bei einem Organ, das über keine nutritiven Gefässe verfügt und dessen beinahe ganzes Bindegewebe am Aufbau von Gefässen teilnimmt. Der Umstand, dass der die Resorption bedingende Bürstensaum an der Oberfläche des »Synzytiums« spärlicher wird, führt zur Verlangsamung der Resorption, die durch die Verdickung der Basalmembran noch mehr beeinträchtigt wird. Die mangelnde Elastizität einer Barrierenseite führt auch zur Speicherung gewisser Stoffwechselprodukte (Ureum) [2]. Hierdurch wird im weiteren die Nährstoffaufnahme aus dem mütterlichen Blut und die Abgabe anderer Zersetzungsprodukte dorthin erschwert. Diese Verlangsamung des Stoffwechels wirkt natürlicherweise auch auf die Wand der Gefässe zurück, deren Bradytrophie zunimmt. BÜRGER [6] fand bei der Untersuchung des Alterns der Gefässe anderer Organe, dass die Gefässwand dicker wird und dies zu ihrer relativen Bradytrophie führt. So erscheint im Zentrum des Zottenstromas bereits in der 22. Woche Hyalin. Der Hyalinisationsprozess geht zentrifugal, d. h. vom Zottenzentrum zum Zottenrand vor sich. Wir haben es also mit einem Prozess zu tun, in dem jedes Kettenglied auf die übrigen rückwirkt und schliesslich so schwere Veränderungen entstehen, dass das weitere Leben des Plazentargewebes unmöglich gemacht wird. WEIGERT [30] hält die hyaline Umbildung sowohl des Kollagens wie des Fibrins für möglich. Die Analogien der im Zottenstroma vor sich gehenden Erscheinungen sind auch in anderen alternden Organen anzutreffen. NAGORNÜJ [22] stellt in der Reihenfolge des Alterns der verschiedenen Organe das Altern der Substanz zwischen Bindegewebe und Zelle an die zweite Stelle, und zwar deswegen, weil die Bindegewebsfasern über keine Autoreproduktionsfähigkeit verfügen und daher rascher altern. Laut NAGORNÜJ [22] vermehrt sich mit dem Alter die Menge der metaplasmatischen Elemente (Sehnen, Faszien, Fasern usw.), die später degenerieren. Vielleicht lässt sich damit auch die Erscheinung erklären, dass die degenerativen Veränderungen der Fasern durch die Anwesenheit der Bindegewebszellen verzögert bzw. herabgesetzt werden. Im Zusammenhang mit dem Altern hat HARANGHY [12] die hyaline Umwandlung der Ge-

fässe in den weiblichen Geschlechtsorganen und COWDRY [8] in den kleinen Hirngefässen sowie in den Nierenglomerula festgestellt. Auch daraus sehen wir, dass durch die Veränderung der Barriere zwischen Gefässen und Plazenta die Anhäufung von Schlackenstoffen ermöglicht wird, die rückwirkend die Trophie der Gewebe weiter verschlechtert.

5. In bezug auf die Mitochondrien wissen wir aus den Untersuchungen von WISLOCKI, DEMPSEY und FAWCETT [34], dass das «Synzytium», welches bei beginnender Schwangerschaft viele Mitochondrien enthält, mit dem Altern der Plazenta arm an Mitochondrien wird.

Da das Altern nach Auffassung der ungarischen Gerontologen keine Krankheit, sondern ein im lebenden Organismus selbst vorhandener Widerspruch ist, dessen spezielle morphologische und histochemische Anzeichen auch in der menschlichen Plazenta angetroffen werden können, halten wir die Plazenta für eines der am raschesten alternden Organe, die als zweckmässiges Modell für die Untersuchung des Alterns zu dienen vermag.

Zusammenfassung

Um festzustellen, ob in der menschlichen Plazenta dem Altern anderer Organe gleichende Veränderungen angetroffen werden können, wurden nach mehreren Methoden menschliche Plazentas verschiedenen Alters untersucht. Die bei anderen alternden Organen anwesenden Erscheinungen, wie Atrophie, Verschiebung des isoelektrischen Punktes in alkalischer Richtung, Abnahme der Basophilie und Zunahme der Azidophilie, d. h. die Senkung des Ribonukleinsäuregehaltes, das Aufhören der mitotischen Zellteilungen, die Verschiebung des Kern-Plasma-Verhältnisses, Kernpyknose, die Vermehrung gewisser degenerativer Substanzen, die Verdickung der Membrana basalis sowie die partielle hyaline Degeneration des Stromas waren auch in der Plazenta anzutreffen.

Es wird angenommen, dass das ganze Leben der Zottenfasern binnen den 9 Monaten der Gravidität abläuft. Ferner wird die Meinung vertreten, dass das plazentare Fibrinoid durch die chemische Degeneration der interzellulären Substanz und der in ihr anwesenden kollagenen Fasern ensteht. Schliesslich wird die menschliche Plazenta als Modell für die Untersuchung des Alterns empfohlen.

LITERATUR

1. ANDREW, W. (1956): Structural Alterations with Aging in the Nervous System. J. chron. Dis. *3*, 575. — 2. ANDRISKA, J.: Persönliche Mitteilung. — 3. BAHRMANN, E.: zit. PEARSE. — 4. BAKER, B. L., ABRAMS, G. D. (1955): The physiology of connective tissue Ann. Rev. Physiol. *17*, 61. — 5. BOGOMOLETZ, A. A.: zit. HARANGHY. — 6. BÜRGER, M. (1954): Altern und Krankheit. Thieme, Leipzig. S. 107. — 7. CLARK, E.: zit. PEARSE. — 8. COWDRY, E. V. (1939): Problems of ageing. Baillière, Tindall & Cox, London. S. 136—141; 411—413. — 9. EHRENBERG, R., LIEBENOW, W.: zit. BÜRGER. — 10. GRAY, J. D. (1957): The problem of spontaneous abortion (IV). Amer. J. Obst. Gynec. *74*, 111. — 11. GROSSER, O. (1933): Human and comparative placentation. Lancet. May 13th 999., u. 20th, 1053. — 12. HARANGHY, L. (1953): Az öregség az orvostudományban (Das Altern in der Medizin). Magy. Tud. Akad. Orvostud. Oszt. Közl. *4*, 421. — 13. HINTSCHE, E. (1936): Beobachtungen über die Korngröße menschlicher Plazentazellen. Z. mikr.-anat. Forsch. *39*, 45. — 14. HUZELLA, T. (1942): A sejtközösség szervezete (Die Organisation der Zellgemeinschaft). Egyetemi Nyomda, Budapest. S. 36. — 15. KISZELY, GY. (1958): A gerontologia biológiai vonatkozásai (Die biologischen Beziehungen der Gerontologie). Abteilung für Gerontologie der Ungarischen Biologischen Ges. Fortbildungskursus (Vortrag). — 16. KISZELY, GY., BARKA, T. (1958): Gyakorlati mikrotechnika és hisztokémia (Praktische Mikrotechnik und Histochemie). Medicina, Budapest. S. 107. — 17. LATTA, J. S., BEBER, CH. R. (1957): The Differentiation of a Special

Form of Trophoblast in the Human Placenta. Amer. J. Obst. Gynec. *74*, 105. — 18. LILLIE, R. D. (1954): Histopathologic Technic and Practical Histochemistry. Blakiston, New York. S. 296. — 19. MAGROT, T.: Persönliche Mitteilung. — 20. *Медведев, Ж. А.* (1953): Биохимические закономерности роста, старения и обновления клеточных форм живой материи. Успехи современной биологии *35*, 338. — 21. *Медведев, Ж. А.* (1952): Теория проф. А. В. Нагорного остарении организма. Физ. журн. *38*. 523. — 22. *Нагорный, А. В.* (1948): Старение и продление жизни. Государственное Издательство «Советская Наука», Москва. S. 75. — 23. *Никитин, В. Н., Басина, Ю. А., Батозская, Т. А., Брайловская, С. А., Воловик, М. П., Рудаева, А. В.* (1952): Возрастные изменения электро-коллоидальных свойств протоплазмы тканей кроликов при разном типе их выращивания. Журн. Общей Биол. 13, 270. — 24. Nikitin V. N. Ljubanowa: zit. *Никитин.* — 25. PEARSE, A. G. E. (1954): Histochemistry. Churchill, London. S. 81—87, 90—94. — 26. SINGER, M., WISLOCKI, G. B. (1948): The affinity of Syncytium, Fibrin and Fibrinoid of the Human Placenta for Acid and Basic Dyes under Controlled Conditions of Staining. Anat. Rec. *102*, 175. — 27. TÖRÖ, I. (1942): Az ember fejlődése (Die Entwicklung des Menschen). Tisza István Nyomda, Debrecen. S. 121. — 28. TÖRÖ, I. (1953): Öregedés biológiai problémái (Die biologischen Probleme des Alterns). Magy. Tud. Akad. Orv. Tud. Oszt. Közl. *4*, 401. — 29. WARTHIN, A. S.: zit. COWDRY. — 30. WEIGERT, C.: zit. HUZELLA. — 31. VIRCHOW, R.: zit. Нагорный. — 32. WISLOCKI, G. B., DEMPSEY, E. W. (1948): The Chemical Histology of the Human Placenta and Decidua with Reference to Mucopolysaccharides, Glykogen, Lipids and Acid Phosphatase. Amer. J. Anat. *83*, 1. — 33. WISLOCKI, G. B., DEMPSEY, E. W. (1955): Electron Microscopy of the Human Placenta. Anat. Rec. *123*, 133. — 34. WISLOCKI, G. B., DEMPSEY, E. W., FAWCETT, D. W. (1948): Some Functional Activities of the Placental Trophoblast. Obst. and Gyn. Surv. *3*, 604. — 35. WOINAR, A. S.: zit. Никитин.

ПРОБЛЕМЫ СТАРЕНИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ ПЛАЦЕНТЫ

М. НАДЬ

Различными методами проводились исследования человеческой плаценты, в целях установления, можно ли выявить на человеческой плаценте изменения, подобные старению прочих органов. Были обнаружены следующие, имеющие место в случае старения других органов явления: атрофия, смещение IEP в щелочном направлении, уменьшение базофилии и повышение ацидофилии, значит, уменьшение содержания рибонуклеиновой кислоты, прекращение митоза, смещение соотношения ядро плазма, ядерный пикноз, размножение определенных веществ дегенеративного характера, утолщение основной перепонки, гиалиновое перерождение одной части стромы. Предполагается, что в течение 9 месяцев беременности протекает весь жизненный период соединительно-тканных волокон ворсинчатой стромы. По мнению автора плацентарные фибриноиды возникают путем химического перерождения межклеточного вещества и содержащихся в последнем коллагенных волокон. Автор предлагает применять человеческую плаценту в качестве модели для исследования старения.

AGING OF THE HUMAN PLACENTA

M. NAGY

Human placentas of different pregnancy periods were examined by means of various methods to establish the changes due to aging. Aging phenomena occurring in other organs, such as atrophy, a shift of the isoelectric point towards the alkaline, decrease of basophilia and increase of acidophilia, thus decrease of the ribonucleic acid contents, cessation of karyokinesis, shift in the nucleus-plasma relation, accumulation of certain degenerative substances in nucleic piknosis, the thickening of the basal membrane, hyaline degeneration of part of the stroma were found in the placentas. It is accordingly presumed that the 9 months of gestation embrace the whole life of the connective fibres in the villous stroma. This supports the view that the formation of placental fibrinoid is due to the chemical degeneration of the intercellular substance and the collagen fibres. The human placenta is recommended as a model for studying processes due to aging.

Dr Mária NAGY, Budapest, IX., Tűzoltó u. 58. Ungarn

Department of Histology and Embryology of the University Medical School, Budapest
(Director: Prof. I. Törő)

THE HUMAN THYMUS GLAND: THE PROBLEM OF THE THYMUS-MAST-CELLS

Gy. Csaba

(Received June 21, 1959)

In previous reports it was shown that in conditions associated with tissue proliferation the thymus of the rat and the mouse exhibited a uniform tissue reaction. For example, pregnancy, tumours, the proliferative form of tuberculosis provoked an increase in the number the corpuscles of Hassall, the appearance in them of a considerable amount of PAS-positive substance; at the same time, many PAS-positive thymocytes and a strong mast cell reaction were observed. This process was taking place in each of the above-mentioned conditions, though there were differences in rate, depending on the rapidity of the pathological sequence of events [1, 2]. Similar reactions were noted in response to other effects as well [8, 9, 10].

Our experiments have proved that mast cells were formed in the thymus during certain phases of ontogenetical development and that explanted thymus cells were capable of producing metachromasic heparin from broken-down heparin (*i. e.* heparin showing PAS-positivity only). Both the cells of the epithelial reticulum and the thymocytes were found to convert heparin; the cells of the spleen and lymph nodes were not capable of performing this [2]. This reaction of the thymus in response to stress, but first of all to effects associated with tissue proliferation was observed to occur in several animal species (rat, mouse, guinea pig), and it has been decided to study human thymus glands in order to determine whether the above observations were applicable to man. This has been the principal aim of the present studies.

Methods

78 human thymus glands removed shortly after death were examined. Care was taken to get thymus glands from subjects of various age groups and from both tumorous and non-tumorous cases. The age groups are shown in *Table I*, the classification according to cause of death in *Table II*.

The thymus gland or the adipose thymus was studied histologically, excising a random specimen, about 1 cu. cm in size and fixing it in Carnoy's fluid. After embedding in paraffine sections were cut at 2 or 4 planes and prepared by the periodic acid-Schiff, or tri-PAS, Giemsa and toluidine blue techniques.

Table I

Age	Number of cases
foetus	6
0— 1 year	7
1—16 years	10
16—30 years	5
30—50 years	10
50—70 years	15
70—81 years	12
age unknown	13

Table II

Cause of death	Number of cases
malignant tumour	22
bacterial, viral disease	34
circulatory failure	7
other conditions (death, following surgery; agranulocytosis; uraemia, contusio cerebri, marasmus senilis etc.)	6
undiagnosed disease	4
foetal asphyxia	5

Results

The *foetal thymus glands* were compact; lymphatic tissue abound in them. There were numerous big and slightly swollen corpuscles of Hassall, many of them containing PAS-positive substance. There were few mast cells.

At the age of from *0 to 1 year* the pattern was closely similar except that there were more corpuscles of Hassall and more mast cells in the capsule and at sites also in the cortex.

In the age group of from *1 to 16 years* the thymus showed great individual variations. In the thymus from a child 7 years of age an excessive increase of fat and connective tissue was seen, whereas in some children around 15 years of age the thymus was still intact. The number of the corpuscles of Hassall and of the thymocytes was mostly on the decrease, but the epithelial-lymphatic tissue was still preponderating over the fatty and connective tissues.

In this group there were two children with myeloid leucaemia; one child was 5, the other 7 years old. In both glands masses of mast cells, in some visual fields as many as 30 or 50 were visible both in the cortex and the medulla *(Fig. 1)*. Their nuclei were similar to those of thymocytes. A similar massed

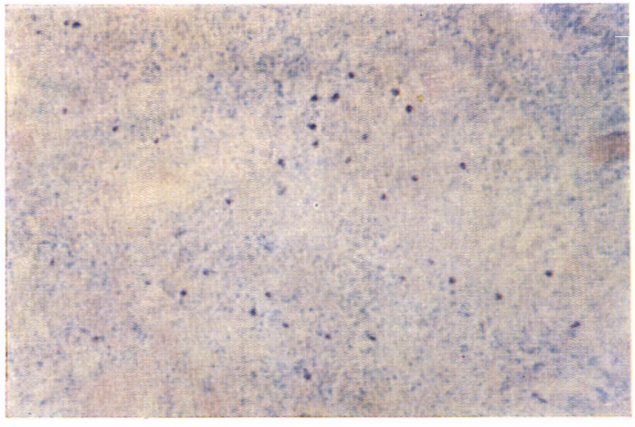


Fig. 1. Thymus from a child 5 years of age died of myeloid leucaemia. Mast cell reaction. Giemsa, ×200

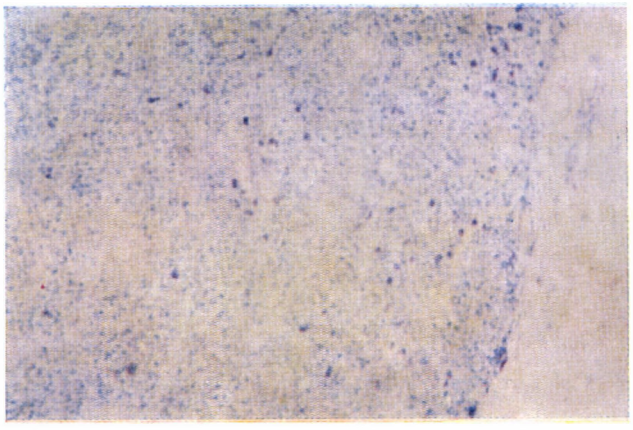


Fig. 2. Thymus from a child 12 years of age, died of agranulocytosis. Metachromasia of thymocytes and regular mast cells. Giemsa, ×200

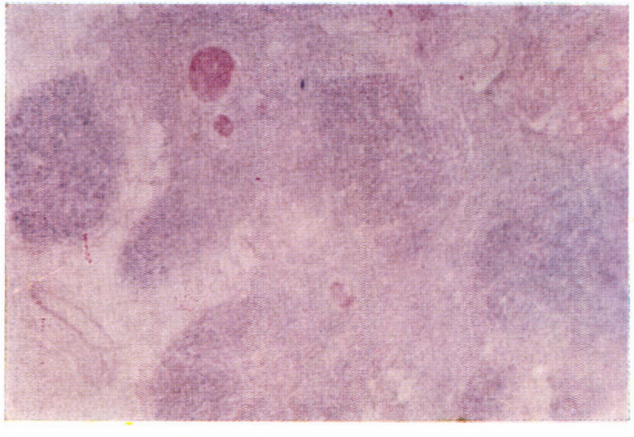


Fig. 3. Thymus from a subject 40 years of age, died of tetanus. Many PAS-positive cysts, minimal fatty tissue, complete thymus. PAS, ×100

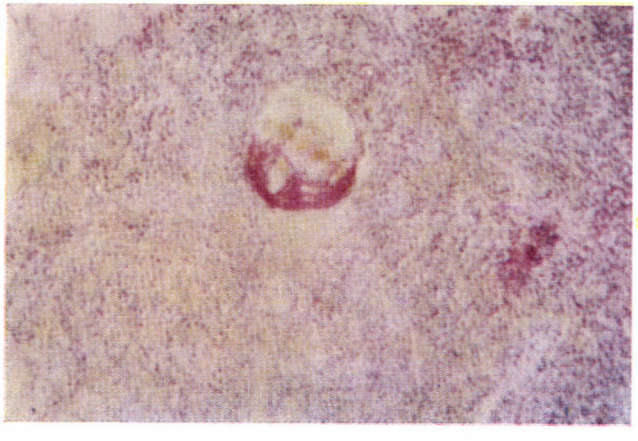


Fig. 4. Thymus from a subject who had died of meningitis at the age of 57 years. Corpuscle of Hassall containing PAS and orange-positive substance. Tri-PAS, ×200

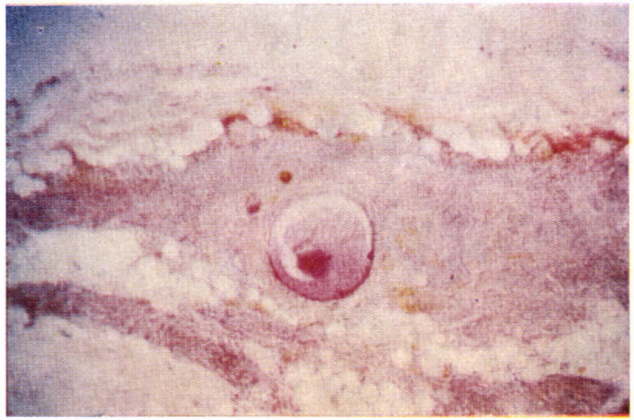


Fig. 5. Thymus from a subject who had died of leucaemia at the age of 60 years. Big PAS-positive cyst and small corpuscles of Hassall. Tri-PAS, ×100

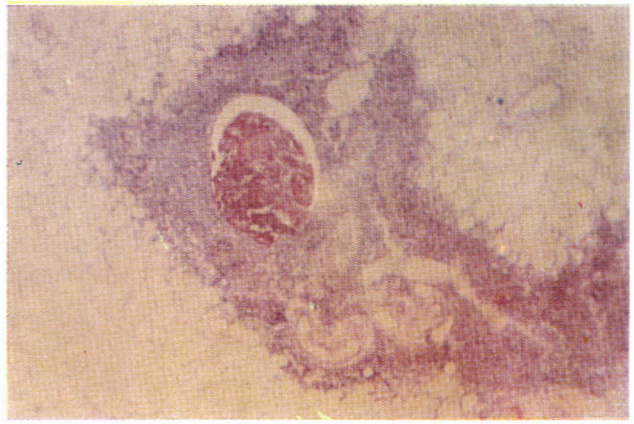


Fig. 6. Thymus from a subject who had died of tetanus at the age of 58 years. Cyst filled with PAS-positive substance. PAS, ×100

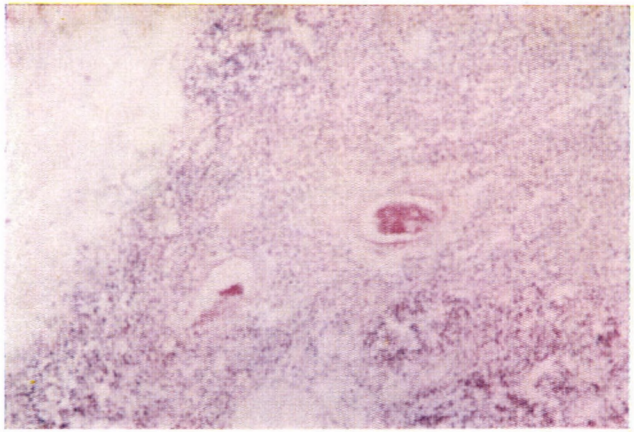


Fig. 7. Thymus from a subject who had died of pneumonia at the age of 58 years. Many corpuscles of Hassall containing PAS-positive substance. Big thymus, minimal fatty tissue. PAS, ×100

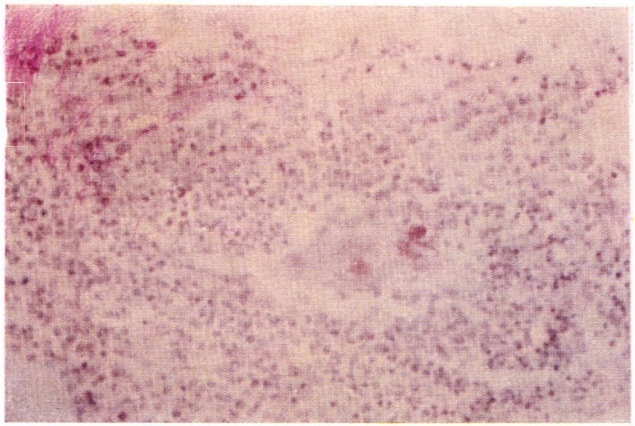


Fig. 8. Same as *Fig. 7.* Epithelial islet with PAS-positive substance. PAS, ×450

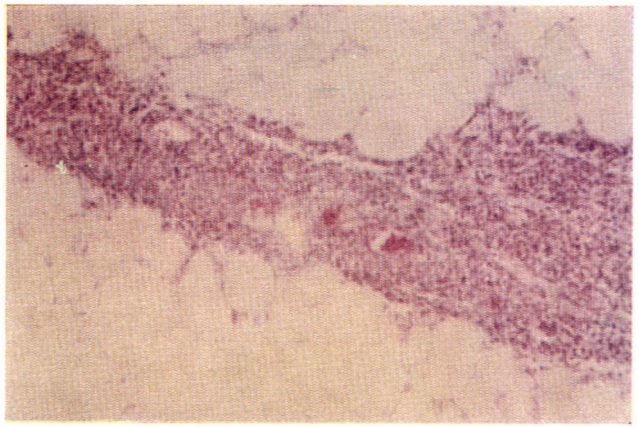


Fig. 9. Thymus from a subject who had died of influenza at the age 79 years. Cysts filled with PAS-positive substance, corpuscles of Hassall, epithelial elements. PAS, ×200

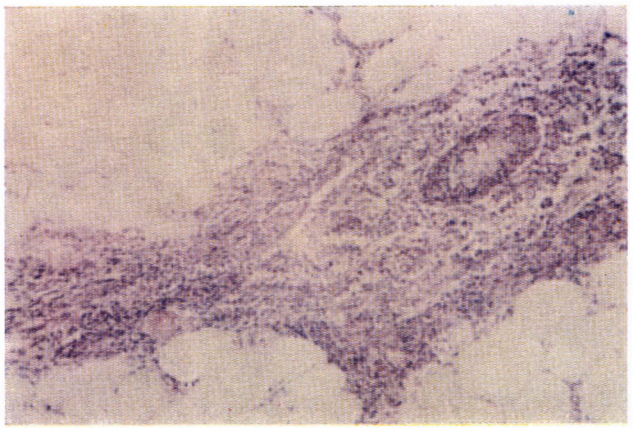


Fig. 10. Thymus from a subject aged 81 years. Small PAS-positive cyst, epithelial elements. PAS, ×200

appearance of mast cells was observable in the thymus of a child (aged 12 years) with agranulocytosis *(Fig. 2)*. In the thymus from other children of similar age the number of mast cells was normal, though more than in the age group of 0—1 year.

The pattern in the *16 to 30 years* age group was just as variable as in the previous one. A patient who had died of encephalitis at the age of 27 exhibited a regular thymus adiposus. At the same time most of the glands contained significant quantities of thymus tissue, about as much as fat. At many sites there was a marked mast cell reaction to be seen.

In the age group *30 to 50* the pattern also varied. The thymus from an individual 40 years of age contained as much epithelio-lymphatic tissue as is regular at 20 years of all *(Fig. 3)* but in most cases fat was preponderating over thymus tissue. However, the PAS-positive cysts and the conversion of cells into mast cells were detectable in every thymus without exception. The majority of the thymus glands exhibited well-developed, young corpuscles of Hassall containing PAS-positive substance. In the *50 to 70* years age group the thymus was fatty but just as in the previous group thymic matter was present in almost every gland, with corpuscles of Hassall containing much PAS-positive substance, and with an increased number of mast cells *(Figs. 5, 6, 7, 8)*. Epithelial elements other than those forming the corpuscles of Hassall also abounded.

In the *70 to 81 years* age group fatty tissue was preponderating but the epithelial-lymphatic matter was still detectable, with epithelial cysts filled with PAS-positive substance and young corpuscles of Hassall *(Figs. 9, 10)*. At many sites the thymocytes were metachromasic and some mast cells exhibited hypergranulation and signs of destruction.

The thymus from *tumorous* patients did not differ from those of other individuals. Although some of these glands (especially those from young subjects) contained many corpuscles of Hassall, almost no PAS-positive substance was found in them.

Discussion

As it has been mentioned in the introduction, the purpose of the present study was to determine whether the results of our animal experiments would be valid for man.

The first and most important question is whether the thymus is at all functioning in the adult man and whether it plays any role in the organism of adults. The view has been universally accepted that the thymus ceases to be an active factor in the organism by the end of puberty [4, 5, 6, 7). Our experiments however indicate that the function of the thymus must be taken into account in more advanced age as well. If it is realized that con-

siderable quantities of epithelial elements capable of producing PAS-positive substance occur in the thymus of subjects over 70 years of age and if we accept the view that the production of the PAS-positive substance is inherent in the gland's function, it will be clear that the thymus is still active at that age, even though in a reduced measure [3]. We feel rather reluctant to accept the view that a quantitative decrease in thymic matter would by itself indicate that the thymus is not any longer necessary or that it cannot function at a time when the morphological signs of active function are present. We think that the size of some endocrine gland alone will not decide whether or not the gland is functioning, either in the qualitative or in the quantitative sense.

The basis of our reasoning is that the production of PAS-positive substance is an important feature of the function of the thymus. Our earlier experiments proved that any time the thymus is activated this PAS-positive substance increases in quantity, then it leaves the gland mainly by cellular transport, forming the metachromasic substance of mast cells. When the thymus empties itself, the amount of this PAS-positive substance also decreases. We believe that the evidence we obtained *in vitro* and *in vivo* convincingly prove this view. Thus, a similar phenomenon in the human thymus should be interpreted in the same way as in the animal experiments. In view of the fact that this representation of thymus function was demonstrable in every age group (including senile age) we feel bound to state that the adipose thymus is a functioning thymus, though its activity is reduced.

A further problem is that of the mast cells. Most of the human thymus glands examined exhibited a marked mast cell reaction, not only in the marginal areas and the capsule of the tymus, but in the cortex and medulla as well. Metachromatic substance was frequently present in thymocytes. These characteristics were not restricted to certain age groups, they occurred at every age.

The thymus glands from subjects who had died of malignant tumour showed no substantial differences from the others. The divergence from our animal experiments might have been due to the fact that while the experimental tumours and thymus glands were removed for study at predetermined times, the human thymus glands were examined in the end stage, after death.

The thymus glands from the cases of leucaemia merit separate consideration. An extreme degree of mast cell formation was observable in those glands, but exclusively in cases of myeloid leucaemia. In a case of lymphoid leucaemia compact lymph tissue or lymph nodes free of mast cell reaction were found throughout the thymus. All these indicate that in the thymus the intense leucaemic cellular proliferation manifests itself with a mast cell reaction.

Summary

Seventy eight human thymus glands from autopsy material have been studied to determine whether the tissue reaction previously observed in animal experiments was detectable in them. The mast cell reaction, the increase of PAS-positive substance was detectable in the human thymus glands. Actively functioning corpuscles of Hassal were found in the thymus glands of aged subjects. On the basis of the evidence obtained it has been concluded that in adult age the thymus gland is still functioning.

REFERENCES

1. Csaba, Gy., Törö, I., Ács, T., Kiss, F. I.: (1960) The behaviour of the thymus in conditions associated with tissue proliferation. Acta Morph. Hung. **9.** 187 — 2. Csaba, Gy., Törő, I., Kapa, E.: (1960) Provoked tissue reaction of the thymus in tissue culture. Acta Morph. Hung. **9.** 197. — 3. Hoepke, H. (1941): Das Thymusproblem. Dtsche med. Wschr. *67*, 6. — 4. Möllendorff, W. (1927): Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. Springer, Berlin, *2*, 1. — 5. Patzelt, V. (1948): Histologie. Urban & Schwarzenberg, Wien. — 6. Sós, J. (1949): Kórélettan. Magyar Orvosi Könyvkiadó Társulat, Budapest. — 7. Tessereaux, H. (1953): Physiologie et pathologie du thymus. J. A. Barth, Leipzig. — 8. Törő, I. (1955): A csecsemőmirigy histophysiologiája. Debreceni Orvosegyetem Évkönyve. 1—5. — 9. Törő, I. (1957): Histologische Beiträge zur Funktion der Thymus. Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft, 54. Versammlung in Freiburg/Br. — 10. Törő I., Aros, B. (1958): Die Gewebsreaktion des Thymus auf verschiedene Einwirkungen. Acta Morph. Hung. *8*, 152.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ ЗОБНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ТОЧКИ ЗРЕНИЯ ТУЧНЫХ КЛЕТОК ЗОБНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

ДЬ. ЧАБА

Полученные при 78 вскрытиях человеческие зобные железы исследовались с точки зрения описанной в экспериментах на животных однородной тканевой реакции. Было установлено, что в человеческих зобных железах также всюду можно обнаружить тучноклеточную реакцию и размножение ПАСК-положительного вещества. У пожилых лиц также наблюдались активно функционирующие гассалевские тельца. Автор того мнения, что выявляемые морфологические признаки указывают на функцию зобной железы у взрослых.

UNTERSUCHUNG VON MENSCHLICHEN THYMUSDRÜSEN IN BEZUG AUF DAS THYMUS-MASTZELLEN-PROBLEM

GY. CSABA

Aus Sektionen stammende 78 menschliche Thymusdrüsen wurden auf die in Tierversuchen beobachtete einheitliche Gewebsreaktion untersucht. Es wurde festgestellt, dass die mastzellige Reaktion, die Vermehrung des PAS-positiven Stoffes auch im menschlichen Thymus überall nachgewiesen werden kann. Bei alten Individuen wurden gleichfalls aktiv funktionierende Hassalsche Körperchen beobachtet. Verfasser ist der Meinung, dass die nachgewiesenen morphologischen Zeichen das Funktionieren der Thymusdrüse bei Erwachsenen bestätigen.

Dr. György Csaba, Budapest, IX., Tűzoltó u. 58. Hungary

Department of Histology and Embryology, (Director: Prof. I. Törő)
Medical University, Budapest

NEW CONTRIBUTIONS TO THE HEPARIN-AFFINITY OF THE THYMUS. I

Gy. Csaba, I. Törő and Eszter Kapa

(Received September 1, 1959)

As it has been described [1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 10], in conditions associated with tissue proliferation the rat and the mouse thymus produces an uniform tissue reaction, consisting of the appearance of a PAS-positive substance, its accumulation in the corpuscles of Hassall and in the thymocytes, as well as of an increased formation of mast cells. The PAS-positive substance added to a thymus tissue culture in the form of heat-treated, modified heparin is synthesized as a metachromatic substance in the cells some of which correspond to regular mast cells. This finding was looked upon as proving that while the cells of the lymph nodes and of the spleen are unable to take up the components of the metachromatic substance or to synthesize its complete form, the thymus produces the substance in large quantities.

These experiments have left several problems unanswered, among them the affinity of the thymus to heparin substances, the elective nature of this affinity, and whether this function requires the presence of the whole organ or single thymus cells, too, are capable of the function.

Methods

Observations were made in 200 tissue cultures of the Maximow type. The materials tested originated from rats ranging in age from newborn to three days. Specimens of thymus, liver, spleen and lymph nodes were explanted on coagulated chicken plasma and 48 hours later washed with a mixture of horse serum, chicken embryo juice, Tyrode's solution (3 : 1 : 6) for one hour. Twenty-four hours later, *i. e.* 72 hours after explantation, the specimens were washed with the above-described mixture to which this time was added 1 mg/ml of heparin (Heparin pulvis, Richter, 80 I. U.) kept previously in a water bath at 56° C for 48 hours and boiled for 4 hours. (The heparin thus treated loses its metachromasia but retains its PAS-positivity.) Subsequently the cultures were washed at 48-hour intervals with heparin-free washing fluid. The first fixation of thymus tissue was made 72 hours, of other organs 96 hours, after washing with heparin; then fixation was continued at 48 hour intervals for 10 days and at 24 hour intervals for another 10 days. The cultures were stained with toluidine blue, some *in toto*, others in serial sections.

Results

Thymus

Seventy-two hours after washing with heparin many metachromatic cells are visible partly in the central area and partly at the periphery; a few scattered

ones in other parts. The cells nearer to the centre are similar to epithelial cells, while those at the periphery have nuclei like the thymocytes, but in a swollen cytoplasm. The mother piece is vital, necroses are not visible in it *(Fig. 1)*.

In the migration zone almost every cell, either thymocyte or epithelial cell, contains heparin; mitoses are frequent and the intracellular granulation is dense. At the periphery of the migration zone there are less metachromatic cells than near the centre. The cultures grow more intensely than the controls *(Fig. 2)*.

In the 5-day culture many cells have migrated from the mother piece, though about half of this is still dense. The cytoplasm of metachromatic cells continues to increase.

In the *in toto* cultures mitotic cells abound, corresponding to the intense rate of growth. At the periphery there are few metachromatic cells, even less than in the younger cultures, but masses of them are seen around the mother piece.

In the 7-day cultures the mother piece is filled with metachromatic cells and the central area is delimited from the periphery by a very thin zone composed of non-metachromatic cells. The migration zone contains great numbers of metachromatic cells, most of them with thymocyte-like nuclei. An interesting feature *(see Fig. 3)* is the way in which metachromatic cells are leaving the tissue.

Ten days after washing with heparin the picture is similar to that outlined above, except that the size of the mother piece is definitely reduced; the number of cells in the migration zone is practically unchanged *(Figs. 4, 5)*.

The 11-day-old preparation is quite remarkable in that the mother piece is composed of several small islets with many metachromatic cells. In the migration zone a considerable number of heparin-containing cells is still present, though the cells stain paler, lighter *(Figs. 6, 7, 8)*.

In the 18-day-old mother piece continuity is almost completely lost. Most of the epithelial cells still present are metachromatic, and some polynuclear cells are visible between the islets. There are metachromatic cells in the zone of migration *(Fig. 9)*.

Twenty days following heparin treatment very few cells are in the mother piece, many of them metachromatic. Metachromatic cells occur also in the migration zone.

Liver

Ninety-six hours following heparin treatment some of the few epithelial cells growing out from the liver tissue show slight metachromasia. In the mother piece there are definitely metachromatic epithelial cells. The central necrosis is very marked.

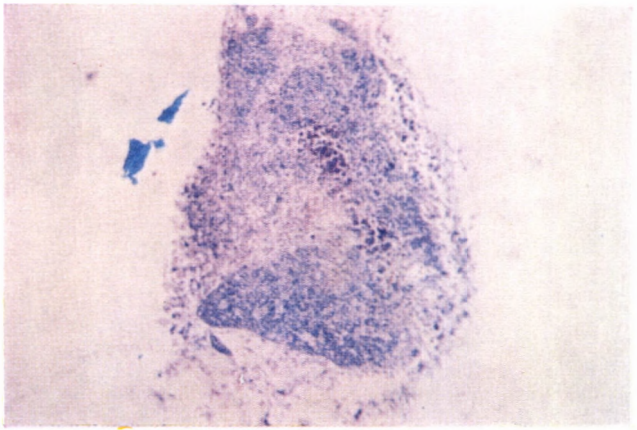


Fig. 1. Mother piece, three days after treatment. In the marginal zone cells staining blue with toluidine, in the centre metachromatic cells. Toluidine blue, ×60

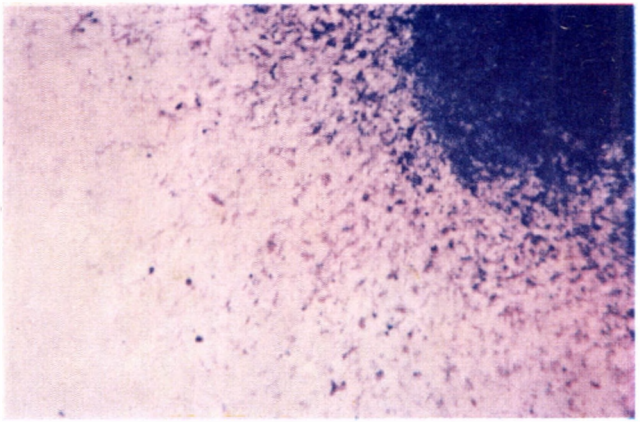


Fig. 2. Same as in *Fig. 1.* Culture stained *in toto.* Many metachromatic cells in the zone of migration. Toluidine blue, ×60

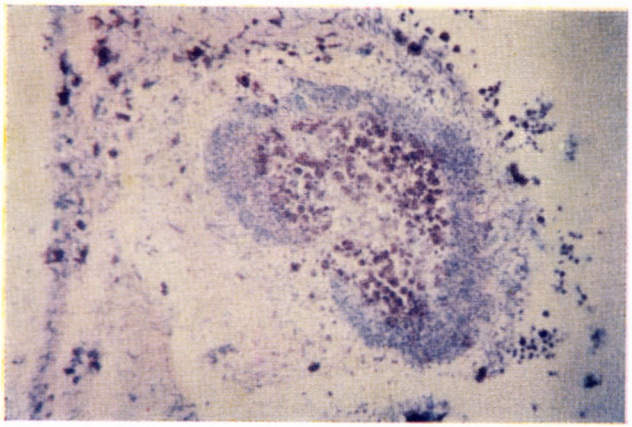


Fig. 3. Seven days after treatment: abundant metachromasia. The picture is remarkable because it appears as if the metachromatic cells would be flowing out into the migration zone through a gate formed by non-metachromatic cells. Toluidine blue, ×60

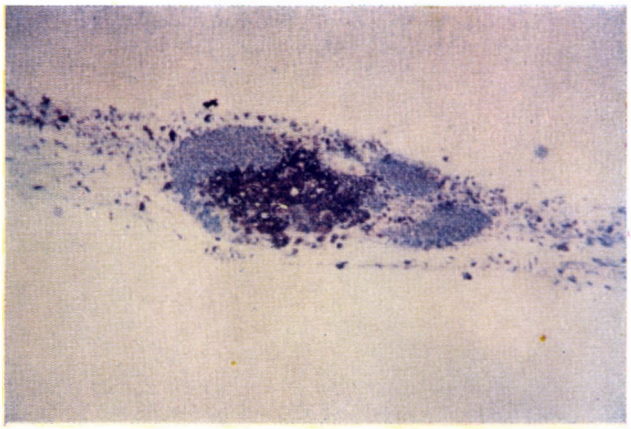


Fig. 4. Section of a culture, 10 days after treatment. The central area is filled with metachromatic cells, at the periphery no metachromatic cells are visible. Toluidine blue, ×60

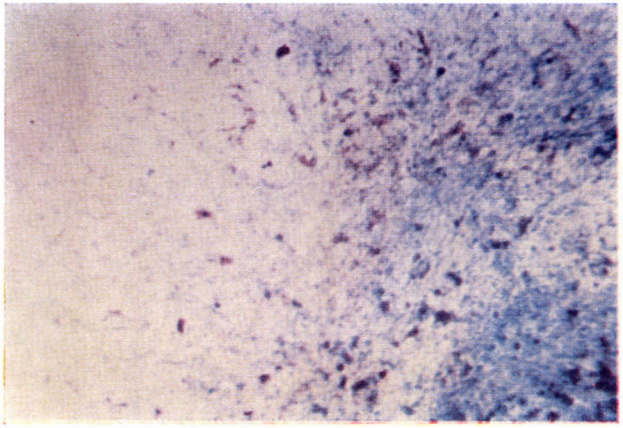


Fig. 5. The same, in an *in toto* preparation. Large numbers of metachromatic cells in the migration zone around the mother piece. Toluidine blue, ×60

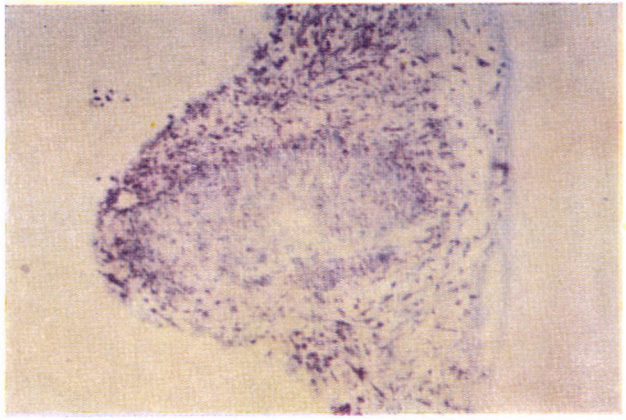


Fig. 6. Section from a culture, made on the 12th day. The mother piece is poor in cells, but many of them are metachromatic. Toluidine blue, ×60

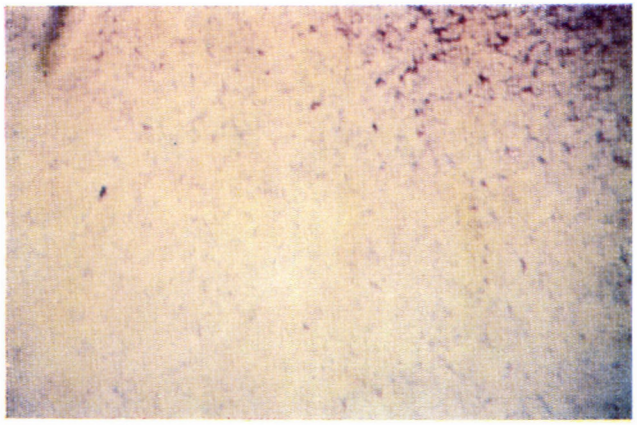


Fig. 7. The same, in an *in toto* preparation. There are no metachromatic cells in the peripheral part of the migration zone. Toluidine blue, ×60

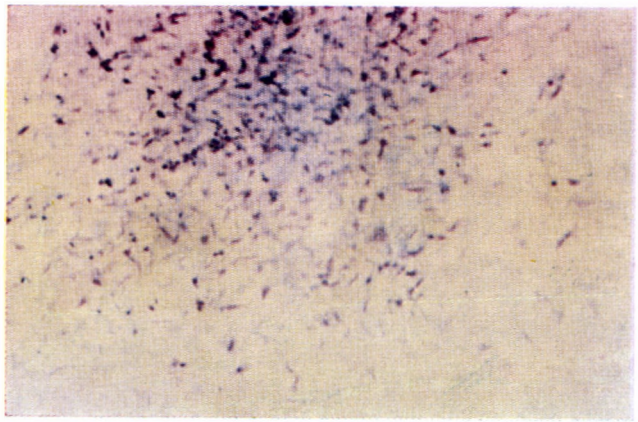


Fig. 8. 16 days after treatment. Many big, metachromatic cells in the migration zone. Toluidine blue, ×60

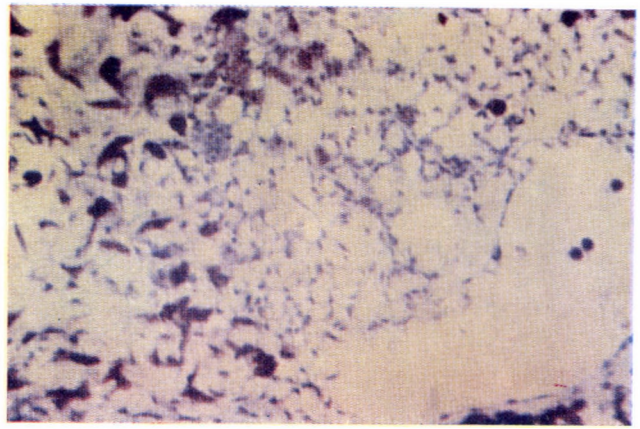


Fig. 9. 18 days after treatment. There are still many metachromatic cells in the section. Near the centre there is giant cell syncytium. Toluidine blue, ×60

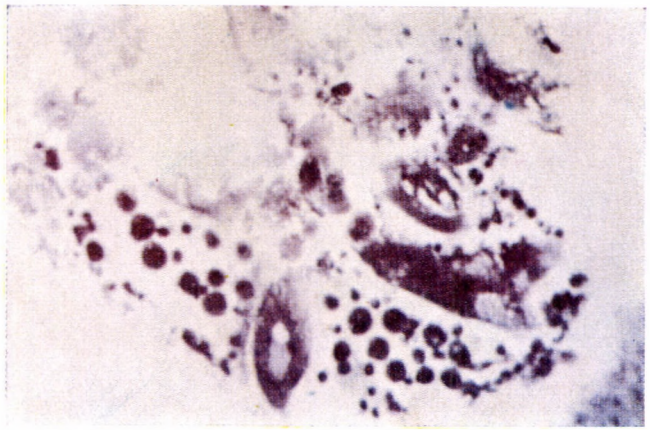


Fig. 10. Section made from a liver culture, 12 days after treatment. Greatly swollen liver cells, many rounded forms. Toluidine blue, ×60

Six days after treatment a few big, metachromatic cells appear in the zone of migration. Large numbers of big metachromatic cells are visible in the mother piece; these are swollen and abound in heparin. The majority occurs in the central area, the marginal zone is composed of heparin-free cells.

Nine days after treatment metachromatic cells are no longer detectable in the zone of migration, but many granules are found in the epithelial cells of the mother piece. Later, some multinucleated cells, giant cells and many degenerated forms appear *(Fig. 10)*. No other cytological change takes place until the end of the culture period. The number of cells in the mother piece continues to decrease and no metachromatic cells are visible in the zone of migration.

Spleen

Six days after heparin treatment do the first metachromatic cells appear in the zone of migration. At 9 days 1 or 2 cells appear, and no further increase in their number takes place until the end of the culturing period. Before the 6th day the mother piece contains no metachromatic cells; in the 9-day specimen 1 or 2 fibrocyte-like cells occur, showing slight metachromasia; these cells do not increase in number until the end of the period of cultivation.

Lymph node

Ninety-six hours and 6 days following treatment a few lymphoblast-like, round, metachromatic cells appear in the migration zone, next to the mother piece. At 9 days a few apparently viable metachromatic cells are visible; these are not mast cells, being different from them in both size and shape. Their number increases slightly until the 12th day, but there is no further increase during cultivation. Metachromatic material is found occasionally in some cells of the mother piece.

Discussion

According to the results thymus tissue has an extremely marked affinity to the heparinoid substance tested. A single washing with the heat-treated heparin sufficed to cause the appearance of metachromatic cells in both the migration zone and the mother piece; these cells are still present as late as 20 days after treatment. If we compare this evidence with that obtained for the spleen and lymph nodes, we seem to stand on firm ground when stating that of the three it is only the thymus that can synthesize heparin. This finding suggests that the thymus may possess this specific function also in the living organism.

The situation is different in the case of the liver. The parenchymal cells of this organ seem to be capable of synthesizing heparin. But while in the

thymus this function is associated with the formation of mast cells, this does not happen in the liver, as suggested by the fact that the cells accumulate heparin, undergo excessive swelling, form many giant cells and yet there are practically no mobile metachromatic cells in the zone of migration. The morphological picture is normal insofar as it is taken for proved that the liver can synthesize heparin.

The thymus seems therefore to be the only organ capable of producing full value mast cells while the spleen and the lymph nodes are practically incapable of that function. The liver seems to synthesize heparin, but this finds no expression in the migration of mobile cells; the cells are storing this material, as it is known also from the literature, the spleen and the lymph nodes produce plasma cells but no mast cells [4, 6].

Metachromasia was the strongest in the cells of the thymus mother piece and in the zone of migration, next to the mother piece. The farther from the mother piece the cells are migrating, the more they lose of their metachromasia; those lying most peripherally show no metachromasia at all. This may have two explanations. As heparin is added just once to the cultures, the cells migrating outward may lose their heparin content and, gaining access to no further heparin, gradually lose their metachromasia. The other possibility is that the epithelial cells of the mother piece have taken up the components of heparin, synthesize heparin of full value and give it over to the easily migrating cells. In this case the process would be as has been suggested on the basis of our experiment *in vivo*. As in our earlier tissue cultures treated with heparin at 48-hour intervals metachromatic cells were found exclusively near the mother piece, the second possibility is what probably occurs. It seems therefore that heparin synthesis requires that the thymus should not act as a special tissue and isolated cells are capable of synthesizing heparin.

Summary

The effect of a single treatment with heparin on tissue cultures of rat thymus, liver, spleen and lymph nodes has been studied. Thymus has been found to have the strongest affinity and a single treatment heparin ensured continuous migration of metachromatic cells for 20 days. Thymus tissue is essential for the synthesis of heparin, independent cells are not capable of that function. The liver, too, synthesizes heparin, but produces no mast cells. The spleen und lymph nodes play no role in the synthesis of heparin.

REFERENCES

1. CSABA, GY., TÖRŐ, I., ÁCS, T., KISS, F. I. (1960): The Behaviour of the Thymus in Conditions Associated with Tissue Proliferation. Acta morph. hung. *9*. 187. — 2. CSABA, GY., TÖRŐ, I., KAPA, E. (1960): Provoked Tissue Reaction of the Thymus in Tissue Culture. Acta morph. hung. *9*. 197. — 3. CSABA, GY. (1959): The Human Thymus Gland: The problem of the Thymus Mast Cells. Acta morph. hung.

In the press. — 4. HARRIS, S., HARRIS, T. N. (1955): Studies on the Transfer of Lymph Node Cells V. J. Immunol. *74*, 318—328. — 5. RADITZ, M., TÖRŐ, I. (1954): Behaviour of Thymus Transplanted to Chorioallantoic Membrane. Acta biol. hung. *5*, 88—96. — 6. SHELIN, U., HESSELSJÖ, R., PAULSEN, F., MELLGREN, J. (1954): Plasma Cell Production Promoted by Pituitary Somatotrophic Hormone in the Adaptation Syndrome. Acta path. microbiol. scand. *35*, 503—511. — 7. TÖRŐ, I. (1959): The Histophysiology of the Thymus (In Hungarian). Debreceni Orvosegyetem Évkönyve 1—5. — 8. TÖRŐ, I. (1957): Histologische Beiträge zur Funktion des Thymus. Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft, 54. Versammlung in Freiburg/Br. 22—25 Sept. — 9. TÖRŐ, I., AROS, B. (1958): Die Gewebsreaktion des Thymus auf verschiedene Einwirkungen. Acta morph. hung. *8*, 152—171. — 10. VADÁSZ, J. (1954): Beiträge zur Entstehung der Thymocyten. Acta morph. hung. *4*, 279—292.

О СРОДСТВЕ ЗОБНОЙ ЖЕЛЕЗЫ К ГЕПАРИНУ. I

ДЬ. ЧАБА, И. ТЕРЕ и Е. КАПА

Исследовалось действие однократной обработки гепарином на тканевые культуры зобной железы, печени, селезенки и лимфатических узлов крыс. Было установлено, что из исследованных тканей наибольшее сродство выявляет зобная железа и однократное промывание гепарином обеспечивает в течение 20 дней непрерывную миграцию метахроматических клеток. Далее было установлено, что к синтезу гепарина необходима ткань зобной железы, одиночные клетки неспособны синтетизировать гепарина. Печень также способна синтетизировать гепарин, однако, образования тучных клеток в печени не происходит. В синтезе гепарина селезенка и лимфатические узлы не имеют значения.

NEUERE BEITRÄGE ZUR HEPARIN-AFFINITÄT DES THYMUS. I

GY. CSABA, I. TÖRŐ und E. KAPA

Die Wirkung einmaliger Heparinbehandlung auf Gewebekulturen aus Thymus, Leber, Milz, und Lymphknoten von Ratten wurde untersucht und festgestellt, dass von den untersuchten Geweben die Thymusdrüse über die stärkste Affinität verfügt. Eine einmalige Behandlung mit Heparin gewährleistet 20 Tage hindurch eine ununterbrochene Migration der metachromatischen Zellen. Es wurde ferner festgestellt, dass zur Heparinsynthese Thymusgewebe erforderlich ist, isolierte Zellen sind dazu nicht fähig. Die Leber kann gleichfalls Heparin synthetisieren, doch erfolgt in der Leber keine Mastzellenbildung. Die Milz und die Lymphdrüsen kommen hinsichtlich der Heparinsynthese nicht in Betracht.

Dr. György CSABA,
Prof. Dr. Imre TÖRŐ,
Eszter KAPA,
Budapest, IX., Tűzoltó u. 58., Hungary

Department of Histology and Embryology, University Medical School, Budapest
(Director: Prof. I. Törő)

NEW CONTRIBUTIONS TO THE HEPARIN-AFFINITY OF THE THYMUS. II

Gy. Csaba, I. Törő and Margit Vatai

(Received September 1, 1959)

In earlier experiments a significant tissue reaction was observed to occur in the thymus in proliferative conditions [1, 3, 6, 7, 8, 9, 10]. Studies with tissue cultures then showed that it suffices to add the heparinoid substance to the culture medium for the cells of the thymus to produce of it a metachromatic substance which remains in the cells for long [2, 4]. The question arose whether *in vivo* it is also sufficient to add the heparin-type substance to the cells to provoke the characteristic tissue reaction, or is there an additional stimulus (tissue proliferation, slight stressor effect) needed to elicit the phenomenon. To elucidate this problem, in the present experiments heat-treated heparin was injected directly into the thymus and the histologic responses to that injection were studied.

Methods

In the first series, 65 albino rats were used. Part of the rats was 7 to 14 days old, and part 2.5 months old (100 g). Under aseptic conditions the skin was incised, the cervical muscles were bluntly separated, the sternum was sharply incised in the midline, to the border of the upper and middle thirds; the capsule of the thymus was caught by vorceps and, using an intradermal cannula, 0.03 ml of heat-treated heparin was injected into the left lobe of the thymus. "Decomposed heparin" means Heparin pulvis Richter 80 I. U./mg kept at 56° C in a water bath for 48 hours and subsequently boiled for 4 hours. This heparin has lost its metachromasia and became PAS positive. The solution contained heparin at a concentration of 1 mg/ml. The specimens were excised 2, 5, 24, 48 and 72 hours after injection.

In the second series 0.2 ml of Ehrlich ascites tumour was inoculated into the abdomen of 15 adult mice, in order to povoke a general reaction of the thymus (1, 5), then 2, 5, 7, 9 and 12 days after inoculation heparin was injected into the thymus as described. The glands were removed and fixed.

As controls, 10 rats and 5 mice were used; in these animals heparin was injected to the lymph nodes.

The specimens were fixed in Carnoy's fluid and embedded in paraffine. Sections were cut from the blocks at four levels and were stained with PAS, toluidine blue or Giemsa.

Results

Rats aged 7 to 14 days

About 50 per cent of the thymus glands injected showed what we judged to be a mast cell reaction of medium severity. Mast cells occurred in the cortex

and near the connective tissue, but not in the medulla. Their number increased to two or three times the normal. Metachromatic granules appeared in some thymocytes and in the cytoplasm of epithelial cells. Perinuclear PAS-positivity was found in many thymocytes in smears made of thymocytes suspended in physiologic saline. The peak of the mast cell reaction occurred 24 and 48 hours after injection. The lymph nodes were normal.

Rats weighing 100 g

Neither PAS-positive cells, nor a mast cell reaction was found. Thymus and lymph nodes were normal.

Tumorous mice

A material showing azure metachromasia was accumulated in the thymocytes 2 days after the inoculation of tumour and 24 hours after the heparin injection. No toluidine metachromasia was seen in these cells *(Fig. 1)*. Five days after inoculation of the tumour there were many PAS-positive thymocytes in the cortex of the thymus. The next section stained with Giemsa's stain showed the mast cells one row outward, in the connective tissue, but in line with the PAS-positive thymocytes *(Fig. 2, Fig. 3)*. At later points of time the thymus presented the same pattern as in mice inoculated with tumour, but not treated with heparin.

Discussion

As it has been mentioned, the aim of our experiments was to determine whether to release the uniform tissue reaction it was sufficient to inject the heparin components into the thymus or that some factor provoking the thymus must also be present.

The results give an unequivocal answer to this question. If we analyse namely in which experiments were the reactions strong, in which weak and in which was there no reaction, it will be clear that a characteristic reaction was obtained in the animals inoculated with tumour and injected with heat-treated heparin; the reaction was weaker but still marked in the animals treated at the age of 7 to 14 days; and no response occurred in the 100 g animals treated with heparin without subjecting them to the general stimulus.

The behaviour of the thymus in young animals is understandable. These animals have not completed embryonic growth, it being on the 14th or 15th day that their fur is completely developed and their eyes open. If the morphogenetic processes are looked upon as tissue proliferations (and we feel justified in doing so), the correlation between the function of the thymus and the development of tissues explains the behaviour of that gland. Ehrlich's ascites,

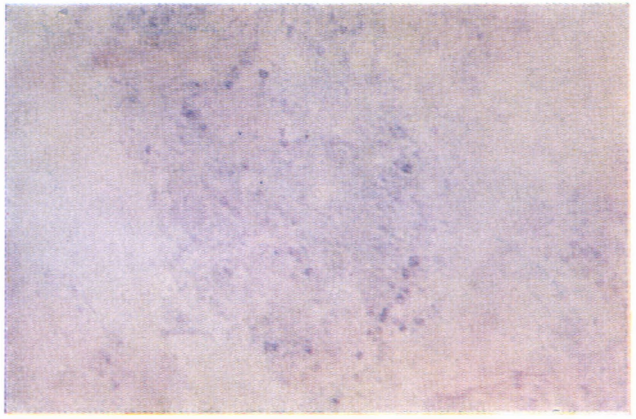


Fig. 1. Cells showing azure metachromasia in a lobe of the thymus, 48 hours after inoculation of the tumour. The cells show no toluidine metachromasia. Giemsa, ×60

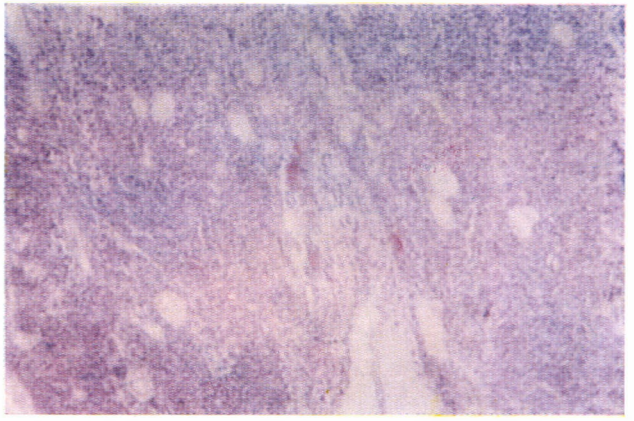


Fig. 2. PAS-positive cells in the cortex of the lobe of the thymus, immediately under the connective tissue capsule. PAS, ×60

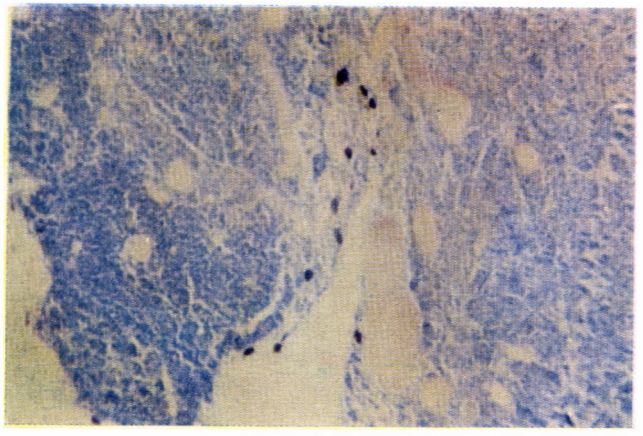


Fig. 3. The section next to the one in *Fig. 2.* Mast cells in the connective tissue, in line with the PAS-positive cells. Giemsa, ×60

a tumorous tissue proliferation rapidly killing the animals, was a strong activating factor.

The experiments on adult animals revealed that with the thymus at rest it does not suffice to inject the heat-treated heparin, because in that condition the cells are not capable of synthesizing heparin. Thus, a systemic stimulus seems to be essential in eliciting the complete tissue reaction. In tissue cultures, where conditions for the stimuli eliciting tissue proliferation are optimal, the situation appears to be different. In this case the coordinated action of the different cells of the thymus is equally needed, since single cells cannot synthesize heparin, yet we may deal with smaller units, with a dedifferentiation of the cells within the unit and with a lack of control by the organism.

Finally, the experiments in which the tissue reaction was elicited have confirmed our observations concerning the role of the thymus in the production of mast cells. It was particularly interesting to study the transformation of cells in a phase when the accumulated material shows only azure metachromasia but no toluidine blue reaction.

Summary

In experiments concerned with the tissue reaction of the thymus previously described by the authors it has been shown that the stimulus exerted by some increased function is essential in the development of that reaction and further that the injection of heparin comdonents into the thymus alone does not induce that reaction.

Acknowledgement

The authors are indebted to *Miss Julia Müller*, scientific worker, for her devotion and skill in the technical work.

REFERENCES

1. Csaba, Gy., Törő, I., Ács, T., Kiss, F. I. (1960): The Behaviour of the Thymus in Conditions Associated with Tissue Proliferation. Acta morph. hung. *9*. 187 — 2. Csaba, Gy., Törő, I., Kapa, E. (1960): Provoked Tissue Reaction of the Thymus in Tissue Culture. Acta morph. hung. *9*. 197 — 3. Csaba, Gy. (1959): The Human Thymus Gland: The Problem of the Thymus Mast Cells. Acta morph. hung. In the press. — 4. Csaba, Gy., Törő, I., Kapa, E. (1959): New Contributions to the Heparin-Affinity of the Thymus. I. Acta Morph. Hung. *9*. 291 — 5. Falk, F. (1954): Reaktion von Milz und Thymus beim Ascitescarcinom der weissen Maus. Z. ges. exp. Med. *124*, 524—533. — 6. Raditz, M., Törő, I. (1954): Behaviour of Thymus Transplanted to Chorioallantoic Membrane. Acta biol. hung. *5*, 88—96. — 7. Törő, I. (1955): The Histophysiology of the Thymus. (In Hungarian.) Debreceni Orvosegyetem Évkönyve 1—5. — 8. Törő, I. (1957): Histologische Beiträge zur Funktion des Thymus. Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft, 54. Versammlung in Freiburg/Br. 22—25 Sept. — 9. Törő, I., Aros, B. (1958): Die Gewebsreaktion des Thymus auf verschiedene Einwirkungen. Acta morph. hung. *8*, 152—171. — 10. Vadász, J. (1954): Beiträge zur Entstehung der Thymocyten. Acta morph. hung. *4*, 279—292.

О СРОДСТВЕ ЗОБНОЙ ЖЕЛЕЗЫ К ГЕПАРИНУ. II.

ДЬ. ЧАБА, И. ТЕРЕ и М. ВАТАИ

Проводилось исследование тканевой реакции зобной железы, согласно описанным авторами раньше опытам, и было установлено, что для осуществления данной реакции непременно необходима повышенная функция представляющая раздражение ибо непосредственное введение составных частей гепарина в зобную железу само по себе не вызывает синтеза гепарина.

NEUERE BEITRÄGE ZUR HEPARIN-AFFINITÄT DES THYMUS. II

GY. CSABA, I. TÖRŐ und M. VATAI

Die von den Verfassern früher beschriebene Gewebsreaktion des Thymus wurde untersucht und festgestellt, dass zum Zustandekommen derselben unbedingt der Reiz einer gesteigerten Funktion erforderlich ist, da die unmittelbare Einführung der Bestandteile des Heparins an sich keine Heparinsynthese hervorruft.

Dr György Csaba,
Prof. Dr Imre Törő
Margit Vatai,
Budapest, IX., Tűzoltó u. 58., Hungary

Department of Anatomy of the University Medical School (Director: Prof. F. Kiss)
and National Institute of Sterility Research, Budapest

NEW DATA REGARDING THE FLUORESCENCE MICROSCOPIC PICTURE OF VAGINAL EPITHELIUM

T. Donáth, Gy. Orbán and R. Gimes

(Received September 3, 1959)

Fluorescence microscopy has been regularly used by us since 1954 for the cytodiagnostic examination of vaginal smears. Our results, obtained with a combination of the fluorochrome dyes thioflavine S and thiazine-red, were published in 1957 [9]. Since 1957 we have been working with acridine orange. According to the modification of one of us (Donáth), we treat our samples in a wet chamber. Acridine orange has been used for the purposes of exfoliative cytology by Bertalanffy et al. in the Mount Sinai Hospital of Los Angeles: applying it exclusively to fixed smears, they obtained satisfactory results [1, 2, 3].

Our present experiments had the following objects: *a)* to obtain — without the use of fixatives — quick and reliable information regarding the cellular elements of the vaginal smear; *b)* to establish the cytological pattern of the different kinds of hormonal insufficiency; *c)* to study the cytochemistry of the vaginal epithelium with a view to collecting data regarding the cytochemical properties of pathological cellular elements encountered in the vaginal secretion.

Cytotopochemistry, one of the recent branches of cytology, while not disregarding morphological criteria, endeavours to go beyond the limits of cytomorphology by determining and differentiating the chemical substances of the cells.

Papanicolaou's technique — so far the best colpocytological procedure — demands much time, needs great professional skill and is based on morphology. Of recent, cytochemical methods have gained ground, especially as regards differentiation between benign and malignant cells [5, 7, 8].

Acridine orange NO (Gurr) was first used by Strugger and — independently of him — by Bukasch and Haitinger in 1940 [14]. According to recent data the dye has a specific affinity to nucleic acids and reacts with them with intensive fluorescence [11, 12, 15]. Ribonucleic acid (RNA) produces orange-red, desoxyribonucleic acid (DNA) green fluorescence. In the course of vital and supravital examinations it was found that, while living cells take up but little acridine orange and show a green fluorescence, dead cells bind large

amounts of the dye and give, consequently, flame-red fluorescence (STRUGGER's concentration effect, 13). This classic observation made on plant cells has become a literary battleground of controversy in its application to animal cells. Acridine orange is very sensitive to pH changes: the higher the pH the more of the dye is absorbed by the cells.

Following STRUGGER's instructions, we took great care adequately to adjust the pH of the dye and to use it in adequate concentrations.

Material and method

The vaginal discharge of healthy young women in different phases of the menstrual cycle was studied in addition to the vaginal discharge of sexually mature women suffering from hormonal insufficiency and of women at the beginning or in a later phase of the menopause.

The studies were made in the wet chamber. Vaginal secretion was taken from the posterior fornix by means of a spatula, transferred to a slide, delicately mixed with a 1 : 10000 dilution of acridine orange and embedded in paraffin. The dye dilution was made of a stock solution of 0.1 per cent acridine orange in distilled water and a buffer composed of 80 per cent 1/15 M primary potassium phosphate and 20 per cent 1/15 M secondary sodium phosphate (pH 6.36). Fluorescence microscopy was done between the 3rd and the 60th minutes so as to avoid overstaining. Wet-chamber preparations may deteriorate after an hour.

We adjusted the pH of the dye solution in some cases to 3.51, 5.81, 7.63 and 8.22. Glycogen was demonstrated by the comparative use of Lugol's reaction and Cattor's method.

Simultaneously with the wet-chamber preparations smears were fixed in ethylalcohol-ether and stained with acridine orange 1 : 10000 according to Papanicolaou and methylene blue.

A larger Zeiss fluorescence unit was used. Four percent copper sulphate served for the absorption of heat rays, a Schott UGl filtre of 1.5 mm for induction and GG9 or GGl ocular suppression filtre for the elimination of UV rays. An Exacta Varex camera and Agfacolor daylight negative (17/10 Din) film were employed for colour photography; exposure time varied between 2 and 10 minutes according to the desired degree of magnification.

Results

On treatment with acridine orange the fluorescence of the epithelial cells varies according to the layer from which they originate.

The cytoplasm of superficial cells with pyknotic nuclei usually gives a very faint or no fluorescence. Such cells show sometimes brilliant red fluorescence: high magnification reveals it to be due to a great number of Döderlein's bacilli attached to the cell surface. Orange-coloured cytoplasmic granulation is observable in cells free from bacteria. The small pyknotic nucleus shows a brilliant green fluorescence which in other types is much weaker although they do not differ morphologically from the cells under review. There occurred also cells in the superficial layer which had a swollen nucleus showing a vivid red fluorescence.

The cytoplasmic fluorescence of superficial cells (with non-pyknotic nuclei) is green with a smaller number of coarse orange-stained granules. The nucleus is surrounded by a zone which contains no granules and

Fluorescence of the elements of vaginal discharge stained with acridine orange (pH 6,3)
(Number of crosses indicate intensity of fluorescence)

	Nucleus	Cytoplasm	Granules, colour	Granules, number and size	Observations
Superficial cells with pyknotic nuclei I.	green ++	0	0	0	Advanced pyknosis
Superficial cells with pyknotic nuclei II.	light green +++	greyish-green +	orange-yellow +	few-small	Recent pyknosis
Superficial cells with non-pyknotic nuclei	green ++	dark-green +	orange-yellow ++	few-coarse	
Intermediary cells	green ++	greenish-yellow ++	orange-yellow +	few-small	
Parabasal cells	yellowish ++	orange or green ++	orange-yellow +	many-small	
Basal cells	orange-yellow ++	orange or green ++	orange-yellow ++	many-coarse	
Endocervical cells	orange-yellow +++	orange-red ++	orange-yellow +	few-small	
Leukocytes I.	green ++	dark green +	orange-yellow +	few-small	Fresh
Leukocytes II.	red +++	orange-yellow +	red +++	many-coarse	Necrosed
Histiocytes	greenish-yellow ++	brownish grey +	orange-yellow ++	few—coarse	
Trichomonas	orange-yellow ++	yellowish orange +	red ++	many-small	
Döderlein's bacilli		orange-red +++			
Mucus		light-green ++			

shows no fluorescence. Neither does the cell membrane show fluorescence. Nuclear fluorescence is green.

Cells of the middle layer reveal a more vivid fluorescence than those of the upper layer: their colour is greenish yellow while nuclear fluorescence is green. The parabasal and basal cells have a granulated and brilliantly red cytoplasm and an orange-coloured nucleus. A few parabasal cells had a green cytoplasm and an orange or greenish-yellow nucleus.

Leukocytes in the wet-chamber preparations were clearly distinguished by their bright green nuclearchromatin, the faint green fluorescence of their nuclear membrane, and the dark green cytoplasm with red granules. In case of inflammation there appeared in addition leukocytes displaying a red nuclear fluorescence and leukocytes in which the entire protoplasm was filled with red granules.

The fluorescence of Döderlein's bacilli is a characteristic orange red or, at a low pH (3.1), green. Most of these bacilli are attached to the superficial cells showing nuclear pyknosis. Subsequent treatment with Lugol's solution blotted out the fluorescence of the superficial cells without affecting that of other cells.

Trichomonas show orange-yellow nuclei and a red cytoplasmic granulation: they are well distinguishable from other elements, from leukocytes with green nuclear fluorescence in particular.

Discussion

Our wet-chamber technique and the employed method of staining have the advantage of being quick, simple and of preventing cellular damage and morphological changes (change of size, shrinkage) associated with fixation. It allows a subvital evaluation of the cells in their original size and structure. Fixation — even with ether-alcohol, the best fixative for smears — is a crude operation which causes gross structural changes in the cytoplasm (the cells lose half their size) so that fixed smears are usually suitable for nuclear observations only [16], while our procedure makes it possible to follow cytoplasmic changes and so to note cytoplasmic basophilia, to observe morphological differences between the cells originating from different epithelial layers and thus to obtain a true picture of the distribution of nucleic acids.

It has been histochemically proved that acridine orange, as also other diaminoacridine derivatives, have an affinity to nucleic acids and are consequently well suited for the demonstration of these acids and for the differentiation of RNA and DNA. Acridine orange has moreover been found useful for the determination of the degree of polymerization of intracellular DNA.

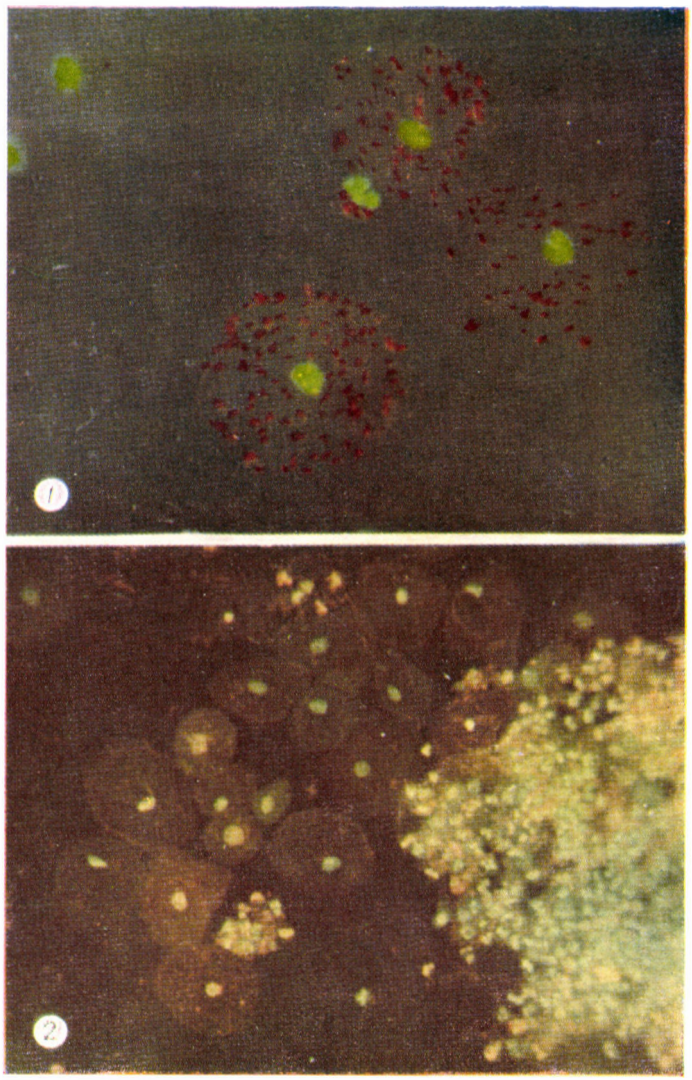
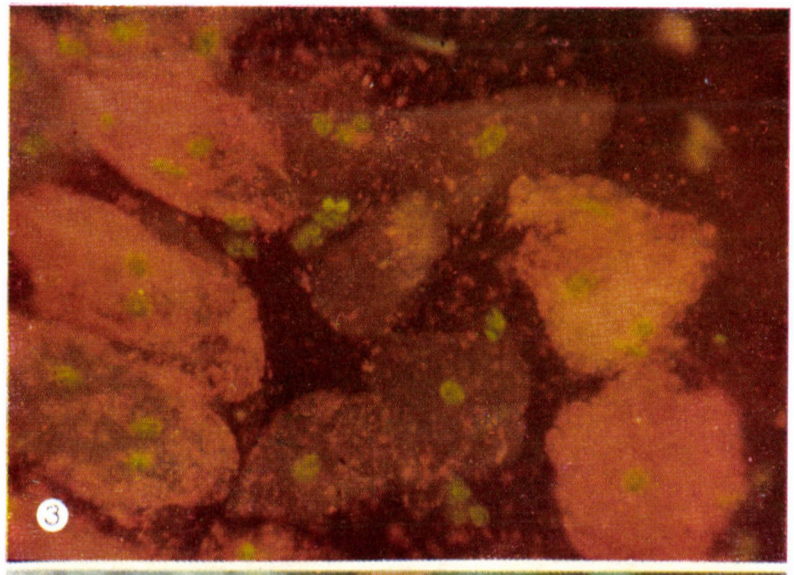


Fig. 1. The picture shows three superficial epithelial cells. Bright green nuclear fluorescence. Only orange-coloured granules produce fluorescence in the cytoplasm. Between the three cells a segmented leukocyte with green nucleus and brilliant red cytoplasmic granulation. Lacking cytoplasmic granules, only the nucleus of the other superficial epithelial cells shows fluorescence. ×400

Fig. 2. Menopause. Mostly superficial cells with non-pyknotic nuclei. Shape and arrangement of the cells illustrate the superiority of the wet-chamber method over the smear technique which injures the cells and makes them shrink. Affinity of Döderlein's bacilli to cells of the uppermost epithelial layer. Nucleus of parabasal cell shows yellowish fluorescence. ×200



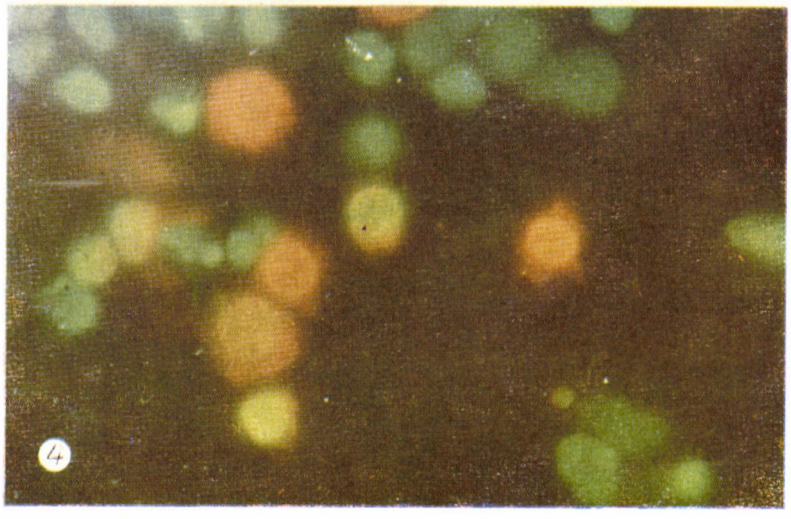


Fig. 3. The picture shows principally cells from the intermediary layer. Fluorescence of cytoplasm is dark green; of nucleus, intensive yellowish green. Orange-yellow fluorescence of inter- and intracellular bacterial flora covering the cytoplasm of some cells with a pyknotic nucleus. In the course of control experiments made with Lugol's solution, the iodine reaction blotted out the fluorescence of these superficial cells without affecting that of the others. Leukocytes show a bright green nuclear fluorescence ×400

Fig. 4. Trichomonas vaginalis and leukocytes above the two epithelial cells. The large yellow-coloured nucleus and the red cytoplasmic granules of the flagellates distinguish them sharply from the surroundings, especially from the leukocytes with their green nuclear fluorescence, ×900

Nuclear fluorescence in the cells from the uppermost layer of the epithelium was of three kinds. The major part of the nuclei gave a homogeneous and sharp fluorescence indicative of condensing DNA and incipient pyknosis. Some of the nuclei showed a considerably weaker fluorescence: these were pyknotic with completely depolymerized DNA. The cytoplasm of such cells was acidophilic which explains why only very little alkaline dye was absorbed by them. We observed occasional swollen nuclei with a brilliant red fluorescence: we regarded this as a sign not of pyknosis but karyolysis; the red fluorescence must be due to Strugger's effect, *i. e.* to the accumulation and consequent high concentration of the dye.

Progressive cytoplasmic basophilia was observed as we reached cells of the deeper layers. It manifested itself with gradual change of green into orange and orange-red cytoplasmic fluorescence. This change in colour indicates a considerable increase in the nucleic acid content of the cytoplasm (BERTALANFFY et al.). The cytoplasmic fluorescence of cells from the intermediary layers was invariably stronger than that of the superficial cells, only a few parabasal cells showed a green cytoplasmic fluorescence. In summary, we think that the intensity of fluorescence produced by acridine orange is in direct ratio to cytoplasmic basophilia.

That Döderlein's bacilli show a marked affinity to superficial cells, is in our opinion due to the high glycogen content of these cells, since only their fluorescence and not that of the other cells was distinguished on treatment with Lugol's solution. Our present observations in this respect were but an additional confirmation of similar conclusions drawn from the results of earlier experiments in which Cattor's method had been used [6].

The fact, that leukocytes give two markedly different kinds of fluorescence must in our opinion be due to differences in their age and condition: old necrosed leukocytes give a brilliant red nuclear fluorescence, while the nucleus of fresh leukocytes that have passed into the vaginal discharge quite recently, show a green colour.

While the usual dyes do not bring out the normal bacterial flora, with acridine orange this displays an intensive fluorescence. *Trichomonas vaginalis* is easily recognizable. The presence of many leukocytes does not impair the accuracy of cytodiagnosis. Cells of the vaginal epithelium can be studied undisturbed in smears containing blood because fluorescence of the erythrocytes is extinguished by their haemoglobin. One of the present authors [4] has elaborated a technique which makes it possible to induce a change in the chemical structure of haemoglobin so that erythrocytes can — if so desired — be made visible by means of fluorochromes.

Summary

Wet-chamber preparations of the cellular elements of the vaginal discharge were examined subvitally under the fluorescence microscope after staining with acridine orange. The procedure is simple, quick and gives a reliable picture in which it is easy to distinguish between different cell types. The different fluorescence of the different types of cells is attributed to differences in nucleic acid contents. The intensity of fluorescence was dependent on cytoplasmic basophilia. It is recommended that in colpocytological examination not only morphological changes occurring in nucleus and cytoplasm but also changes in cytochemistry should be studied.

Döderlein's bacilli were found to have an affinity to cells of certain types.

The method described makes it possible to conclude the degree of pyknosis from the degree of DNA polymerization and to distinguish live from dead leukocytes on the evidence of fluorescence. Bacterial flora and *Trichomonas vaginalis* are clearly distinguished.

REFERENCES

1. Bertalanffy, L.—Bickis, I. (1956): Identification of cytoplasmic basophilia (ribonucleic acid) by fluorescence microscopy. J. Histochem. *4*, 481—493. — 2. Bertalanffy, L.—Masin, F.—Masin, M. (1956): Use of acridine orange fluorescence technique in exfoliative cytology. Science. *124*, 1024—1025. — 3. Bertalanffy, L.—Masin, M.—Masin, F. (1958): A new and rapid method for diagnosis of vaginal and cervical cancer by fluorescence microscopy. Cancer. *11*, 873—887. — 4. Donáth, T.—Lengyel, I. (1958): Teljes vérkép fluorescensmikroszkópos vizsgálata. Orv. Hetil. *99*, 930—932. — 5. Ebner, H. (1954): Zytotopochemie aus Runge H.: Gynäkologische Zytologie, T. Steinkopff, Dresden. — 6. Gimes, R.—Orbán, Gy. (1957): Terheseken végzett kolpocytológiai vizsgálatok. Magyar Nőorv. Lapja. *6*, 356—363. — 7. Gross, S. J.—Danziger, S. (1957): Histochemical techniques applied to study of benign and malignant squamous epithelium of cervix uteri. Amer. J. Obst. Gynec. *73*, 94—119. — 8. Hopman, B. C. (1953): Evaluation of differential staining techniques in cancer cytology. Amer. J. Obst. Gynec. *65*, 1228—1237. — 9. Orbán, Gy.—Somogyi, E.—Donáth, T. (1957): L'examen histochimique de la sécrétion vaginale cyclique à l'aide du microscope ultra-violet. Gynéc. prat. *3*, 165—169. — 10. Pearse, A. G. E. (1953): Histochemistry, theoretical and applied. London, Churchill. — 11. Schümmelfeder, N.—Krogh, R. E.—Ebschner, K. J. (1958): Färbungsanalysen zur Acridinorange-Fluorochromierung. Vergleichende histochemische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen am Kleinhirn der Maus mit Acridinorange- und Gallocyanin-Chromalaun-Färbungen. Z. Zellforsch., Abt. Histochemie. *1*, 1—28. — 12. Schümmelfeder, N.—Ebschner, K. J.—Krogh, R. E. (1957): Die Grundlage der differenten Fluorochromierung von Ribonukleinsäuren und Desoxyribonukleinsäuren mit Akridinorange. Naturwiss., *17*, 467. — 13. Strugger, S. (1949): Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie, Schaper, Hannover. — 14. Strugger, S. (1940): Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Aufnahme und Speicherung des Akridinorange durch lebende und tote Pflanzenzellen. Jena. Z. Naturw. *73*, 97—134. — 15. Zeiger, K.—Hardes, H.—Müller, W. (1951): Der Strugger-Effekt an der Nervenzelle. Protoplasma, *40*, 76—84. — 16. Zinser, H. K. (1957): Die Zytodiagnostik in der Gynäkologie, G. Fischer, Jena.

НОВЫЕ ДАННЫЕ К КАРТИНЕ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ВЛАГАЛИЩА ПРИ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ

Т. ДОНАТ, ДЬ. ОРБАН и Р. ГИМЕШ

Под флуоресцентным микроскопом были исследованы субвитально окрашенные (в влажной камере) при помощи АО клеточные элементы выделений из влагалища, соответственно отдельным фазам. Данный метод быстрый, простой и предоставляет верную картину, позволяющую легко обособлять отдельные клетки. Встречающиеся у отдельных типов клеток разницы в цвете флуоресценции объясняются отклонением содержания нуклеиновой кислоты. Полученная окрашиванием АО интенсивность флуоресценции параллельна базофилии клеточной структуры. На основании данного метода, предоставляющего одновременно дифференцированное окрашивание ядер, предлагается, при

колпоцитологической оценке, наряду с морфологическими изменениями ядер и плазмы обратить внимание также на цитохимические изменения. В исследованиях приписывается большая роль сродству влагалищных палочек Дедерлейна к определенным типам клеток. При помощи данного метода демонстрируется на основании степени полимеризации ДНК ранняя и поздняя фазы ядерного пикноза, далее разница в флуоресценции живых и омертвелых лейкоцитов. Под флуоресцентным микроскопом прекрасно обослоьяются. бактериальная флора и трихомонасы.

NEUERE BEITRÄGE ZUM FLUORESZENZMIKROSKOPISCHEN BILD DER EPITHELZELLEN DER SCHEIDE

T. DONÁTH, GY. ORBÁN und R. GIMES

Die mit Akridinorange gefärbten Zellenelemente des Scheidenausflusses wurden den einzelnen Phasen entsprechend in Feuchtkammerpräparaten mittels (subvital) Fluoreszenzmikroskopes untersucht. Das Verfahren ist schnell, einfach und gibt ein getreues Bild, die Zellen können leicht differenziert werden. Die bei den verschiedenen Zelltypen erscheinenden Farbendifferenzen in der Fluoreszenz werden mit dem unterschiedlichen Nukleinsäuregehalt erklärt. Die mittels Akridinorange-Färbung erhaltene Fluoreszenzintensität ist der Basophilie der Zellstruktur proportional. Auf Grund der angewandten Methode, die gleichzeitig auch eine differenzierte Kernfärbung ermöglicht, wird bei der kolpozytologischen Auswertung, neben den morphologischen Veränderungen der Zellkerne und des Plasma, auch die Beobachtung der zytochemischen Veränderungen empfohlen. Der Affinität der Döderleinschen Bazillen zu gewissen Zelltypen wird eine Rolle zugeschrieben. Mittels der angewandten Methode werden auf Grund des Polymerisationsgrades des DNS die frühe und späte Phase der Kernpyknose, sowie die Fluoreszenzdifferenz zwischen den abgestorbenen und lebenden Leukozyten demonstriert. Im fluoreszenzmikroskopischen Bild können Bakterien und Trichomonas hervorragend differenziert werden.

Dr. Tibor DONÁTH
Dr. György ORBÁN
Dr. Rezső GIMES
Budapest, IX. Tűzoltó u. 58., Hungary

Morphological Department, Institute of Experimental Medicine of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest, and Department of Histology and Embryology of the University Medical School, Budapest (Director: Prof. I. TÖRÖ)

THE DETERMINATION BY DIFFERENTIAL EXTRACTION OF THE DISTRIBUTION OF P^{32} LABEL IN SECTIONS AND SMEARS

Z. PÓSALAKY, G. TÓTH, M. MÜLLER and L. CSÁKY

(Received November 3, 1959)

The incorporation and distribution of P^{32} label may be followed up by several biochemical methods [1, 2, 3]. The common principle in these methods is the determination of the specific activity of fractions obtained by differential extraction of homogenized tissues and cells. They do not allow, however, a histochemical or autoradiographic analysis of the material. Our recent researches into cellular metabolism have prompted the combination of the methods for determination of the P^{32} label with histochemical staining methods. The idea was to apply one of the biochemical methods in slides. On the basis of our trials the following procedure may be recommended.

Fresh frozen sections or isolated cells (protozoa, blood cells, spermatozoa, etc.) labelled with P^{32} are transferred to slides. The slides must be small so as to enable the radioactivity (expressed as count/minute) to be measured by an ordinary GM tube and scaler. The activity of the air-dried slides is measured and taken as the initial count. The P^{32} labelled compounds are then extracted by a modified Schmidt-Thannhauser procedure.

1. Fixation and removal of the acid soluble compounds (TCA-P) by cold (4°) 10% trichloroacetic acid (TCA) for 1 minute; thorough rinsing in tap water or 1% Na_2CO_3.

2. Extraction of the P-containing lipids (lipid-P) in several steps:
   a) treatment with 95% ethanol for 2×5 minutes,
   b) treatment with boiling ether-ethanol (1 : 1) for 5 minutes,
   c) rinsing in ether,
   d) treatment with boiling methanol-chloroform for 30 minutes.

Then either

3a. Extraction of the ribonucleic acid (RNA-P) by digestion with ribonuclease (RNase) at 37° for 18 hours. 0.5 mg/ml crystalline enzyme dissolved in distilled water;
   α) measurement of ultraviolet absorption of that solution before and after incubation and determination of its activity following incubation;

b. extraction of the deoxyribonucleic acid (DNA-P) by hot (90°) 5% perchloric acid (PCA) for 20 minutes;
   β) determination of its ultraviolet absorption and activity after treatment;

or

4. extraction of total nucleic acid (NA-P) by hot (90°) 10% TCA for 20 minutes.

The slides are dried after each step and their activity is measured. The data thus obtained correspond to the amount of the label retained in the slides. The amount of the label in individual fractions is expressed by the difference of the counts before and after extraction. All activities are given obtained in percentage of the initial activity. $3/\alpha$ and $3/\beta$ steps allow computation of the specific activity (expressed as Imp/min/1 γ NA) of P in both nucleic acids extracted.

Our method enables direct determination of the label in the following fractions: acid-soluble compounds, lipids, RNA, DNA; and determination of the specific activity of the phosphorus in the nucleic acids. The amount of the label in DNA is either determined by PCA treatment after RNase digestion (steps 3/a and 3/b) or computed as the difference of the means of NA-P and RNA-P (steps 3/a and 4). Most of the label retained (R—P) after the removal of total nucleic acid is probably bound to protein.

The slides may be treated by cytochemical methods or covered with autoradiographic emulsions so that the changes occurring during extraction may be followed up.

Tables I—IV give some examples of our results.

The method presents a picture of the distribution of the P^{32} label incorporated in cells or tissues (Tables I—III). Furthermore it facilitates comparison of the nucleic metabolism of the cells and tissues through the determination of the specific activities in the nucleic acids (see Table IV). In work performed on isolated cells, counting of the cells may lead to more conclusive results.

Table I

Distribution of P^{32} label in spermatozoa from bull epididymis incubated for 2.5 hours in Tyrode solution containing P^{32}

	No. of slide	TCA-P	Lipid-P	RNA-P	DNA-P	NA-P	DNA-P+R-P	R-P
			in per cent of initial count					
I RNase digestion	1	96.4	—	2.72	—	—	0.80	0.80
	2	94.5	—	4.58	—	—	0.83	0.83
	3	95.75	—	3.46	—	—	0.79	0.79
	4	94.8	—	4.42	—	—	0.78	0.78
	5	95.9	—	3.05	—	—	0.91	0.91
II TCA extraction of total NA	6	96.3	—	—	—	3.00	0.62	0.62
	7	96.5	—	—	—	2.75	0.73	0.73
	8	95.0	—	—	—	3.70	0.98	0.98
	9	95.4	—	—	—	4.46	0.54	0.54
	10	95.2	—	—	—	4.24	0.58	0.58
Mean		95.6	—	3.64	—	3.63	I 0.82 II 0.63	I 0.82 II 0.63
S. D.		± 0.708	—	± 0.824	—	± 0.755	± 0.029 ± 0.189	± 0.0529 ± 0.189

Table II

Distribution of P^{32} label in Tetrahymena pyriformis, *strain Gl cultivated for 48 hours in 1% peptone solution containing P^{32}*

No. of slide	TCA-P	Lipid-P	RNA-P	DNA-P	NA-P	DNA-P+R-P	R-P
	in per cent of initial count						
1	24.5	32.1	31.7	—	—	11.2	—
2	23.5	36.1	32.6	—	—	11.0	—
3	20.0	36.5	33.3	—	—	10.2	—
4	21.0	36.4	33.8	—	—	10.8	—
5	27.5	29.7	32.3	—	—	10.7	—
6	24.2	31.4	—	—	41.0	—	3.5
7	27.1	29.4	—	—	40.3	—	3.2
8	28.3	29.2	—	—	39.4	—	3.1
9	22.1	33.8	—	—	40.4	—	3.7
10	25.6	28.3	—	—	42.7	—	3.4
Mean	24.38	32.29	32.3	7.4	40.7	10.8	3.3
S. D.	± 2.77	± 3.20	± 0.96	—	± 1.022	± 0.37	± 0.25

Note: Mean of DNA-P computed as the difference of the means of NA-P and RNA-P. The difference of the means of DNA-P + R-P and R-P gives the same figure (7.5) for the DNA-P, which points to the correctness of the method.

Table III

Distribution of P^{32} label in isolated rat thymocytes 48 hours after intraperitoneal administration of labelled inorganic phosphate

No. of slide	TCA-P	Lipid-P	RNA-P	DNA-P	NA-P	R
	in per cent of initial count					
1	51.7	20.6	17.8	6.0	23.8	3.44
2	53.5	20.0	18.0	5.6	23.6	3.52
3	54.9	19.0	18.3	5.7	24.0	3.48
4	52.5	21.2	17.3	5.9	23.2	3.50
Mean	52.5	20.2	17.8	5.8	23.6	3.48

Note: The amount of DNA-P has been determined by its removal from all slides after the digestion with RNase (step 3b).

While the usual methods for the differential extraction of slides labelled with P^{32} aim at the removal of only one compound [4], our procedure permits the study of several fractions. The method may facilitate the use of P^{32} in autoradiography because slides containing the label in one certain compound may be processed.

Grateful acknowledgements are due to Mr. S. CZIEGLER for his skillful collaboration in performing the experiments.

Table IV

Distribution of P^{32} label in fresh frozen sections of rat thymus and liver removed 28 hours after intravenous administration of labelled inorganic phosphate

	Thymus						Liver				
No. of slides	TCA-P	Lipid-P	RNA-P	DNA-P	R-P	No. of slide	TCA-P	Lipid-P	RNA-P	DNA-P	R-P
	in per cent of initial count						in per cent of initial count				
1	34.6	20.2	14.0	25.3	5.6	1	24.1	52.5	13.1	5.2	5.1
2	38.6	19.2	13.1	23.9	5.2	2	23.9	52.1	13.0	6.5	5.0
3	35.7	21.7	8.5	24.8	5.3	3	25.1	51.9	12.2	6.5	4.3
4	39.2	19.2	13.0	25.2	5.8	4	23.6	53.2	13.0	6.9	4.3
5	35.2	23.0	10.5	25.7	5.6	5	24.6	52.3	12.7	5.6	4.8
6	33.8	24.2	12.3	24.6	5.1	6	25.2	50.6	12.9	6.4	4.9
7	36.3	21.5	10.1	26.2	5.9	7	23.0	52.9	13.1	5.6	5.4
8	35.7	21.2	12.7	25.7	5.7	8	24.3	51.9	12.9	5.9	5.0
9	38.0	21.1	10.0	24.6	5.3	9	23.5	52.1	12.9	5.9	4.6
10	39.0	19.7	9.6	25.9	5.8	10	23.7	53.5	12.8	5.8	4.2
Mean	36.2	21.1	11.4	25.2	5.5		24.1	52.3	12.9	6.0	4.8
S. D.	± 1.99	± 1.62	± 1.85	± 0.71	± 0.28		± 0.7	± 0.81	± 0.27	± 0.52	± 0.4
Spec. act. (imp/min./1 γ NA)			15.6	9.9					24.6	1.2	

Note: Specific activities determined according to $3|\alpha$ and $3|\beta$.

Summary

A method has been outlined for determination of incorporation and distribution of P^{32} label in isolated cells or sections. Fresh frozen sections of tissues or smears of cells containing P^{32} are extracted according to a modified biochemical (Schmidt—Thannhauser) procedure. The amount of the label in individual fractions is computed from the counts obtained before and after the extractions. The analysis of the incubation solutions allows the determination of the specific activity of nucleic acid (RNA and DNA) phosphorus. The processed slides may be subjected to histochemical or autoradiographic procedures so that combined biochemical and morphological results are obtained.

REFERENCES

1. Davidson, J. N. (1957): Some Critical Comments on the Chemical Estimation of Nucleic Acids on Tissues. Exp. Cell Res. Suppl., *4*, 260—263. — 2. Pósalaky, Z., Tóth, G. and Csáki L.: In preparation. — 3. Tankó, B.: Nukleinsavak vizsgálata. Kovách A.: Kísérleti orvostudomány vizsgáló módszerei. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1958. vol. 4. pp. 559—716. (In Hungarian.) — 4. Taylor, J. H. (1956): Autoradiography at the Cellular Level. Physical Techniques in Biological Research. Vol. III. p. 546. Academic Press, New York.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ P^{32} В СРЕЗАХ И МАЗКАХ ПУТЕМ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ЭКСТРАКЦИИ

З. ПОШАЛАКИ, Г. ТОТ, М. МЮЛЛЕР и Л. ЧАКИ

Описывается метод для исследования включения и распределения P^{32} в изолированных клетках и в тканях. Свежие срезы приготовили из тканей назамораживающем микротоме. Из срезов или мазков клеток, содержащих P^{32} экстрагируются содержащие фосфор вещества по видоизмененному биохимическому методу Шмидта и Таннгаузера. Количество P^{32} в отдельных фракциях вычисляется из активности, установленной перед и после экстракции. Путем анализа экстрагирующих растворов определяется удельная активность фосфора нуклеиновых кислот (РНК—ДНК). Обработанные срезы и мазки разрешают гистологический или авторадиографический анализ для сравнения биохимических данных с морфологическими.

BESTIMMUNG DER VERTEILUNG VON P^{32} IN GEWEBESCHNITTEN UND AUSSTRICHEN DURCH DIFFERENTIALEXTRAKTION

Z. PÓSALAKY, G. TÓTH, M. MÜLLER und L. CSÁKY

Es wird eine Methode zur Untersuchung der Inkorporation und Verteilung von P^{32} in isolierten Zellen oder Schnitten beschrieben. Frische Gefrierschnitte von Geweben oder Ausstriche von Zellen, die P^{32} enthalten, werden nach der modifizierten biochemischen Methode von Schmidt—Thannhauser extrahiert. Die Menge des P^{32} in den einzelnen Fraktionen wird aus der vor und nach den einzelnen Extraktionschritten gemessenen Aktivität berechnet. Eine Analyse der Inkubationsflüssigkeiten ermöglicht die Bestimmung der spezifischen Aktivität des Phosphors in den Nukleinsäuren (RNS und DNS). Zum Vergleich der biochemischen und morphologischen Ergebnisse können die so behandelten Schnitte oder Ausstriche auch histochemisch oder autoradiographisch untersucht werden.

Dr. Zoltán Pósalaky
Géza Tóth
Dr. Miklós Müller
László Csáky

Budapest, IX., Tűzoltó u. 58., Hungary

Section of Obstetrics (Head obstetrician: B. SZENDI) and Section of Pathology (Head pathologist: V. HEIM) County Hospital, Gyula, Hungary

GENITAL TUBERCULOSIS IN THE FEMALE: THE MECHANISM OF ITS GENERALIZATION

B. SZENDI and V. HEIM

(Received April 29, 1959)

The rare occurrence of female genital tuberculosis in association with pregnancy, the interaction of the two processes and their final issue have always claimed great attention. H. KRÄUBIG [15], KREIBICH [16], PATAT [17] and other authors have recorded several cases of genital tuberculosis either cured by tuberculostatic drugs or reduced to a state permitting conception. According to JAMESON, there has been an increase in the incidence of tubal pregnancy since the introduction of tuberculostatic drugs. KIRCHOFF [12] reports 49 out of 130 patients (almost 40 per cent) to have become pregnant after recovery from the bacteriologically proved disease. The good results and positive pregnancies attained with the therapeutic methods employed by SCHÄFER [20], KIRCHOFF [12], KREIBICH [16], etc., encouraged JEDBERG [9], SZENDI [25] and others to abstain from the removal of the tuberculous oviducts in women anxious to conceive, provided these were healed or the oviduct was for them to be made passable by surgical intervention. Opinions to the contrary maintain that the coincidence of genital tuberculosis and pregnancy is rare but all the more dangerous (KOVÁCS, 14; SCHÄFER, 20; SZENDI and LAKATOS, 24; PATAT, 18; FEKETE et al., 5; etc.).

During the past 7 years the present writers have been treating successfully 90 out of 160 cases of genital tuberculosis conservatively with tuberculostatics, in 10 instances not removing the tuberculous oviduct but making it passable by surgical intervention. None of the patients conceived. Reviewing the literature, STÜPER [22] concluded that pregnancy should be avoided while the tuberculous affection of the genitals is lasting and for one year after it. The question, however, arises whether or not in the present state of our knowledge it is possible dependably to establish recovery from genital tuberculosis. Departing from DIEHL's experimental results, KOVÁCS [14] believes genital tuberculosis to be a matter of organic disposition independently of whether the patient has merely passed through the disease or recovered completely. A subsequent exogenous infection or endogenous dissemination is liable to bring about a relapse. Nor is there any evidence for the new therapy to render gestation less dangerous once the genital tuberculosis

has healed. The present report is to call attention to the incalculable risks involved in pregnancy of the tuberculous genitals, mainly due to the difficulty of discovering the disease. As pregnancy seldom goes hand in hand with genital tuberculosis, there is no reason to suspect the latter, not even in the presence of adnexitis, sepsis, etc. The case under review merits attention not only as one of unilateral chronic tuberculosis combined with pregnancy or as one of lethal generalization consequent upon its activation due to interruption of pregnancy or upon insufficient therapy but also as one throwing light upon the mechanism of the process of generalization.

Case Report 171-I/1958

A woman aged 32 years with two previous deliveries and two abortions. Her last pregnancy two years ago had terminated in spontaneous abortion without complications. Tuberculosis in the left Fallopian tube must be assumed to have developed subsequent to her pregnancies. On January 8, 1958, she had been curetted in another hospital for a 2-month pregnancy. Three days later she had developed a high temperature and slight jaundice with enlargement of the liver. After 2 weeks of unsuccessful medical treatment she was referred to our department with a diagnosis of postabortive sepsis. The record at discharge mentioned postabortive febrile state, cholangitis, jaundice, slight anaemia and brucellosis. Treatment included penicillin, streptomycin, chloramphenicol, blood transfusion, etc. At admission no resistance was felt in the hollow abdomen. The liver reached two fingersbreadth below costal arch. Chest X-ray was negative. Gynaecological finding: moderate perineal rupture, erosion, uterus of normal size, somewhat enlarged and sensitive adnexa on both sides. Temperature 37.8 to 38.6 C°, pulse 90—100/min; RBC 3.800.000, WBC 6.800; differential count neutrophils: young 3, unsegmented 8, segmented 59, eosinophils 2, monocytes 4, lymphocytes 20. ESR 25/h. Serum bilirubin, indirect, 0.18 mg per 100 ml. Thymol turbidity 9 units. The non-typical clinical symptoms following interrupted pregnancy were suggestive of puerperal fever. After blood transfusion, streptomycin and aureomycin treatment were prescribed and in view of the jaundice and the pathological liver function test, the patient was transferred to the Internal Department with a tentative diagnosis of epidemic hepatitis. Here she was treated for six weeks with penicillin, streptomycin, chloramphenicol, erithromycin, cortisone, delta-cortisone. Repeated attempts to recover the pathogenic agent from the blood were unsuccessful except on two occasions when *Staphylococcus albus* and *Streptococcus viridans* were identified. Six weeks later the patient was transferred to the Surgical Department with the diagnosis of hepatic abscess.

At operation no liver abscess was found, but a thick inflamed left tuba with pus in its lumen. Behind the tuba and extending behind the ovary there was a chronic abscess. Tuba, ovary and abscess wall were removed.

Their histology deserves to be discussed in some detail in order to gain some insight into the mechanism of relapse and miliarization of chronic tuberculous processes in the course of pregnancy. The findings were as follows: the wider lumen of the thin-walled oviduct is replete with a homogeneous eosinophilic substance. In place of the mucous membrane there is a thin tissue rich in cells, continuing in fibres in the homogenous substance, with heterocellular tubercles amidst the thinner or wider canals which are lined with cuboidal epithelium (Fig. 1). Among the muscle fibres there are lymphocytic infiltrations with some granulocytes and plasma cells. This tuberculous lesion must have been of long standing. The structure of the ovary is mostly normal, the surface showing a few, the hilum numerous single and confluent tubercles with caseated centres. Mesosalpinx and mesovarium are rich in cells, with many tubercles below the superficial layer around dilated blood-filled vessels. The inflamed granulation tissue penetrates into the walls of the small veins and extends as far as the uneven granulation tissue replacing the endothelium (Fig. 2). Some blood-filled sinuses and spaces are lined with confluent tubercles.

The peritoneum which has been removed together with the adnexa is overgrown by granulation tissue rich in cells, with numerous tubercles. Serial sections revealed a growth of inflamed funguslike granulation tissue penetrating from the neighbouring tubercles into a lymph space lined with epithelium (Figs. 3—4). The histological diagnosis was caseous

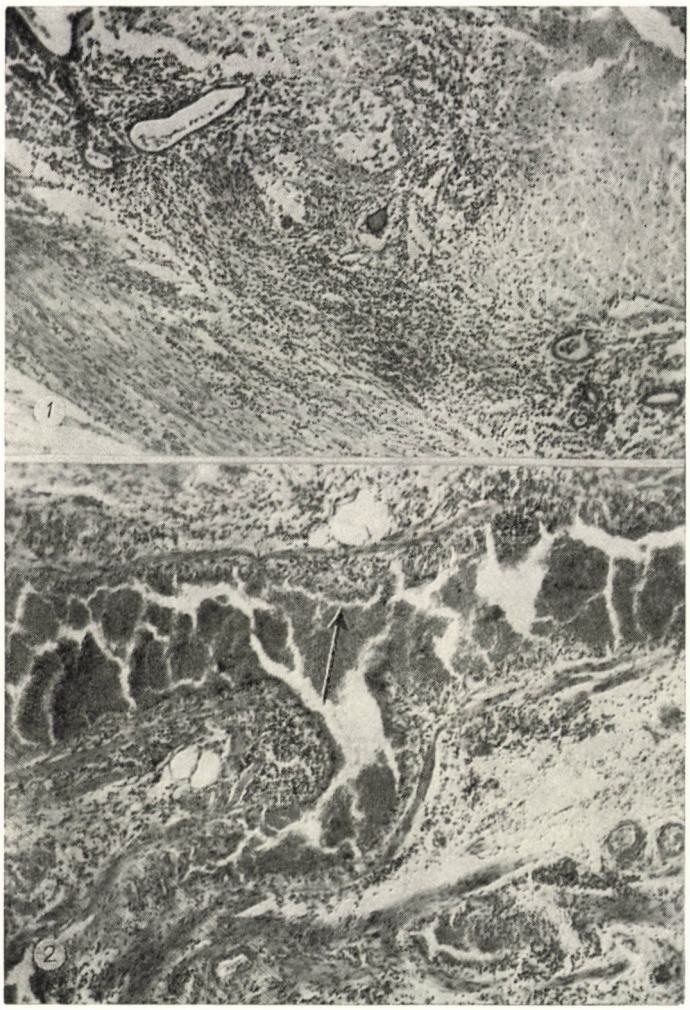


Fig. 1. Left tuba filled with caseous substance. Tubercles covering most of the mucosa
Fig. 2. The tuberculous granulation tissue of the left mesosalpinx had invaded the wall of the small veins

chronic tuberculosis and peritonitis, perisalpingo-oophoritis, chronic tuberculous phlebitis and lymphangitis.

The patient died 6 days after the operation, with rapidly spreading paralysis.

Post-mortem gross examination revealed the following: in the thick grey basilar arachnoid there are numerous grey solid granules from boiled semolina to poppy seed in size, and thick congested ventricular plexuses with many grey and dull yellow granules from poppy seed to millet or even pea size. A smear made from the basilar arachnoid contains a multitude of *Micobact. tuberculosis.* The lungs are free both these and the thin smooth pleura are covered with numerous solid granules from poppy seed to millet size. The hilar lymph nodes of the size of a bean are uniformly black in colour except for one single compact lymph node situated at the right main bronchus near the tracheal branching. This lymph node demarcated from its environment shows a solid white cut surface with blackish spots on its periphery, the liver is nor-

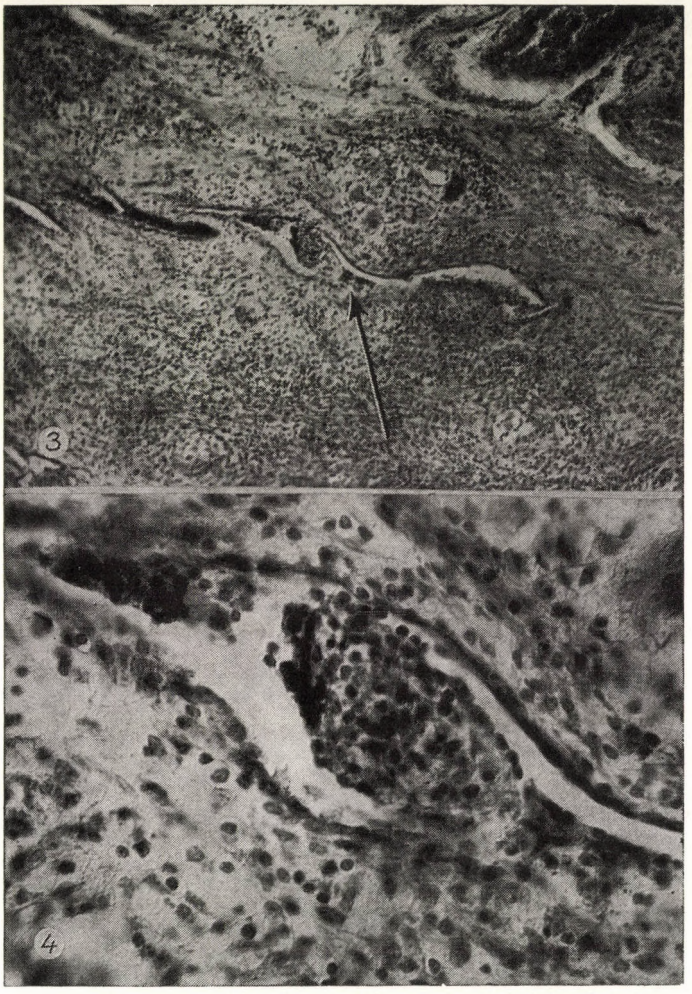
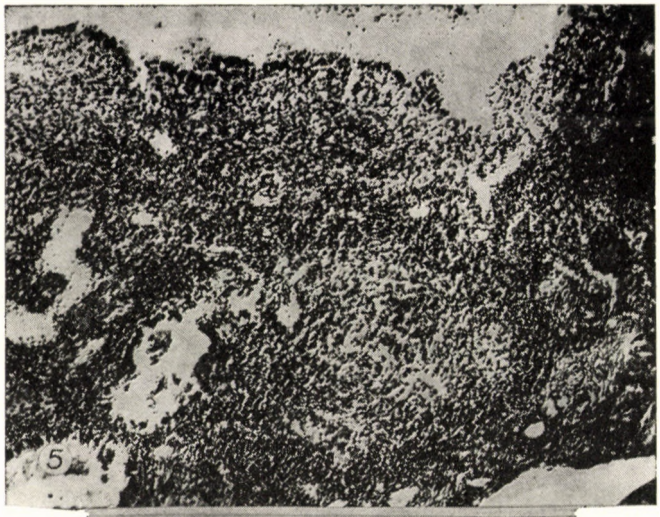


Fig. 3. Tuberculous granulation tissue penetrating a lymph space of the peritoneum
Fig. 4. Lymph space as on Fig. 3 showing granulation tissue with fungus-like inflammation. High-power

mal with a thin smooth capsule, and with soft substance, its cut surface is dull brown and fragile and contains numerous scattered solid dull yellow granules from semolina to poppy seed in size. The left oviduct and ovarium are missing. Spleen and kidneys are devoid of tubercles. The uterus is medium sized with a smooth surface and a solid wall of normal thickness, flattened lumen, closed cervical canal, normal cervix. Its mucous membrane is dull light-brown in colour with small yellowish spots. The right tuba is of pencil thickness, has a smooth surface and its lumen is empty. The right ovary displays superficial protrusions, is half a plum in size, with scarred follicles on the cut surface.

Microscopic examination revealed in the thin endometrium no structure characteristic of some functional stage. The gland lumina vary in width, the lining epithelium is detached in many places, with the nuclei situated in the cell centres (Fig. 5). Scattered epitheloid tubercles are present in the interstitium. The capillaries of the basal layer are wide and filled with blood. In the cervical mucosa there are some heterocellular tubercles amidst the normal glands (Fig. 6). The thin epithelium of the portion is of normal structure.



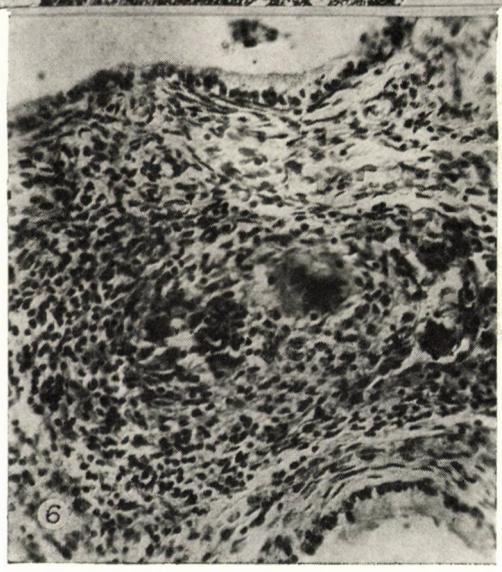


Fig. 5. Tuberculous uterine mucosa
Fig. 6. Tuberculous cervical mucosa

The lumen of the right tuba is slightly widened, its mucosa is rich in cells (Fig. 7), forms villous elongated processes and is covered in some areas by single-layered columnar or cuboid epithelium (Fig. 8). In the connective tissue there are numerous lymphocytes; neutrophiles and plasma cells are rare. The tissue does not present any manifest sign of tuberculosis (Figs. 7—8). The right ovarium is normal.

The ventricular plexus and the basilar arachnoid present numerous single or confluent heterocellular tubercles; those in the plexus are caseated.

In the lungs and the liver there are a few necrosed tubercles. Nearly the hole of the lymph node lying next to the right principal bronchus consists of roughly bundled homogeneous hyaline connective tissue, with a few small spots of black granules. The periphery of the lymph

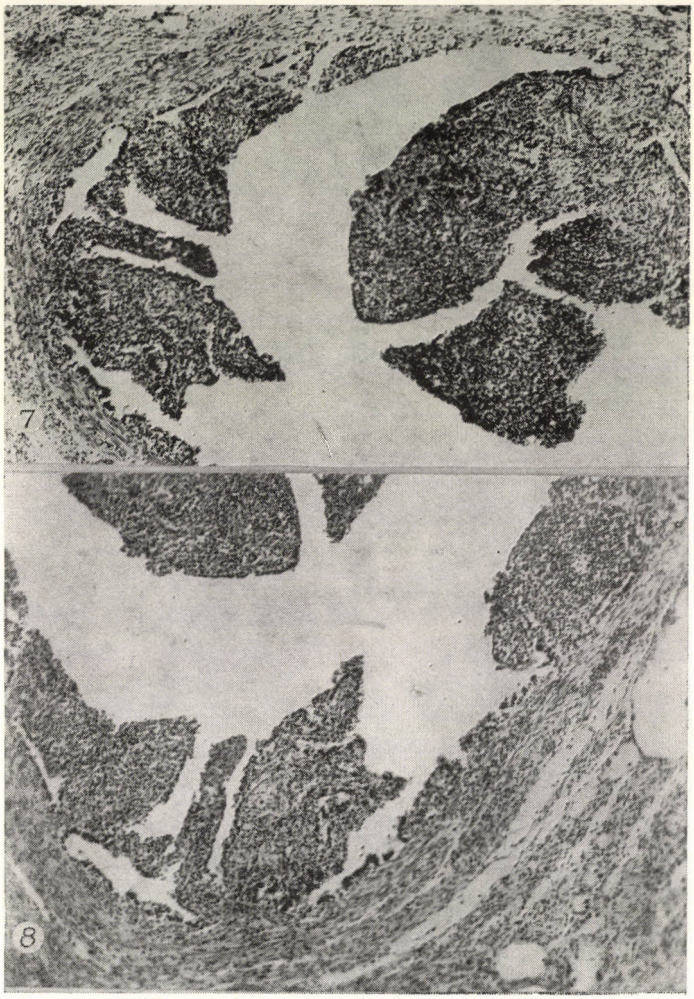


Fig. 7. Right tuba; inflamed granulation tissue forming abnormal rough folds in the place of the mucosa. Magnification, as in Fig. 1

Fig. 8. Right tuba. Low power

node consists of fibrous connective tissue more abundant in cells, with groups of lymphocytes and black granules. In the kidneys there are no tubercles only a few small lymphocytic infiltrations in the cortex. The spleen is devoid of tubercles.

According to the microscopic examination, death was due to generalized miliary tuberculosis and tuberculous meningitis. As to the mechanism of miliarization the following questions arise.

A) Which local tuberculous affection was responsible for the dissemination and

B) through what channels did that occur?

C) What had mobilized the tuberculous focus and started its generalization?

A) The probable sources were the removed left uterine adnexum and the scarred lymph node close to the right principial bronchus. In the latter which consisted of scarred connective tissue there was no sign of activity. Admitting the lymph node ever to have been infected, it must certainly be regarded as the oldest among all identifiable lesions. The active tuberculosis in the removed left tuba and ovarium and in the adherent broad ligament and peritoneum certainly was of longer standing than any in the rest of the genitals or in any other part of the organism. Consequently, the adnexum was the only probable focus from which tuberculosis could have disseminated. There is abundant evidence both from before the use of tuberculostatic drugs (STÜPER, 22; KOVÁCS, 14, etc.) and from after it (ALEX; STUDDIFORD; KOVÁCS; 14; etc.) to prove the possibility of a postpartal or postabortive miliarization of genital tuberculosis. STÜPER [22] refers to 364 recorded cases (apart from 5 observed by the present writers) of miliary and meningeal tuberculosis combined with pregnancy. In 53 out of 100 cases the fatal complication was due to genital tuberculosis plus pregnancy, while in combination with extragenital tuberculosis it was less dangerous and less frequent.

B) The venules in the mesosalpinx of the removed left adnexum were intruded by tuberculous granulation tissue. Similar tuberculous intrusions were found behind the adnexum in the wall of the peritoneal abscess and in the lymph spaces of the peritoneum. Consequently, the tuberculous process had disseminated from that point, by either the blood or the lymph. The portacaval anastomoses in the venous system of the parametrium and the paraproctium suggest haematogenous dissemination either from the vena rectalis cranialis via the vena mesenterica caudalis towards the vena portae or from the vena rectalis caudalis via the vena iliaca interna towards the vena cava. From the recent findings of KISS and TARJÁN [13] the venous system of the genitals is known to possess no valves so that there is no obstacle for the tuberculosis bacilli or for other substances to enter the major cardiac veins. On the other hand there are good reasons to allow for a dissemination along the lymph vessels. BRAUDE [4] asserts that the peritoneum covering the broad uterine ligament and the coecum is an elective resorbent area. According to HIGGINS and GRAHAM [8], the lymph vessels leading off the peritoneum empty not into the thoracic duct but into the mediastinal and pulmonary lymph nodes, *i. e.* for the greater part into the right lymphatic trunk and the thoracic vessels. BARTALS [2] furthermore points out that the plexus subovaricus formed from the ovarian lymph vessels, together with the lymph ducts of the corpus uteri and the tuba is leading into the preaortal and peri-aortal lymph nodes. The gross examination of the mediastinal, pulmonary and aortal lymph nodes failed to reveal tuberculous lesions.

Our findings seem to permit the statement that fatal miliarization was due to haematogenous rather than lymphogenous dissemination. Dissemination through the portacaval system offers a ready explanation for the miliary tuberculosis of the lungs and the liver. The meningeal process seems to indicate that the bacilli have entered the arterial circulation without forming any tubercles in the spleen and the kidneys. They probably penetrated the lungs, though the disease may have spread to the basilar arachnoid *via* direct routes recently assumed but not finally proved to exist between the peritoneal lymph ducts and the subarachnoidal spaces (RUSZNYÁK et al.; 12).

C) Four ways suggest themselves to explain mobilization, with ultimate miliary tuberculosis, of the possibly several years old tuberculosis of the uterine adnexa and its environment as the only active focus of the organism.

1. Progression of salpingeal tuberculosis without the influence of external factors.

2. Haemodynamic conditions, involving abundance of blood and vessels peculiar to the pregnant uterus, activating the until then latent tuberculosis.

3. Bacillaemia in consequence of interrupted pregnancy.

4. Bacillaemia in consequence of the surgical removal of the tuberculous adnexum.

Assumptions 1 and 2 are weakened by the absence of complaints indicative of generalized tuberculosis in the period before pregnancy and even prior to its interruption. Only on the 3rd day after the interruption did fever appear, accompanied by general symptoms of illness. Presumably, puerperal infection and inflammation of the genitals consequent upon the interruption of pregnancy caused the disease of the left tuba to flare up; so tuberculosis seems to have been activated not by pregnancy but its interruption. Literature has recorded a great number of similar cases. Surgical intervention may have been another mobilizing factor. STERN [21] and other authors emphasize, and all gynaecologists are well aware of, the risk of mobilization due to injury and on account of it in febrile states they not only abstain from operation on the tuberculous genitals but disapprove even of a simple uterine examination or curettage, whether or not under the protection of tuberculostatic drugs.

It appears of course legitimate to inquire after the time and nature of the dissemination. According to STERN [21], dissemination may be due to some injury whenever this has not been preceded by pathological symptoms, provided that the time elapsed since the injury is equal to what the granules needed to attain the developmental stage ascertained at the *post-mortem* examination. In our case the patient died 10 weeks after the interruption of her pregnancy, 6 days after the operation. The miliary tubercles were from poppy seed to millet in size, with caseation in the latter. According to BAUMGARTEN [3] and others, tubercles become conspicious on the 10th

to 14th day of their development, attaining millet size and beginning to caseate after 6 weeks. There is long-standing experience from before the use of tuberculostatic drugs that miliary tuberculosis in conjunction with tuberculous meningitis usually killed the patient within 2 to 3 months (WEPLER, 26). In the case under review the structure of the tubercles allowed to presume a period of development equal to that from the interruption of pregnancy to the patient's death.

The surgical intervention had an effect decidedly to the worse considering that immediately after it the general state of the patient began to deteriorate and meningeal symptoms occurred. Since six days later the patient died, and since she was being treated with various antibiotics, including streptomycin, the tubercles as the morphological signs of a recent bacterial dissemination, due to the surgical trauma could not fully develop. A conspicuous feature was the postoperative appearance of meningitis and its exacerbation. In morphologic interpretation of this case the facts must duly be considered that from the beginning the patient had been given antibiotics and that these weakened the bacteria and inhibited formation, growth, etc. of the tubercles. It is known that on the effect of tuberculostatics the previously fatal clinical course of tuberculous leptomeningitis has greatly changed, even complete recovery has been attained in 25 to 30 out of 100 cases, with a corresponding change in the histological picture. In our particular case the applied therapy, accidental and insufficient as it was, seems to have been unable to suppress development of the tubercles and their development can safely be regarded to have proceeded for at least 2 months. The left tuba and ovary and their environments were suggestive of long-standing chronic tuberculosis while the absence of tubercles from the mucous membrane of the right tuba and its normal size and form pointed to an affection subsequent upon the dissemination. The tubercles of the endometrium appeared not older than a few weeks. The fact that conception would have been possible had the right tuba and the uterine mucous membrane been intact and properly functioning, is in itself evidence in favour of a primary and localized left chronic adnexal tuberculosis. In tuberculosis of the genitals, especially of the tubae, the endometrium may for some time remain intact; KAUFMANN [11] observed that the infection spreads more readily from the tuba to the peritoneum than to the uterine mucous membrane and is more frequently the cause of secondary tuberculosis in the first-mentioned organ; he also found that sometimes the tuberculous tuba may freely communicate with a circumscribed abscess-like small focus, confined to a part of Douglas' cavity. This may have been the case in our patient. FROMME and HEYNEMANN [6] found an open abdominal end of the tuba in 50 per cent of their cases, allowing the pathogenic agent together with the caseous substance to reach the peritoneum. Unilateral localized genital tuberculosis seems

to be more frequent than it is actually noticed. One of us (SZENDI [23]) has lately described a case of isolated left ovarian tuberculosis and is of the view that the circulatory conditions of the genital blood and lymph system are responsible for the fact that by the time the latent disease can be identified on the strength of its vague symptoms, it has usually attacked both adnexa as well as the uterina cavity. Presumably, for similar reasons salpingeal and genital tuberculosis are usually described as bilateral processes (GÖGL—LANG [7]). As according to the current view, genital tuberculosis is mostly due to haematogenous bacillaemia spreading along the respiratory ducts, the node in the vicinity of the bronchus, as the only spot suggestive of a long-standing tuberculous lesion, seems to indicate the hilum to have been the point of intrusion and the primary focus whence the disease had penetrated possibly many years ago the left tuba. Finally, it merits attention and has been confirmed by other authors that an insignificant and apparently healed pulmonary infiltration is capable of giving rise to serious tuberculous lesions in the predisposed genitals. The organism though it was able to cope with the primary lesion of the hilum, succumbed to the resulting genital tuberculosis that had remained latent as an infectious focus until its final flare-up in the form of fatal miliarization.

Summary

Departing from the histological findings in a case of female genital tuberculosis, the reasons, the mechanism and the routes of generalization consequent upon gestation have been discussed. It has been established that unilateral genital tuberculosis does not exclude uterine pregnancy but interruption of the latter combined with puerperal infection and inflammation of the genital organs is apt to involve generalization. The process has been observed to start with the intrusion of the tuberculous granulation tissue into the blood and lymph vessels and to spread by haematogenous rather than lymphogenous dissemination of the bacilli to the genitals and the peritoneum. Even up-to-date therapy does not exclude fatal termination of generalization.

REFERENCES

1. BATIZFALVY, J. (1957): Orv. Hetil. *98*, 197. A női genitális tuberculosis (Female Genital Tuberculosis). — 2. BARTELS, P.: cited by Rusznyák et al. (19). — 3. BAUMGARTEN, I.: cited by Stern (14). — 4. BRAUDE, A. I.: cited by Rusznyák et al (19). — 5. FEKETE, L.—FORGÁCS, M.—MISKOVITS, G. (1953): Placenta gümökór magzati gümőkór nélkül. Orv. Hetil. *94*, 1224. (Placental Tuberculosis without Foetal Tuberculosis). — 6. FROMME and HEYNEMANN: cited by Gögl—Lang (7). — 7. GÖGL, H.—LANG, F. J. in Kaufmann and Staemmler: Lehrbuch der speziellen pathologischen Anatomie. Vol. II. de Gruyter. Berlin (1957). — 8. HIGGINS, G. M. and GRAHAM, A. S.: cited by Rusznyák et al. (19). — 9. JEDBERG, I.: cited by Schäfer (13). — 10. KARDOS, F. (1957): Feltöltéses röntgenvizsgálat alkalmazása és jelentősége a női ivarszervi tuberculosisban. (Application and Significance of Contrast X-ray Examination in Female Genital Tuberculosis) Tuberkulózis. *10*, 36. — 11. KAUFMANN: cited by Gögl—Lang (7). — 12. KIRCHOFF, H. (1956): Die Genitaltuberkulose der Frau. Ber Ges.. Gyn. Obst. *57*, 274. — 13. KISS, F.—TARJÁN, GY. (1956): Az arteriovenosus anas-

tomosisok szerepe az arteria uterina rendszerében. (Arteriovenous Anastomoses in the Uterine Arterial System). Magy. Nőorv. Lapja. *19*, 129. — 14. Kovács, F.—Gavallér, I. (1958): Klinische Erfahrungen in 550 Fällen weiblicher Genitaltuberkulose. Acta Med. Hung. *9*, 249. — 15. Kräubig, H. (1954): Genitaltuberkulose und Schwangerschaft. Geburtsh. Frauenheilk. *14*, 220. — 16. Kreibich, H. (1958): Über die tuberkulose Erkrankungen der weiblichen Genitale. Fischer. Jena, p. 126. — 17. Patat, P. (1957): Genitális tuberkulózis. Tuberkulózis *10*, 131. — 18. Patat, P. (1959): Izolált endometritis tuberculosa utáni terhesség és szülés. (Pregnancy and Delivery after Isolated Tuberculous Endometritis). Orv. Hetil. *100*, 268. — 19. Rusznyák, I.—Földi, M.—Szabó, Gy. (1955): A nyirokkeringés élet- és kórtana. Akadémia könyvkiadó. Budapest. (Biology and Pathology of the Lymph System). — 20. Schaefer, G. (1953): Female Genital Tuberculosis. Obst. Gyn. Survey. *8*, 461. — 21. Stern, R. (1930): Über traumatische Entstehung innerer Krankheiten. Fischer, Jena. — 22. Stüper, P. (1954): Statistische Untersuchungen über das Zusammentreffen von Schwangerschaft und Miliartuberkulose. Zbl. Gynäk. *76*, 953. — 23. Szendi, B. (1958): Isolierte, disseminierte, akute halbseitige Ovartuberkulose. Beitr. Klin. Tuberk. *119*, 163. — 24. Szendi, B.—Lakatos, I. (1958): A női ivarszervi tbc. előfordulása Békés megyében az utolsó 5 évben kiszűrt 143 eset kapcsán. (143 cases of Female Genital Tuberculosis Observed in the Last 5 years in the County of Békés). Tuberkulózis. *3—5*, 108. — (1958) Endometrium vizsgálatok activ tüdő tbc-s asszonyokon. (The Endometrium of Women Suffering from Active Pulmonary Tuberculosis). Orv. Hetil. *99*, 1066. — (1959) Histologische und bakteriologische Untersuchungen (durch Züchtung) der Uterusmukosa von 100 in aktiver (akuter oder chronischer) Lungentuberkulose leidenden Kranken. Beitr. Klin. Tuberk. *119*, 434. — 25. Szendi, B. (1958): A női ivarszervi tuberkulózis műtétes terápiája konzervatív lehet-e a tuberkulostatikumok birtokában? Magy. Nőorv. Lapja. *21*, 328. (Possibilities of Conservative Surgical Therapy of Female Genital Tuberculosis under Application of Tuberculostatics). — (1959). Ermöglichen die Tuberkulostatika eine Anderung etc? Beiträge zur Klinik der Tuberkulose. *120*, 225. — 26. Wepler, W.: in Kaufmann and Staemmler: (1956) Lehrbuch der speziellen pathologischen Anatomie. Vol. III. de Gruyter, Berlin.

ДАННЫЕ К МЕХАНИЗМУ ГЕНЕРАЛИЗАЦИИ ТУБЕРКУЛЕЗА ЖЕНСКИХ ПОЛОВЫХ ОРГАНОВ

Б. СЕНДИ и В. ХЕЙМ

Проводилось патогистологическое исследование для выяснения причин, механизма и путей генерализации туберкулеза женских половых органов, наступающей в ходе беременности. Было установлено, что при одностороннем туберкулезе половых органов может наступить внутриутробная беременность. Прекращение беременности (роды, выкидыш) и родовой сепсис или же воспаление половых органов и т. д. могут вызвать генерализацию туберкулеза. Согласно исследованному случаю данный процесс начинается врастанием туберкулезной грануляционной ткани и туберкулезных палочек в кровеносные и лимфатические сосуды, и к его распространению и генерализации заболевания предоставляют соответствующечю возможность кровеносные и лимфатические сосуды половых органов и брюшной стенки. В исследованном случае туберкулезная инфекция рассеивалась скорее по кровеносным сосудам. Генерализация даже при современных терапевтических возможностях может привести к летальному исходу.

BEITRÄGE ZUM GENERALISATIONSMECHANISMUS DER WEIBLICHEN GENITALTUBERKULOSE

B. SZENDI und V. HEIM

Ursachen, Mechanismus und Weg der im Laufe der Schwangerschaft entstehenden Generalisation der weiblichen Genitaltuberkulose wurde untersucht und festgestellt, dass bei einseitiger Genitaltuberkulose eine intrauterine Schwangerschaft zustandekommen kann. Die Unterbrechung der Schwangerschaft (Geburt, Fehlgeburt) und puerperale Infektion,

bzw. Entzündung der Genitalien usw. können eine Generalisation der Tuberkulose hervorrufen. In dem untersuchten Falle begann die Generalisation mit dem Eindringen des tuberkulösen Granulationsgewebes und der Bazillen in die Blut- und Lymphgefässe; zur Weiterverbreitung bieten sowohl die Blut- wie die Lymphsysteme der Geschlechtsorgane und des Bauchfells eine Möglichkeit. Im untersuchten Falle wurde die tuberkulöse Infektion eher hämatogen verschleppt. Die Generalisation kann selbst bei moderner Therapie tödlich sein.

Dr. Balázs Szendi
Dr. Vilmos Heim
Gyula, Megyei kórház, Hungary

Laboratoire de Neuro-Histologie (Directeur: Prof. WEBER), Institut d'Anatomie humaine normale (Directeur: Prof. BAUMANN) Université de Genève; et Clinique de Psychiatrie, Université médicale de Budapest (Directeur: Prof. NYIRŐ)

MODIFICATIONS DE LA STRUCTURE NUCLÉAIRE DANS LES ÉLÉMENTS MOBILES DE L'ÉCORCE CÉRÉBRALE HUMAINE, LORS DE PHÉNOMÈNES DE NEURONOPHAGIE, CHEZ DES INDIVIDUS ATTEINTS DE MALADIES MENTALES

MÁRTA HARANGHY

(Reçu le 10 Juin 1959)

Ce travail était accompli avec l'aide et conseils de Monsieur le Professeur A. Weber et basé sur ses préparations. Pour ses éfforts j'aimerais lui exprimer ici même mes sentiments les plus reconnaissants.

Matérial et méthode

Nos observations ont été faites sur des fragments de l'aire corticale préfrontale 9, détachés par biopsie et fixés aussitôt, chez différents déments soignés au Manhattan State Hospital de New York. Les pièces ont été traitées au Laboratoire central de cet hôpital; étant destinées à l'étude des synapses interneuronales, elles ont toutes été imprégnées par l'argent réduit, suivant la technique de A. WEBER [25] et débitées en coupes sériées, d'une épaisseur de 10 M. Les résultats que procure cette méthode, qui associe la dissolution des lipides à la fixation par le formol, ne sont pas contredits par les découvertes récentes sur l'ultra-structure du tissu nerveux, obtenues grâce au microscope électronique et dont une des principales est la confirmation de l'individualité du neurone.

La bonne fixation de ces pièces permet d'observer très nettement différents détails dans le noyau des cellules nerveuses: ainsi les aspects polymorphes du nucléole, le plus souvent très volumineux et très argyrophile, en outre, l'appareil nucléolaire de H. HYDÉN [16], assez faiblement teinté. Dans les éléments qui se divisent, les chromosomes sont fortement colorés durant la mitose, par ce procédé d'imprégnation; mais dans les noyaux au repos, comme ceux des cellules nerveuses pendant toute leur existence, la chromatine se devine sous la forme de granules d'un jaune clair, disséminés dans le caryoplasme ou bien appliqués à la face interne de la membrane nucléaire, qu'ils contribuent à rendre, en apparence, plus épaisse. Cette même technique met aussi en évidence une saillie du nucléole, à peine teintée mais bien délimitée; ce satellite a été découvert par M. L. BARR et E. G. BERTRAM [2] sous le nom de «sex chromatin». Il correspond aux deux chromosomes sexuels des femelles et se rencontre dans le noyaux somatiques de la plupart des Mammifères ou de l'espèce humaine. Chez la femme, le satellite peut être observé dans la cellule nerveuse, contre le nucléole ou bien adossé à la membrane nucléaire; il est invisible ou très net suivant l'orientation des coupes minces, mais semble constant. Les colorations utilisées par I. BERTRAND et C. GIRARD [7] leur ont montré aisément la chromatine sexuelle dans les noyaux de la macroglie et plus difficilement dans ceux des éléments nerveux. Avec la méthode d'imprégnation de A. Weber, c'est exactement l'inverse; sauf dans des conditions spéciales, qui seront indiquées plus loin, le satellite nucléolaire reste dissimulé dans le caryoplasme de la névroglie. Il n'est pas rare aussi de rencontrer dans le noyau des neurones chez la plupart des Vertébrés et en particulier chez l'Homme, des inclusions qui ont la forme de minces batonnets; leur argyrophilie a fait croire jadis que des fibres nerveuses étaient capables de pénétrer dans le caryoplasme. Certaines formes de ces cristalloides, qui ont l'aspect d'un filament, se trouvent en abondance chez les Mammifères normaux, en dehors de toute intervention expérimentale sur le tissu nerveux (A. WEBER [26]); d'autres inclusions de même nature se présentent d'une façon différente et semblent réservées aux cellules cérébrales de ceux qui sont atteints de maladies mentales.

Dans le neuroplasme du corps du neurone, la même technique d'imprégnation argentique met en évidence des filaments fins, enchevêtrés en un fouillis qui donne l'apparence d'un réseau compact et tridimensionnel. Lorsqu'il est possible d'examiner cette structure dans des zones où elle est réduite à une couche très mince, par exemple à la surface de la sphère nucléaire, on a l'impression bien nette que ces neurofibrilles sont indépendantes les unes des autres et correspondent peut-être à des groupements de ces neuroprotofibrilles découvertes par E. DE ROBERTIS et C. M. FRANCH [24], grâce à l'emploi du microscope électronique, ou bien à certaines portions du réseau endocytoplasmique, qui appartient également à l'ultra-structure du neuroplasme. En utilisant la même technique et en observant avec les meilleures combinaisons optiques du microscope ordinaire, l'origine de l'axone sur la cellule nerveuse, on constate que ces fibrilles argyrophiles qui remplissent le neuroplasme depuis le noyau jusqu'à la membrane cellulaire, semblent se fusionner, si bien que l'axoplasme des neurites possède alors une teinte uniforme, jusqu'à ces filaments extrêmement minces, qui se placent à l'extrémité de la fibre et constituent l'Appareil métaterminal de A. WEBER [27]. Il se trouve que, suivant leurs fonctions afférentes, efférentes ou autonomes, les fibres nerveuses montrent, en recourant à cette méthode d'imprégnation argentique, une coloration différente caractéristique, qui dépend de la quantité de granules d'argent réduit déposés dans l'axoplasme, entre les neuroprotofibrilles (CH. A. BAUD et E. PERNOUX [15]).

Dans la technique de A. Weber, le fixateur laisse à leur place les différents éléments des tissus; le dépôt d'argent dessine leurs formes et permet ainsi de les reconnaître. En ce qui concerne le tissu nerveux des centres, il est nécessaire de remarquer que, tandis que la substance de Nissl reste incolore, mais peut être décelée cependant par une coloration supplémentaire, la réticuline qui accompagne les vaisseaux, même les capillaires, se teinte fortement en noir, comme certaines fibres sensitives. Lorsqu'il existe un doute sur la nature d'une fibre très fine imprégnée par l'argent, il faut recourir à son examen en lumière polarisée. En effet, les prolongements mis en évidence dans ces mêmes conditions, renferment des grains métalliques déposés dans leur épaisseur et non à leur surface, comme dans la plupart des autres méthodes. On observe alors un dichroisme qui est propre au neuroplasme; ce phénomène se manifeste ainsi: quand les ondes lumineuses vibrent suivant l'axe longitudinal de la fibre, cette dernière paraît plus sombre; tandis qu'il y a un minimum d'absorption de la lumière polarisée, lorsqu'elle est dirigée perpendiculairement à ce même axe; les fibres nerveuses palissent alors, ou bien parfois deviennent à peine visibles. Ce résultat caractérise l'ultrastructure longitudinale de l'axoplasme; il n'intéresse en rien la réticuline, dont les filaments restent identiquement sombres quelle que soit la position des nicols dans le microscope polariseur (CH. A. BAUD [3]).

Discussion

Avec l'emploi de cette même méthode d'imprégnation, il est facile de reconnaître les différents éléments du sang ou ceux des parois vasculaires; mais de même que celui des cellules névrogliques, le protoplasme des lymphocytes demeure incolore et par conséquent invisible. Tous ces éléments qui peuvent former des cellules mobiles à travers l'écorce cérébrale, qu'ils viennent du sang ou de l'adventice des vaisseaux et soient ainsi d'origine mésodermique, ou bien qu'ils prennent naissance dans le tissu glial ectodermique, apparaissent les uns et les autres comme des noyaux nus. Du reste, la charpente névroglique fibrillaire des centres nerveux n'est pas plus visible.

Lorsqu'une cellule blanche du sang traverse par diapédèse la paroi d'un capillaire, son contenu nucléaire fortement coloré par l'argent réduit semble compressé et le noyau prend un aspect pycnotique; mais lorsqu'il s'insinue dans les espaces intercellulaires de la substance grise corticale, les petites masses uniformément argyrophiles qui le remplissent, s'écartent les unes des autres. Le noyau en question demeure cependant assez foncé; il est impossible

de le confondre avec celui d'autres éléments de la mésoglie mésenchymateuse. Les neurophagocytes qui sont d'origine ectodermique, ont un tout autre aspect. On admet généralement que ce sont des oligodendrocytes, mais J. FIRKET [14] n'est pas aussi exclusif et leur associe des astrocytes. Quelques observateurs font aussi intervenir les satellites des cellules pyramidales; mais en dehors de circonstances expérimentales ou pathologiques, il n'existe autour des éléments nerveux corticaux chez les Mammifères aucune couche nuclée, analogue à celle des ganglions périphériques (J. W. PAPEZ [20]). Les cellules mobiles venues de la névroglie ont un noyau clair, dont la membrane est très mince; leur caryoplasme est parsemé de granulations très fines, noircies par l'argent réduit. Dans l'ensemble, ces noyaux nus en apparence, sont plus volumineux que ceux émanant du sang, ou peut-être aussi de l'adventice vasculaire. Quelle que soit leur provenance, tous ces éléments se déplacent en repoussant devant eux les fibres nerveuses moyennes ou fines, qu'ils alterent temporairement, jusqu'à ce qu'ils aient pu s'insinuer entre elles (A. WEBER [28]).

Dans les conditions où nos préparations on été obtenues, il est presque toujours impossible de reconnaître dans les cellules nerveuses qui attirent les phagocytes, des altérations capables d'être décelées par l'imprégnation argentique. Autant qu'on puisse le juger d'après les structures observées chez des Mammifères normaux, mais sans avoir pu trouver de point de comparaison avec l'écorce cérébrale d'un individu sain, les éléments vers lesquels se dirigent les cellules mobiles, ont une augmentation de volume de leur noyau, qui est parfois frappante *(Fig. 1)*. Il est bien certain d'autre part que, dans l'infime portion de la surface hémisphérique soumise à cette étude, il y a des différences fréquentes dans la teinte des filaments neurofibrillaires. Récemment, D. PICARD et G. COTTE [22] ont rapporté l'hyperchromophilie des cellules nerveuses à de légères lésions traumatiques, lors de l'exérese des fragments de tissu prélevés. Dans les biopsies de l'écorce cérébrale, il est sans aucun doute bien difficile d'éviter une légère contusion de la pièce; on ne peut donc pas tirer de conclusion de l'aspect plus ou moins argyrophile du neuroplasme. En somme, il faut bien reconnaître que, avec la technique employée, la cellule nerveuse sur le point d'être phagocytée semble le plus souvent parfaitement normale. Pour avoir la possibilité de pousser plus avant ces recherches, il serait nécessaire d'utiliser le microscope électronique, ou mieux encore, d'employer des réactions histochimiques.

C'est G. MARINESCO [18] qui a créé le mot de neuronophagie et qui le premier apporta dans la description de ce phénomène, une grande précision. Cependant il supposait que les éléments névrogliques, satellites des différents neurones corticaux entraient en action dès les débuts de la dégénérescence de ces derniers. Comme I. BERTRAND [6], nous avons observé l'arrivée des phagocytes gliaux sur le corps du neurone malade, mais il ne nous semble pas que la neuronophagie sur place soit réservée à la névroglie fibreuse qui formerait

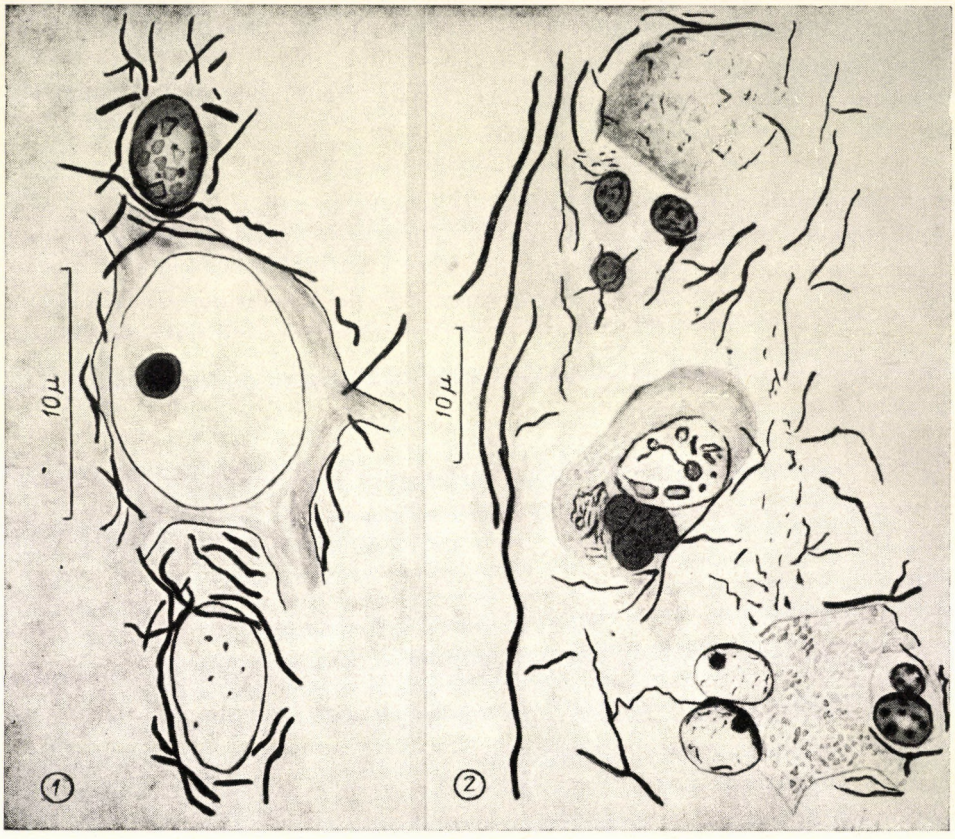


Fig. 1. Cellule pyramidale dont le noyau est très gonflé, attirant deux noyaux mobiles, nus en apparence; l'un d'origine sanguine et mésodermique est sombre; l'autre clair, est ectodermique et vient de la névroglie. Ces deux phagocytes repoussent devant eux et incurvent une fibre nerveuse. (Jeune fille de 17 ans, hébéphrénique)

Fig. 2. Écorce cérébrale d'un homme de 35 ans, schizophrène, n'ayant pas subi de chocs. Remarquable le grand nombre de phagocytose. On peut constater la prédominance de noyaux mobiles d'origine mésodermique. Deux seulement viennent de la névroglie. Ces neuronophages se groupent suivant leur nature; aucun d'eux ne montre des phénomènes de multiplication

dans l'écorce cérébrale humaine, autour des cellules nerveuses, une véritable capsule syncytiale, dont les éléments ont reçu de CAJAL [9] le nom de satellites. Par contre, les cellules gliales mobiles appartiendraient uniquement à la névroglie protoplasmique. Pour nous, ce sont les seules, qui avec les lymphocytes sanguins, interviennent dans le phénomène et se groupant autour du corps des neurones, à la suite d'un tropisme actuellement encore inexplicable, réalisent ainsi une satellitose purement pathologique.

Lors de l'arrivée des phagocytes sur le corps de la cellule nerveuse qu'ils vont détruire, il est frappant de constater que les deux sortes de ces éléments mobiles ne se mélangent pas *(Fig. 2)*. Certaines régions de nos coupes, comme

celle de la figure 3, ont même pu nous faire croire que les deux extrémités de la cellule pyramidale, celle du dendrite apical ou bien celle d'où se détache le neurite, attiraient spécialement les neuronophages mésodermiques et a l'opposé ceux de nature ectodermique. Une statistique portant sur un grand nombre de cas nous a montré qu'il n'en est rien; il semble que tous les éléments mobiles suivent dans le neurophile un trajet rectiligne et que les derniers arrivés se contentent des places laissées libres à la surface de leur victime. Il n'en est pas moins vrai que ces phagocytes se groupent d'après leur origine et que leurs amas souvent assez bien fournis ne peuvent s'expliquer par une multiplication due à des divisions directes ou indirectes, que nous n'avons jamais observées. Il est également intéressant de signaler que la figure 2 concerne un homme de 35 ans atteint de schizophrénie, qui n'a jamais subi de chocs thérapeutiques; dans son écorce cérébrale, ce sont les phagocytes d'origine sanguine, qui prédominent. Sur le corps du neurone de gauche, il y a deux phagocytes névrogliques, qui sont séparés des mésodermiques par toute l'épaisseur de l'élément nerveux.

En dehors des cas de processus toxiques ou infectieux très rapides, la neuronophagie est très différente du phénomène de la phagocytose si bien étudie par E. METCHNIKOFF [19]. Qu'ils soient d'origine ectodermique, ou mésodermique, les éléments mobiles n'entourent pas pour les absorber des débris détachés de neurones, mais ils s'appliquent étroitement sur leur corps ou sur la base des gros dendrites. Par une véritable digestion en surface, qualifiée de lyocytose par J. ANGLAS [1], ou de résorption par R. HERRLINGER [15], peu à peu, ils font disparaître la cellule qu'ils attaquent. Sans doute, il se passe à ce niveau des phénomènes de transport de substances, que le microscope électronique a permis d'analyser et qui sont connus sous le nom de pinocytose de W. H. LEWIS [17] ou de rophéocytose, décrite récemment par A. POLICARD et M. BESSIS [23]. Ce qui caractérise tout d'abord l'aspect de la cellule digérée, c'est la disparition de ses filaments neurofibrillaires; son neuroplasme devient tout à fait clair et ne montre plus aucune trace des quelques granules argyrophiles qu'il pouvait contenir. Dans certains cas, il reste ça et là, à la périphérie de la cellule nerveuse détruite quelques fragments de son protoplasme non digéré. Ce fait est particulièrement net sur la figure 3, où ces débris, renfermant de petites masses argyrophiles, dessinent une partie du pourtour d'un élément pyramidal et de son dendrite apical. Ces portions non absorbées forment souvent des amas granuleux, qui manifestent tous les symptomes d'une autolyse. Tandis que disparaît ainsi le protoplasme de l'élément en train d'être digéré, très rarement, il est possible de voir se constituer une couche cytoplasmique autour du noyau, nu en apparence, de phagocytes actodermiques *(Fig. 4)*. Nous n'avons jamais rien observé de semblable sur des noyaux de phagocytes d'origine sanguine. Il faut en outre remarquer que le protoplasme apparu sur ces éléments névrogliques est légère-

ment argyrophile et se trouve teinté plus ou moins régulièrement en gris. Malgré l'emploi des meilleures combinaisons optiques du microscope à lumière, nous n'y avons jamais remarqué de structure correspondant à la

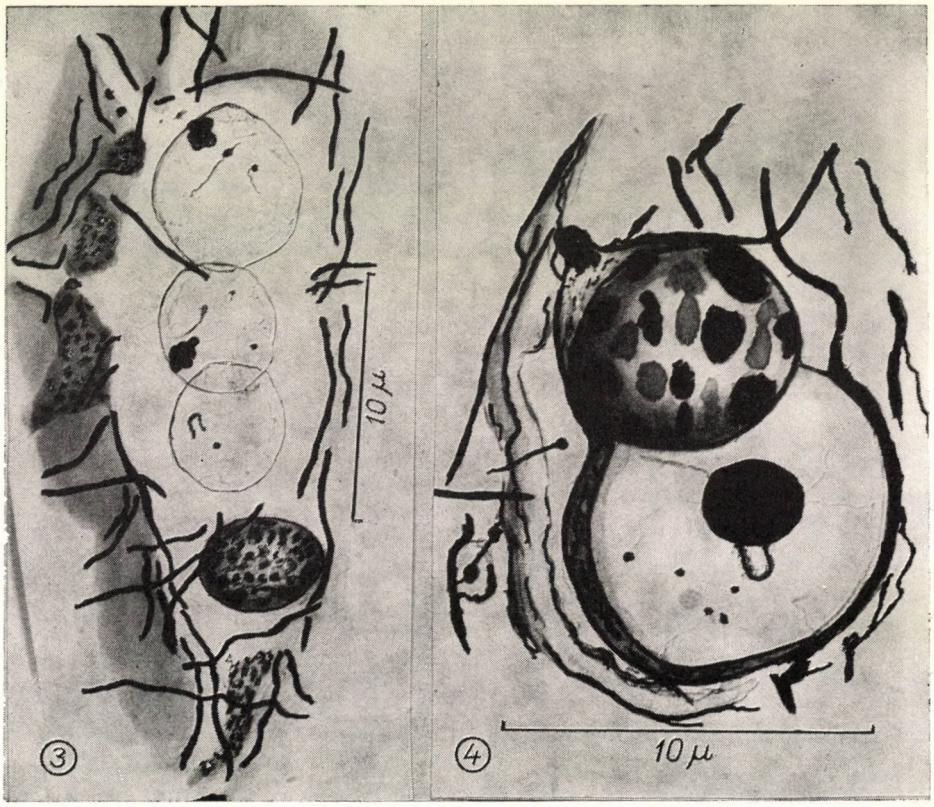


Fig. 3. Emplacement d'une cellule pyramidale détruite par neuronophagie, dont on reconnait les contours et dont il reste des débris granuleux sur un des cotés et à l'origine du dendrite apical. Le phagocyte mésodermique commence à perdre l'argyrophilie de son noyau; les trois ectodermiques ont des nucléoles vésiculeux, ou bien un cristalloide (Hébéphrénie)

Fig. 4. Le noyau de la cellule nerveuse en voie de destruction, ne renferme plus que quelques granules ou petits bâtonnets argyrophiles, dont certains, situés dans l'appareil de Hydén, indiquent la situation qu'occupait le nucléole vésiculaire, reconstitué, ainsi que l'appareil nucléolaire, dans le phagocyte gliau, dont le protoplasme légère-argyrophile est bien visible (Hébéphrénie)

formation de neurofibrilles. Le microscope électronique a montré d'une manière indiscutable que ces dernières ne sont que des artéfacts, dus probablement à la fixation; il n'en est pas moins vrai que par l'utilisation des méthodes d'imprégnation argentique, qui mettent en évidence les corps cellulaire du neurone et jusqu'aux plus fins de ses prolongements, les aspects rencontrés autour du noyau correspondent à des structures filamenteuses, dichroiques en lumière

polarisée. Bien que fausse, c'est tout de même la signature de la nature nerveuse de l'élément en question. Durant la différenciation des neuroblastes, A. WEBER [30], CH. A. BAUD et E. D. ABOULAFIA [4] ont décrit l'apparition des neurofibrilles; elles proviennent de grains alignés et qui sont déjà dichroiques dans le sens longitudinal, suivant lequel ils se souderont en une fibrille. Nous n'avons rien aperçu de semblable dans ce protoplasme, malgré sa légère argyrophilie; nous reviendrons sur cette question dans nos conclusions.

Nous devons examiner maintenant ce qui se passe dans les noyaux des éléments phagocytaires et dans ceux des cellules nerveuses qui subissent cette digestion. A ce point de vue, en outre des observations que nous avons faites sur le fragment d'écorce cérébrale d'un schizophrène de 35 ans, n'ayant jamais subi de chocs thérapeutiques, nous avons eu l'occasion d'étudier les résultats de biopsies pratiquées sur chacun des hémisphères d'une jeune fille de 17 ans, présentant des symptomes d'hébéphrénie et soignée trois mois auparavant par de nombreux chocs.

Alors que le protoplasme de l'élément nerveux attaqué par les phagocytes, a presque totalement disparu sous les enzymes de ses agresseurs, il arrive que leurs noyaux, nus en apparence, viennent s'appliquer étroitement sur celui du neurone. L'absorption du caryoplasme de ce dernier, ne paraît pas suivie immédiatement d'une chute de sa turgescence; en d'autres termes, lorsque les noyaux hument la substance de celui qu'ils détruisent, il n'y a aucun pli de sa membrane; il est bien difficile de mesurer à quel point son volume diminue avant que ses limites ne deviennent indistinctes. Comme nous l'avons dit précédemment, la technique que nous avons employée, met exclusivement en évidence dans les noyaux imprégnés à l'argent, la membrane, le nucléole, avec son satellite de chromatine sexuelle s'il s'agit du cerveau d'un individu de sexe féminin, l'appareil nucléolaire de HYDÉN, parfois des cristalloides et enfin de minuscules nucléoles accessoires sous la forme de très petites sphérules argyrophiles. Dans la plupart des noyaux phagocytés, ce qui disparaît en premier lieu, c'est le nucléole, tandis que persistent le plus longtemps les corpuscules nucléolaires accessoires et la membrane nucléaire. Il ne semble pas que l'absorption des éléments constitutifs du nucléole, ou prédomine l'acide ribonucléique, détermine un déplacement de cette petite sphère fortement argyrophile. Ce n'est que assez rarement et comme par hasard, que le nucléole en voie de disparition, est appliqué contre la membrane nucléaire, dans la zone où cette dernière est en contact étroit avec celle du neuronophage *(Fig. 5)*. Le phénomène doit être assez rapide, car il est très rare de pouvoir en observer toutes les phases, lorsqu'il s'agit d'un nucléole d'apparence homogène. Tout se passe comme si l'ensemble de ce centre important de synthèses protéiniques perdait tout d'abord son argyrophilie et, devenu transparent, laissait apparaître quelques sphérules ou de minces et courts bâtonnets analogues à des cristalloides. Ces détails de structure nucléolaire

restent quelquefois à la même place dans le caryoplasme, ou bien s'y disséminent, comme on peut le constater sur les figures 4 et 6.

Dès le début de l'attaque du corps du neurone, alors que son noyau paraît encore intact, avec son volumineux nucléole, les éléments mobiles mésodermiques, qui viennent de faire disparaître la plus grande partie du protoplasme de la cellule nerveuse, montrent une augmentation du volume de leur sphère nucléaire et en même temps l'agrandissement des petites masses que l'argent réduit y colore *(Fig. 7)*. J. Botar [8] a constaté un phénomène

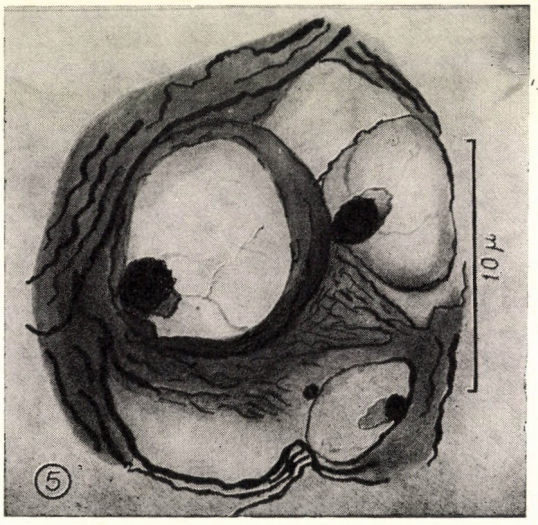


Fig. 5. Noyau allongé d'un phagocyte ectodermique accolé à celui du neurone qu'il digère. Le nucleole de ce dernier semble pénétrer directement dans le neuronophage en poussant devant lui une petite bande grise, qui paraît correspondre à la chromatine sexuelle, terminée par un globule, argyrophile (Hébéphrénie)

comparable dans la médullo susrénale du Chien, ou les noyaux des cellules de Schwann présentent l'accroissement de leur argyrophilie lors de la désintégration d'un réseau nerveux. Lorsque la neuronophagie sera terminée, cette surcharge de substance argyrophile sera éliminée du caryoplasme et le noyau d'origine sanguine retrouvera son aspect primitif et ne sera plus qu'un élément nouveau de la mésoglie (A. Weber [31]).

En somme, le noyau des phagocytes sanguins ne présente pas d'autre modification qu'une augmentation de volume et de son contenu en substance argyrophile, répartie dans un grand nombre de petits nucléoles. Il n'en est pas de même pour les neuronophages de provenance névroglique et de nature ectodermique. Indiquons tout de suite que ces derniers vont copier, fréquemment avec une véritable précision de détails, la structure du noyau qu'ils sont en train de détruire, par absorption de sa substance.

Dans l'écorce cérébrale des deux déments que nous avons eu l'occasion d'étudier, les variations d'aspect des noyaux appartenant à des cellules nerveuses, sont dues presque uniquement à celle des nucléoles. La présence de cristalloides nucléaires n'est pas constante; celle des corpuscules nucléolaires, dont une statistique portant sur plusieurs milliers de noyaux, indique que ces sphérules sont plus abondantes dans le sexe féminin, ne sera pas envisagée dans notre travail.

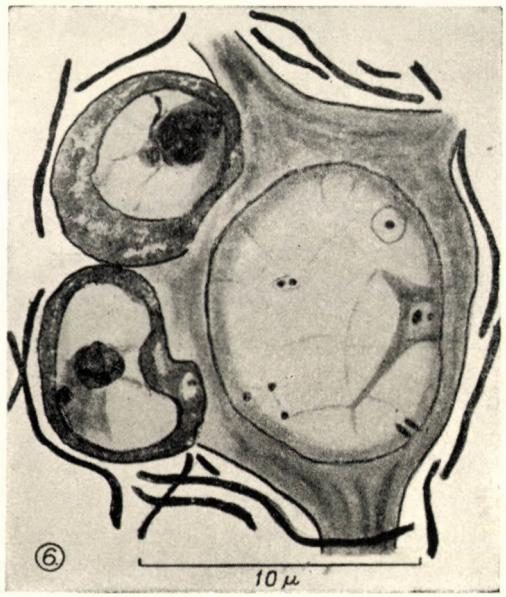


Fig. 6. Vésicules nucléolaires ou petits bâtonnets argyrophiles se reconstituant dans des neurophages ectodermiques (Hébéphrénie)

Les observations de A. WEBER [29] sur la structure des nucléoles dans les neurones des Mammifères, n'ont fait que confirmer les descriptions déjà anciennes données par CAJAL [10]. Dans les cellules nerveuses humaines, ces organes du noyau sont essentiellement constitués par de petites sphérules à contenu clair et dont la paroi est fortement argyrophile. D'après T. CASPERSSON [11], ces vésicules renfermeraient des acides aminés; A. FALLER [13] n'y a trouvé que rarement des polysaccharides et jamais de réaction nucléale. Elles sont réunies entre elles par une substance que l'imprégnation argentique garde transparente et teintée en gris, laissant ainsi visibles les différentes vésicules; ou bien, cette sorte de ciment est coloré par l'argent réduit en noir opaque, si bien que le nucléole paraît homogène, malgré sa surface irrégulière, comme celle d'une mûre. On peut admettre que le gonflement des sphérules nucléolaires et leur allongement, alors qu'elles se recourbent légèrement

à la manière d'une très petite banane, correspondent vraisemblablement à une manifestation de leur activité élaboratrice.

Lorsque les phagocytes névrogliques se sont attaqués à la cellule nerveuse, d'origine ectodermique comme eux, la progression de la digestion de son noyau se révèle par la disparition graduelle du nucléole et par sa reconstitution dans le caryoplasme du neuronophage. On assista alors à des aspects

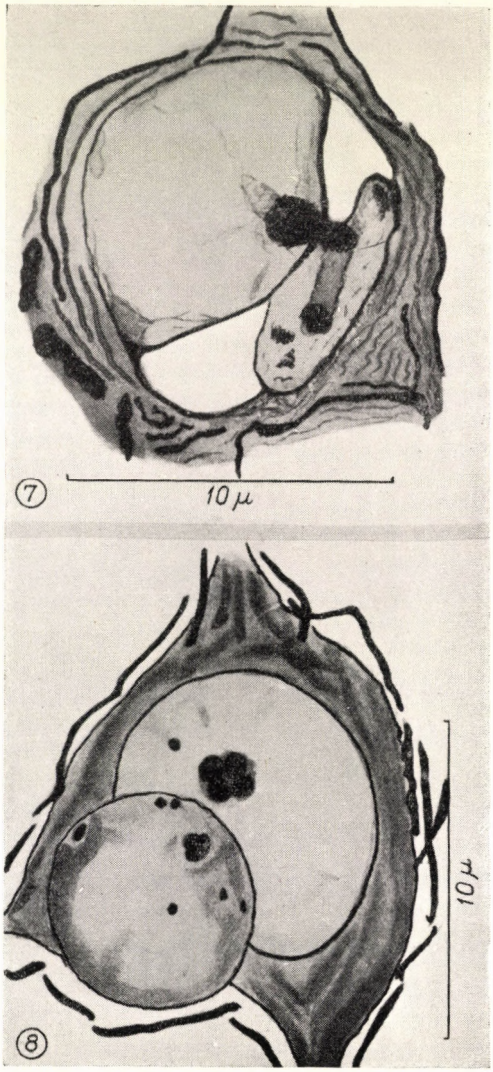


Fig. 7. Élément phagocytaire de nature sanguine attaquant une cellule nerveuse, dont le nucléole montre son satellite de chromatine sexuelle (Hébéphrénie)

Fig. 8. Le nucléole vésiculaire d'un neurone qui subit la neuronophagie, commence à réapparaître dans le noyau du phagocyte d'origine névroglique (Hébéphrénie).

successifs, qui peuvent jeter une certaine lumière sur les origines du volumineux nucléole du neurone, grâce à la lenteur probable du déroulement de ces phénomènes.

Si le neurone digéré possédait dans son noyau un nucléole fortement argyrophile et d'apparence homogène, on en voit croître un d'aspect identique dans chacun des phagocytes ectodermiques et dont les dimensions, en rapport

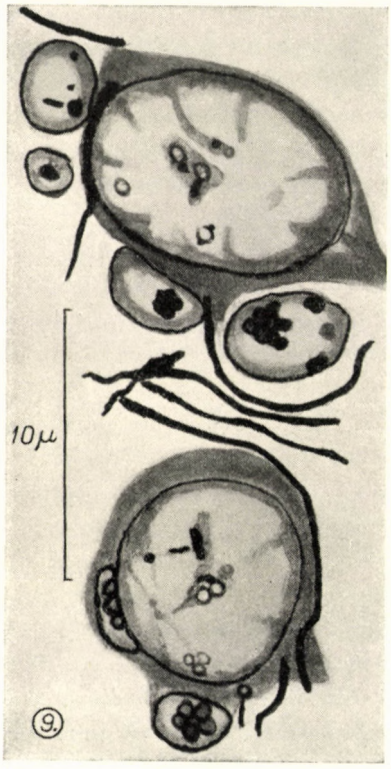


Fig. 9. Phagocytes ectodermiques reconstituant dans leurs noyaux le nucléole vésiculaire qu'ils digèrent, mais en possédant aussi un autre de structure homogène (Hébéphrénie)

avec le nombre de ces derniers, ne sont qu'une fraction du volume de celui qui disparaît; c'est ce que l'on constate, par exemple sur la figure 10.

Dans les fragments d'écorce cérébrale que nous avons eu l'occasion d'étudier, on rencontre des zones de peu d'étendue, dans lesquelles la structure du nucléole correspond tout à fait à la description donnée par Cajal, c'est-à-dire un amas de sphérules, sans qu'on trouve en ces mêmes endroits un seul nucléole d'aspect homogène. Il est possible d'assister parfois à la reconstitution progressive d'un semblable amas vésiculaire, dans le noyau d'un neuronophage; tandis que le nombre des vésicules nucléolaires diminue dans le neurone

attaqué, il apparaît dans le caryoplasme de ses agresseurs de nature névroglique, un petit tas de grains minuscules très argyrophiles, qui, peu à peu, se gonflent et se transforment en vésicules. Il n'est pas possible de dire si les granules qui sont à l'origine de cette transformation, font partie de ceux disséminés dans le noyau des cellules mobiles gliales *(Fig. 8)*; la chose est cependant vraisemblable. Tandis que la digestion se poursuit, le noyau du neurone qui va disparaître, est encore bien délimité par sa membrane et assez turgescent pour rester sphérique, mais il ne renferme plus que des parcelles de substance argyrophile, sous forme de grains ou de petits bâtonnets *(Fig. 6)*. Chose curieuse, il se reconstitue parfois dans le neuronophage névroglique, deux nucléoles, l'un formé de vésicules et l'autre homogène *(Fig. 9)*. Il arrive aussi quelquefois que le corps de la cellule nerveuse détruite renferme un cristalloide, ce dernier peut se reconstituer dans le noyau d'un phagocyte glial qui n'a pas de nucléole *(Fig. 3)*.

La reconstitution, dans le noyau des phagocytes gliaux, d'un nucléole identique à celui dont ils ont absorbé la substance, le plus souvent à distance, ne représente pas la seule structure nucléaire dont ils se sont parés; il faut y ajouter l'appareil nucléolaire de Hydén et le satellite nucléolaire, formé de chromatine sexuelle.

L'appareil de Hydén, dont nous avons parlé précédemment, qui aboutit à la membrane nucléaire, ou il amène au neuroplasme les produits de synthèse élaborés dans le nucléole, persiste plus longtemps que ce dernier, dans le noyau du neurone phagocyté. Il apparaît avec une teinte grise, due à une légère argyrophilie. Tandis que cette formation n'est pas encore disparue et renferme encore quelques débris du nucléole, il est déjà bien visible dans le caryoplasme des éléments phagocytaires névrogliques, acharnés au détruire *(Fig. 4)*. Ainsi le nucléole de ces neuronophages s'est mis aussitôt au travail. C'est ce qui explique, sans doute, que leurs noyaux n'aient pas conservé l'apparence d'être nus, mais soient entourés par une couche de protoplasme, faiblement argyrophile, elle aussi. Lorsque le hasard a voulu que l'orientation des coupes soit favorable, le satellite nucléolaire est nettement visible dans les éléments nerveux de l'écorce cérébrale provenant de la jeune hébéphrénique de 17 ans. Cette forme de la chromatine sexuelle n'est pas distincte dans les noyaux névrogliques, colorés par la méthode d'imprégnation argentique de A. Weber, tandis que I. Bertrand et C. Girard [7], l'ont mise en évidence dans la macroglie, en employant les colorations de Fr. Nissl ou de R. Feulgen. Alors que le petit amas, à peine teinté par l'argent, mais bien délimité par une fine membrane, est bien perceptible au contact d'un nucléole homogène, dans un neurone phagocyté, il arrive qu'on le remarque, avec des dimensions presque identiques, accolé au nucléole également homogène des neuronophages ectodermiques *(Fig. 10)*. Nous n'avons pu distinguer la chromatine sexuelle au contact des nucléoles vésiculeux, ou bien appliquée contre

la membrane nucléaire. Sur la figure 7, un phagocyte d'origine mésodermique s'attaque à une cellule nerveuse, où le satellite nucléolaire est particulièrement visible; rien dans le noyau venu du sang ne peut être considéré parmi les petites masses argyrophiles qui le remplissent, comme reproduisant l'image de la chromatine sexuelle.

On remarquera dans la figure 5, que le nucléole homogène de la cellule nerveuse semble, après avoir franchi deux membranes, pénétrer directement dans le noyau du phagocyte glial; il y est prolongé par une petite bande grise,

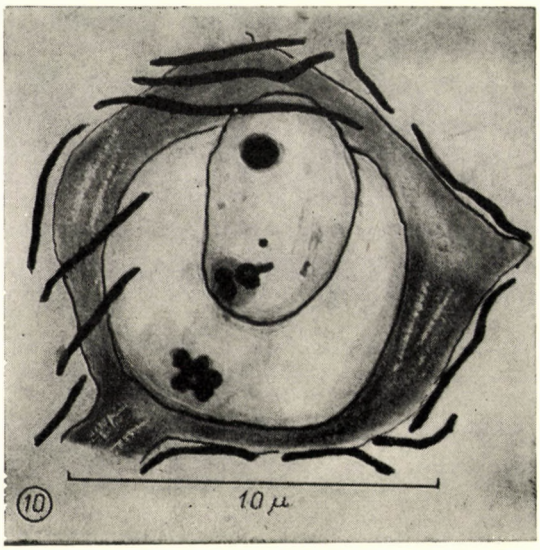


Fig. 10. Satellite nucléolaire encore visible dans le noyau du neurone phagocyté et déjà reconstitué dans ceux des neuronophages (Hébéphrénie)

qui se termine au niveau d'une minuscule sphère homogène et fortement argyrophile. On dirait que la chromatine sexuelle s'est glissée entre deux parties inégales du nucléole nerveux. C'est le seul exemple que nous ayons trouvé, sur plusieurs centaines de cellules nerveuses phagocytées, d'une cession immédiate d'un nucléole à l'agresseur.

Conclusions

N'ayant étudié la question de la neuronophagie sur des fragments d'écorce cérébrale ne provenant que de deux déments, dont seule, la jeune fille a subi les atteintes de chocs thérapeutiques, il est douteux d'attribuer la diminution des phagocytoses, apparaissant plus ou moins chez cette hébéphrénique, sous l'effet du choc. Il eut été nécessaire d'examiner chacune des coupes

sériées de ces fragments et d'en tirer une statistique basée sur un comptage effectué dans chaque champ microscopique, ce que nous n'avons pu faire.

Nous avons insisté sur les aspects différents des noyaux mobiles, nus en apparence, suivant qu'ils sont d'origine sanguine ou proviennent de la névroglie. Dès le début de leur action digestive sur le neurone, ceux qui sont de nature mésodermique, se chargent dans leur caryoplasme, de petites masses argyrophiles, qu'ils ne conservent pas longtemps après la disparition de la cellule nerveuse, ils émigrent alors dans la mésoglie.

Un fait vraiment digne d'attention, est le comportement des noyaux venus de la névroglie et par conséquent ectodermiques; dans la mesure ou la technique employée permet de l'affirmer, ils vont, durant la neuronophagie, copier avec précision la structure nucléaire des neurones qu'ils détruisent. On l'a vu précédemment en ce qui concerne le nucléole, l'appareil nucléolaire de Hydén et la chromatine sexuelle. Ces noyaux qui paraissaient nus, vont s'entourer, maintenant qu'ils ont un nucléole actif, d'une couche visible de cytoplasme légèrement argyrophile; la question qui se pose tout de suite est la suivante: n'est ce pas un neuroplasme?

S'il nous avait été permis d'examiner un plus grand nombre de coupes, il n'est pas impossible que nous ayons vu se former dans cette couche protoplasmique, des neurofibrilles et des prolongements, à sa périphérie. Dans ces dernières années, un certain nombre d'auteurs ont publié des observations, qui indiquent la possibilité chez les Mammifères adultes de la formation de nouveaux neurones, soit dans les centres (A.Weber[32]), ou dans le système périphérique (D. Picard et G. Chambost [21]); R. Coujard et M. Maillet [12], aux dépens d'éléments d'aspect névroglique, qui correspondent peut-être à la persistance de neuroblastes. En est-il de même après certains cas de neuronophagie? Le fait est douteux. Le plus souvent, lorsque la cellule nerveuse a totalement, ou presque complétement disparu, les noyaux des phagocytes d'origine gliale, comme ceux venus du sang, reviennent à leur aspect primitif, en éliminant leur surcharge de substance argyrophile (A. Weber [33]). On trouve ainsi, à la place occupée par le corps d'un neurone détruit, de petits amas globulaires de noyaux névrogliques clairs, associés parfois à un ou deux noyaux mésogliques, qui les uns ou les autres ne rappellent en rien leurs transformations, durant la digestion de la cellule nerveuse.

Résumé

Dans l'écorce cérébrale humaine, lors de maladies mentales, certains corps de cellules nerveuses sans altération visible, sont détruits par des éléments mobiles d'origine sanguine ou névroglique, semblables à des noyaux nus dont l'aspect permet facilement de les classer suivant leur provenance mésodermique ou ectodermique.

Pendant la neuronophagie, durant laquelle le corps du neurone est digéré, les noyaux des phagocytes mésodermiques, venus du sang, se chargent de petites masses argyrophiles; ceux de nature ectodermique, provenant de la névroglie, copient exactement celui qu'ils font disparaître, aussi bien en ce qui concerne le nucléole, que le satellite de chromatine sexuelle, ou encore l'appareil nucléolaire de HYDÉN. Lorsqu'on constate l'existence de ce dernier, il est fréquent de voir apparaître autour du noyau du phagocyte une couche de protoplasme légèrement argyrophile, mais il ne s'y trouve aucune trace des caractéristiques d'un neuroplasme. Le neuronophage ectodermique prend donc l'aspect d'un neuroblaste, dans lequel la différenciation s'arrête à la structure du noyau.

BIBLIOGRAPHIE

1. ANGLAS, J.: (1900) C. R. Soc. Biol. *52*, 219. — 2. BARR, M. L.—BERTRAM, E. G.: (1949) Nature, *163*, 676. — 3. BAUD, CH. A.: (1947) Acta Anat. *4*, 49. — 4. BAUD, CH. A.—ABOULAFIA, E. D.: (1950) C. R. Acad. Sci. *231*, 1259. — 5. BAUD, CH. A.—PERRENOUX, E.: (1951) C. R. Acad. Sci. *232*, 1597. — 6. BERTRAND, I.: (1923) Les processus de désintegration nerveuse. Masson, Paris. — 7. BERTRAND, I.—GIRARD, C.: (1956) Bull. Acad. nat. de Méd. *140*, 304. — 8. BOTAR, J.: (1957) C. R. Ass. Anat. *44*, 193. — 9. CAJAL, S. R. Y: (1897) Rev. trimestr. microgr. *1*, 1. — 10. CAJAL, S. R. Y: (1903) Trab. Labor. Invest. biol. Univ. Madrid. *2*, 129. — 11. CASPERSSON, T.: (1947) Sympos. Soc. exper. Biol. *1*, 127. — 12. COUJARD, R.—MAILLET, M.: (1957) C. R. Ass. Morphol. exper. *42*, 85. — 13. FALLER, A.: (1944) Z. Zellforschg. *33*, 289. — 14. FIRKET, J.: (1943) Notions d'Anat. path. humaine. Masson, Paris. — 15. HERRLINGER, R.: (1956) Erg. Anat. Entw. *35*, 334. — 16. HYDÉN, H.: (1943) Z. mikr. anat. Forschg. *54*, 96. — 17. LEWIS, W. H.: (1931) Bull. Hopkins Hosp. *49*, 17. — 18. MARINESCO, G.: (1909) La cellule nerveuse. G. Doin, Paris. — 19. METCHNIKOFF, E.: (1883) Arch. zool. Inst. Univ. Wien, Zool. Stat. Triest. *5*, 2. — 20. PAPEZ, J. W.: (1944) Arch. Neurol. Psych. *52*, 217. — 21. PICARD, D.—CHAMBOST, G.: (1953) Arch. d'Anat. micr. Morph. exper. *42*, 85. — 22. PICARD, D.—COTTE, G.: (1957) C. R. Soc. Biol. *151*, 151. — 23. POLICARD, A.—BESSIS, M.: (1958) C. R. Acad. Sci. *246*, 3194. — 24. ROBERTIS, E.—FRANCHI, C. M.: (1953) J. exp. Med. *98*, 269. — 25. WEBER, A.: (1955) Rev. neurol. *93*, 817. — 26. WEBER, A.: (1948) C. R. Soc. Biol. *142*, 791. — 27. WEBER, A.: (1943) C. R. Soc. Biol. *137*, 422. — 28. WEBER, A.: (1958) C. R. Soc. Biol. *152*. — 29. WEBER, A.: (1955) Acta neuroveget. *13*, 5. — 30. WEBER, A.: (1946) Arch. d'Anat. micr. Morph. exp. *24*, 49. — 31. WEBER, A.: (1956) C. R. Soc. Biol. *150*, 493. — 32. WEBER, A.: (1958) C. R. Soc. Biol. *152*, 891. — 33. WEBER, A.: (1957) Schweiz. Arch. Neurol. Psych. *79*, 165.

ИЗМЕНЕНИЯ ЯДЕРНОЙ СТРУКТУРЫ ПОДВИЖНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА В ХОДЕ ЯВЛЕНИЙ НЕВРОНОФАГИИ У ДУШЕВНОБОЛЬНЫХ

М. ХАРАНГИ

Автором был исследован предоставленный профессором Вебер биоптический материал головного мозга, происходящий из Манхаттанской государственной больницы. Фиксированный специальным методом профессора Вебера материал был исследован по его же методу, при помощи которого имеется возможность для изучения чрезвычайно тонких цитологических изменений. После изложения техники метода исследования профессора Вебера обсуждаются результаты, которые можно резюмировать в нижеследующем. Наблюдения автора подкрепили то мнение, что в фагоцитозе ганглиозных клеток активное участие принимают также клетки олигодендроглии. Описанное Вебером преобразование клеточных ядрышек олигодендроглии также удалось наблюдать. Сравнительные исследования показали, что у больных шизофренией, леченных шоком, невронофагия значительно меньше, чем у них, не получивших шокового лечения.

KERNSTRUKTUR-VERÄNDERUNGEN BEWEGLICHER ELEMENTE DER MENSCHLICHEN GEHIRNRINDE IM LAUFE DER NEURONOPHAGIE BEI GEISTESKRANKEN

M. HARANGHY

Aus dem Manhattan State Hospital stammendes (von Professor Weber überlassenes) bioptisches Gehirnmaterial wurde untersucht. Das Material wurde mit der Weberschen Methode fixiert und behandelt; so wurde die Beobachtung ausserordentlich feiner zytologischer Veränderungen ermöglicht. Nach der Beschreibung der Weberschen Technik werden die Resultate bekanntgegeben. Die Beobachtungen bestätigen die Meinung, wonach bei der Ganglienzellenphagocytose die Oligodendrogliazellen aktiv beteiligt sind. Die von Weber beschriebene Umwandlung der Nukleolen der Oligodendrogliazellen konnte ebenfalls verfolgt werden. Vergleichende Untersuchungen ergaben, dass die Neuronophagie bei schockbehandelten Schizophrenikern bedeutend geringer ist, als bei solchen die keiner Schockbehandung unterworfen waren.

Dr. Márta HARANGHY Budapest, IX., Üllői út 93. Hongrie.

Department of Pathological Anatomy of the University Medical School, Debrecen
(Director: Prof. P. ENDES)

HEPATIC LESIONS IN SECONDARY SHOCK AND ACUTE CARDIAC FAILURE

A. HARASZTI and P. ENDES

(Received August 19, 1959)

The literature contains numerous clinico-pathological and experimental data concerning functional and morphological changes induced in the kidney during secondary shock. The particular attention paid to renal changes of this kind is not surprising if we consider that damages of the kidney during secondary shock — designated by special terms, *e. g.* lower nephron nephrosis, crush syndrome, post-traumatic or post-operative anuria, shock kidney, etc. — frequently lead to death. Hepatic damage of a similar nature has far less been investigated. It was in the first place by German pathologists that hepatic lesions of aviators who had died of high altitude death, "akuter Höhentod", were studied during World War II these workers succeeded in reproducing these lesions in animals by exposing them to low atmospheric pressure and oxygen deficiency. As regards human patients, there are comparatively few pathological and still fewer clinical data concerning hepatic lesions due to similar causes.

Material and methods

Between 1956 and 1959, we studied the liver of all autopsied cases in which death had been preceded by symptoms of a longer or shorter shock, such as sharp diminution of blood pressure, impalpable pulse or — not infrequently — transitory or lasting loss of consciousness. In 32 cases were liver lesions encountered which are usually held characteristic. In 23 cases we examined also the kidneys. The specimens excised were fixed in formol, embedded in paraffin and stained with hematoxylin-eosin, Endes'thrichrome (12a) dye or — after freezing — with hemalum-Sudan III.

Summary review of the records

No. 1 (11) 1956. S. M., male, 62 years of age. Admitted with diarrhoea, bloody discharge. Gradual dehydration for 2 days, then death. Autopsy revealed grave acute and diffuse ulcerative enterocolitis.

No. 2 (20) 56. T. M., male, 56 years of age. Admitted with chronic cardiac decompensation and symptoms of acute intestinal obstruction. Intestinal suction and hemodialysis were instituted. Autopsy revealed scarring of the aortic valves with consecutive insuffiency, dysenteric enterocolitis, incipient diffusion peritonitis.

No. 3 (579) 56. B. F., female, 61 years of age. Clinical diagnosis: pancreatitis and intestinal obstruction. Death after 2 days. Autopsy: thrombosis of the descending branch of the left coronary artery with consecutive myocardial infarction.

No. 4 (16) 57. M. G., male, 38 years of age. Acute cardiac decompensation; death after 24 hours' unconsciousness. Autopsy revealed acute pancreatic necrosis, grave myocardial degeneration, acute dilatation of right ventricle.

No. 5 (22) 57. I. P., female, 59 years of age. Clinical diagnosis: myocardial infarction. Death after 3 days. Autopsy: thrombosis of the descending branch of the left coronary artery with myocardial infarction.

No. 6 (56) 57. J. H., male, 3 years of age. Death after a few weeks of measles bronchopneumonia. Autopsy, mostly organizing bronchopneumonia extending to all lobes; subacute cor pulmonale.

No. 7 (62) 57. A. L., female, 72 years of age. Palliative gastrostomy on account of inoperable gastric carcinoma. Autopsy, ulcerated cancer of the stomach with metastases; suppurative aspiration bronchopneumonia.

No. 8 (137) 57. P. B., male, 41 years of age. Died with symptoms of uremia after anuria of 11 days' duration following extensive contusions. Autopsy, contusion of both thighs and the gluteal region; confluent bronchopneumonia; the kidneys showed on both gross and microscopic examination grave myoglobinuric nephrosis.

No. 9 (411) 57. I. S., male, 53 years of age. Admitted with transverse myelitis, paralyzed lower limbs and cystitis; repeated collapses with hypotension. Autopsy, myelomalacia; immediate cause of death: embolism of pulmonary artery.

No. 10 (412) 57. J. K., female, 38 years of age. Had been suffering from disseminated lupus erythematosus for 4 years. Pathological picture dominated by renal lesion during the last 2 years. Hypertension. Sharp hypotension preceding death. Autopsy, disseminated arteriolar necrosis in the intestines, kidneys and the cerebellum, characteristic symptoms of malignant hypertension accompanied by inflammatory phenomena.

No. 11 (490) 57. M. S., male, 68 years of age. Admitted with acute abdomen failure due to gastric perforation. Aggravation of shock after explorative laparotomy, death on the next day. Autopsy, acute pancreatic necrosis with circumscribed peritonitis.

No. 12 (M. 220) 57. A. K., male, 57 years of age. Had had hepatitis three years ago. Admitted with hematemesis. Explorative laparotomy followed by gradual diminution of blood pressure for two days, then death. Autopsy, postnecrotic cirrhosis with gross nodules; fatal hemorrhage following rupture of oesophageal varix.

No. 13 (M. 24) 58. I. Sz., male, 57 years of age. Died with symptoms of grave cardiac decompensation. Autopsy, bronchiectasis, cor pulmonale, myocardial degeneration, pulmonary sclerosis.

No. 14 (37) 58. A. M., female, 13 years of age. Had been operated on five months before for ovarian tumour. Admitted with intestinal obstruction. Death after 5 hours' unconsciousness. Autopsy, intestinal obstruction caused by recurrent malignant teratoma.

No. 15 (66) 58. I. K., male, 45 years of age. Explorative laparotomy because of suspected gastric perforation, followed by marked hypotension. Death 2 days later with symptoms of shock. Autopsy, ichorous pleurisy and mediastinitis caused by perforated peptic ulcer in the lower portion of the oesophagus.

No. 16 (96) 58. L. F., male, 62 years of age. Laminectomy on account of transversal lesion of the spinal cord; removal of tumour. Died 3 days later of circulatory failure. Autopsy, multiple myeloma, foci in the vertebrae and many other bones.

No. 17 (114) 58. S. V., male, 47 years of age. Clinical diagnosis, circulatory failure and pulmonary fibrosis. Autopsy, organizing fibrinous endocarditis on the mitral and tricuspidal valves. Organizing emboli in many small branches of the pulmonary artery, probably originating from the tricuspid valve.

No. 18 (M. 194) 58. A. K., female, 42 years of age. Choledochoduodenostomy and removal of gallstones three days before death. Autopsy, diffuse fibrinous-suppurative bilious peritonitis due to sutural insuffiency.

No. 19 (207) 58. J. K., male, 29 years of age. Angina pains during the last month; death with symptoms of myocardial infarction. Autopsy, obturating thrombus in the descending branch of the left coronary artery with consecutive myocardial infarction.

No. 20 (230) 58. A. H., male, 61 years of age. Thoracolaparotomy on account of tumour of the cardia. Death after 3 days of shock. Autopsy, gastric carcinoma on the base of of chronic peptic ulcer; diffuse peritonitis; intestinal paralysis.

No. 21 (234) 58. S. F., male, 74 years of age. Resection of coecum and partial resection of colon for coecal carcinoma; death after two days. Autopsy, confluent bronchopneumonia; diffuse ichorous peritonitis consequential upon sutural insufficiency.

No. 22 (271) 58. M. F., male, 46 years of age. Resection of stomach and gastroenteroanastomosis for gastric ulcer. Collapse after a hot bath on the 8th day, drop of blood pressure

to 60/0; the next day death, apparently due to central and peripheral circulatory failure. Autopsy, grave myocardial degeneration; incipient acute intestinal paralysis.

No. 23 (392) 58. G. M., male, 19 years of age. Acute leukemia. Treatment with Degranol followed by sharp drop in leucocyte count; bronchopneumonia and death. Autopsy, extensive bronchopneumonia; leukemic infiltrations in the internal organs.

No. 24 (400) 58. K. D., male, 74 years of age. Operation for perforated duodenal ulcer followed after 3 days by death with cardiac decompensation. Autopsy, fibrinous inflammation in the small intestines, slight purulent peritonitis, degenerated myocardium.

No. 25 (16) 59. I. Sz., male, 68 years of age. Resection of large intestine because of sigmoid tumour, followed by emesis, peritonitis, cardiac failure, then death. Autopsy, diffuse peritonitis due to sutural insufficiency; aspiration bronchopneumonia.

No. 26 (15) 59. J. H., male, 20 years of age. Rheumatic fever during the last two years; precordial pains during the last two days; death after hypotension during the last day. Autopsy, partly cicatrizing and partly acute rheumatic endocarditis of the aortic and bicuspid valves; adhesive pericarditis.

No. 27 (42) 59. G. T., female, 22 years of age. High fever during the last week, pneumonia; tracheotomy on account of asphyxia. Death with symptoms of shock. Autopsy, partly interstitial, disseminated pneumonia of unknown origin; acute dilatation of right ventricle.

No. 28 (31) 59. E. B., female, 8 years of age. Influenza, high temperature, tonsillitis. Unconsciousness during 24 hours followed by death with cardiac failure. Autopsy, bronchitis, bronchiolitis, disseminated bronchopneumonia. Death seems to have been due to acute circulatory insuffiency induced by toxic influenza.

No. 29 (66) 59. M. B., male, 72 years of age. Gastrectomy and gastroenteroanastomosis for scarred peptic ulcer. Autopsy, beside old, scarred infarction fresh infarction in the wall of the left ventricle; circumscribed fibrinous-suppurative peritonitis in the operated area.

No. 30 (71) 59. L. P., male, 59 years of age. Thoracic pains and unconsciousness a few weeks prior to admission. Death with symptoms of cardiac failure and hypotension. Autopsy, thrombosis of the descending branch of the left coronary artery with consecutive myocardial infarction and rupture of interventricular septum.

No. 31 (K. 72) 54. A. K., male, 19 years of age. Unsuccessful operation of coarctation of the aorta, followed by shock. Transitory increase of blood pressure, thereafter death with symptoms of intestinal paralysis. Autopsy, disseminated necrotized foci varying in size in the brain, small intestine and kidneys, presumably due to grave postoperative hypotension.

No. 32 (K. 59) M. P., female, 52 years of age. Shock after cholecystectomy; unmeasurable blood pressure. A few days later oliguria, then death with uremia in spite of preceding renal decapsulation. Autopsy revealed signs of uremia with grave morphological changes, characteristic of "shock kidney".

Results

Generally speaking, in none of the cases did the liver reveal a characteristic picture on gross examination. It was only in some of the graver cases that the greyish-white or yellowish-white necrotic foci of the central part of the lobules in the surrounding brownish-red hepatic parenchyma resembled the picture of nutmeg livers. The characteristic nutmeg liver pattern was observed in cases where the changes had been preceded by chronic cardiac congestion.

Histological analysis revealed certain more or less characteristic lesions in each case. Among such lesions were the vacuolar degeneration of the cytoplasm of liver cells, frequently with protein-like homogeneous droplets in the vacuoles, further the fatty degeneration of the liver cells. Necrotic single cells or necrotic foci, mostly centrilobular, were invariably observable. Another characteristic phenomenon was the appearance of wide, blood-filled sinusoids and petechiae in the area of the necrotic foci.

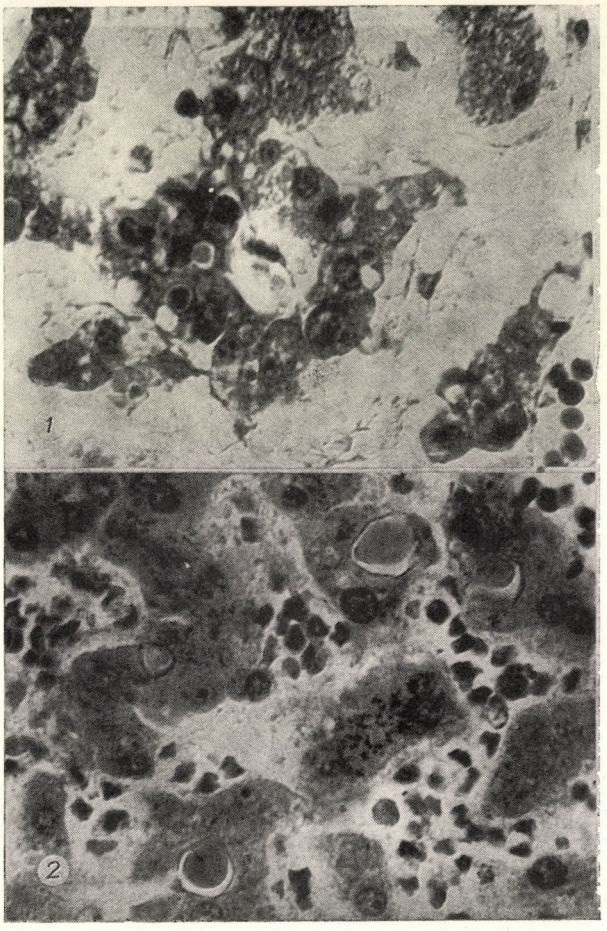


Fig. 1. (No. 4). Protein vacuoles surrounded by a clear zone in the cytoplasm of liver cells. Endes' trichrome. × 700

Fig. 2 (No. 29). Vacuoles in the cytoplasm of liver cells, containing bile clots and surrounded by a clear zone. H. E. × 580

Considering the gravity and extension of the said lesions and taking possible earlier hepatic lesions also into account, we have divided our cases into four categories.

Group I (Nos 3, 8, 11, 21, 22, 28) included 6 cases in which the hepatic lesions were slight, mostly incipient.

The cytoplasm of the liver cells in this group contained various kinds of vacuoles. Part of them, especially those in the vicinity of necroses of those situated in the necrotic cells, were empty and devoid of fat. Another part contained a drop of protein-like material surrounded by a clear zone, and stained light blue with trichrome *(Figs. 1, 2)*. In similar position, but some-

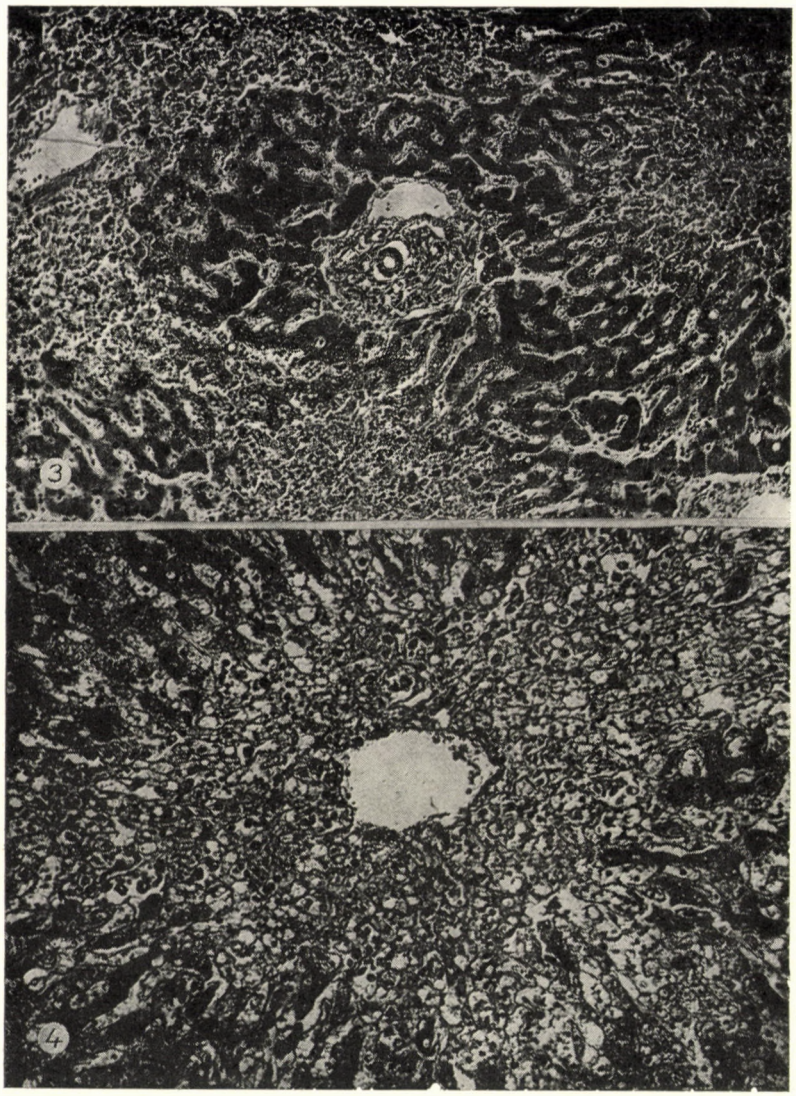


Fig. 3 (No. 24). Partly confluent, centrilobular necrotic foci. Hepatic parenchyma containing minute vacuoles can be seen in the centre of the picture: it surrounds a portal area. Endes' trichrome. × 110

Fig. 4 (No. 27). Parenchymal cells destroyed, reticulin framework intact in the necrotized hepatic tissue. Gömöri's silver impregnation. × 130

times independent of necrotic foci, minute or larger fatty vacuoles were frequently encountered in the liver cells. Minute vacuoles were always present, whereas the number of the larger ones varied from case to case. Necrotic single cells were always present, while the necrotic foci were few and small, they were usually situated in the central area of the lobules. Some of the

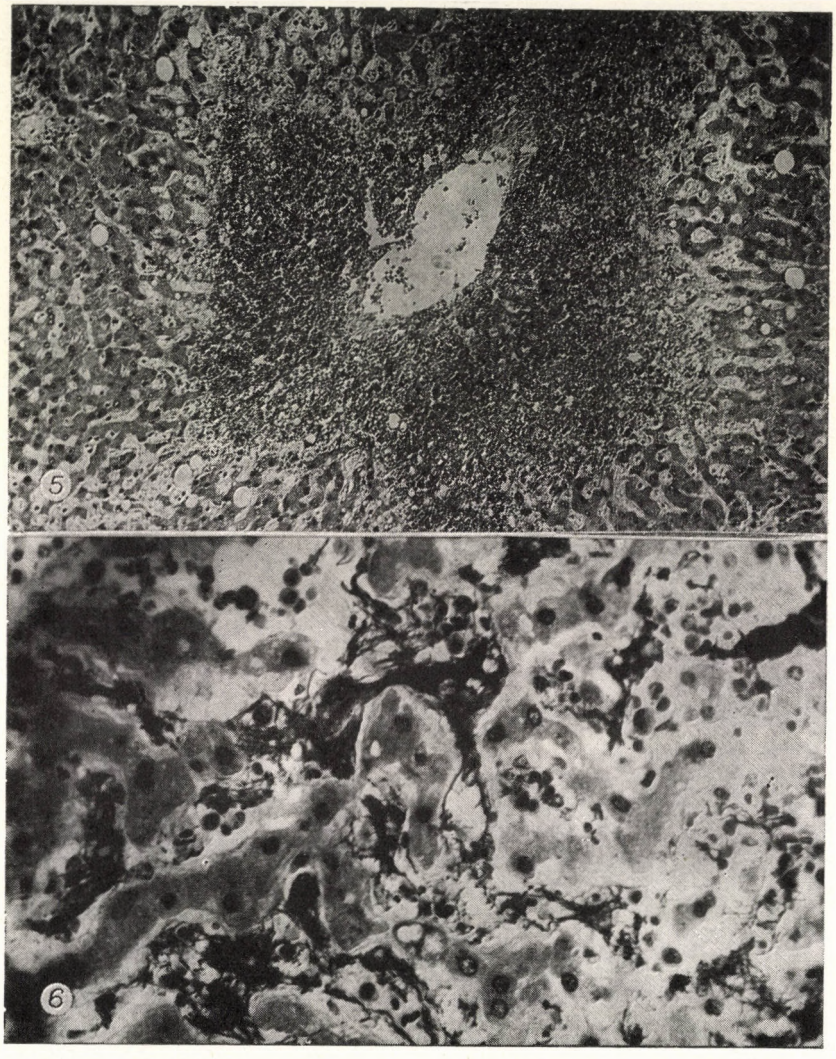


Fig. 5 (No. 19). Necrotized hepatic parenchyma with blood pool, around dilated central vein. Adjacent to focus, large and small fatty vacuoles. H. E. × 100

Fig. 6 (No. 26). Delicately patterned, in some part aggregated fibrin network in the sinusoids of the necrotic foci. Endes' trichrome. × 370

necrotic liver cells had no nuclei: they had dissolved and disappeared. Others contained an intensely staining pyknotic nucleus in the homogeneous eosinophil cytoplasm. Extravasation of blood, so-called »Blutseen« (blood pools), in the necrotic area were observed in a single case.

Group II included 17 typical cases (Nos 1, 4, 5, 6, 7, 9, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 23, 24, 25, 31, 32) in which the hepatic structure was gravely damaged.

Vacuoles with protein droplets were invariably present; their number was small and they were mostly situated in or around the necrotic areas. Minute fatty vacuoles were observed in all cases, while larger ones only in four. Characteristic of the picture were the frequently extensive necroses in the centre of the lobule or occupying a sector of this. Adjacent necroses were often coalescing, forming a ringlike figure surrounding the preserved parenchymal islets around the portal areas *(Fig. 3)*. Apart from centrilobular necroses focal ones and necrotic single cells were present. Only the parenchymal cells

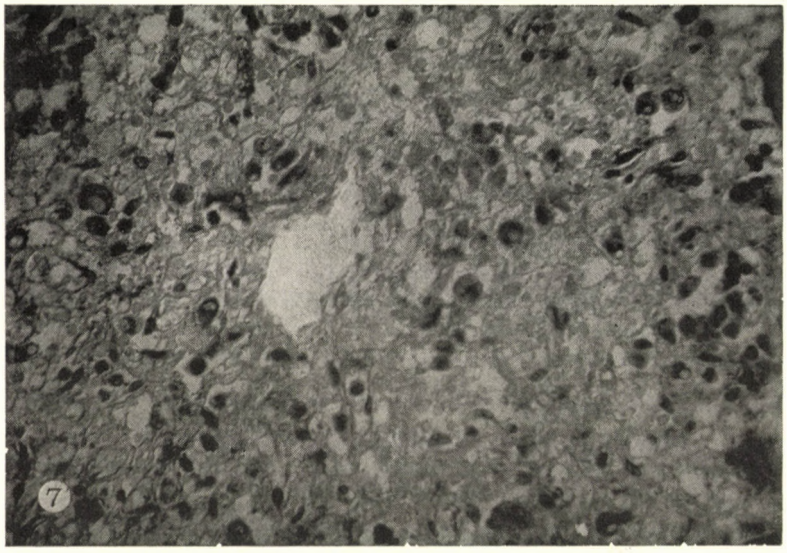


Fig. 7 (No. 27). Slight increase of fibers at the site of a necrotized area. Endes' trichrome. × 340

were affected in these areas, the reticulin framework survived *(Fig. 4)*. In the area of large central necroses blood pools were encountered in 6 cases *(Fig. 5)*, and, independently, some sinusoids were greatly dilated and engorged with erythrocytes.

Group III included 8 cases (Nos. 2, 10, 17, 19, 26, 27, 29, 30) where the said acute lesions appeared in a congested hepatic tissue. Atrophied hepatocellular trabecules and, between them, dilated blood-filled sinusoids were observable around the dilated central veins. A characteristic feature of this category were the extensive necroses, usually with blood pools. There were few protein-containing vacuoles; some of the vacuoles were filled with yellowish-green bile clots. Small fatty vacuoles were invariably present, while large ones less frequently. In 4 cases a delicate fibrinous network was seen in the necrotic foci and, independently, in the sinusoids: this network was conglutinated in

some places *(Fig. 6)*. In some protracted cases a slight increase of the fibres was observed at the site of the central necrosis *(Fig. 7)*.

Group IV consisted of a single case (No. 12) where it was in a cirrhotic liver that the alteration occurred. Necrotic foci were seen in the irregular regenerative parenchymal islets, some of them with blood pools. There were a few protein and fatty vacuoles in the liver cells adjacent to the necrotic areas.

Discussion

MARTIN *et al.* [32] were the first to describe vacoular degeneration of the liver cells on the effect of oxygen deficiency. On the basis of decompression experiments PICHOTKA [39] was the first to regard vacuolar degeneration as a specific consequence of oxygen deficiency. ROSIN [41] found various animals (mouse, guinea pig, rabbit, chicken) to differ in the sensitivity to oxygen deficiency. ATERMAN [2], too, regards vacuolation as the most frequent symptom of hypoxia. Alterations occurring in the liver of aviators who had crashed from great altitudes because of »akuter Höhentod« due to hypoxia, were described by MÜLLER and ROTTER [35]. Similar liver injuries were described by the American authors LEWIS and HAYMAKER [27] and the French GRANDPIERRE and GROGNOT [17]. HESSE [20] found no vacuolation in the liver of airmen who had crashed from low altitudes, *i. e.* from atmospheric layers with adequate oxygen tension. Hepatic lesion was observed by MOON [33] after battle casualties; by HESSE [20] and KETTLER [23, 23*a*, 24] in autopsy material.

TERBRÜGGEN [47] and TROWELL [48] refute the theory that vacuolation is characteristic of oxygen deficiency. FARKAS [14] regards vacuolation as the consequence of a physical process. TÖRŐ [48] writes of aqueous vacuoles of hepatocellular origin and attributes them to a release of the water bound by the cytoplasm. SHERLOCK [44] applies the term "hydropic degeneration" to the process in question. ALTMANN [1] found the lesion to regress in surviving animals and stated that the process was reversible. HANZON [19], studying the liver of rats under the fluorescence microscope, observed a rapid appearance and disappearance of the vacuoles. MÖLBERT and GUERRITORE [34] demonstrated by electron microscope the decomposition of the cristae mitochondriales and the reversibility of the process.

MALLORY [30] and ULRICH [50] observed inclusions in the vacuoles which were regarded by MALLORY as a symptom of incipient necrosis. Many authors qualify this substance as fibrin. Treated with trichrome, the droplets stain blue or red. ALTMANN [1] suggests that the colour depends on the water content: if concentrated, the substance stains red; if rich in water, it stains blue.

HORTEGA [22] considers the droplets of hepatocellular origin; BÜCHNER [5, 6], that they consist of cellular protein. Most authors, however, attribute

their existence to blood plasma entering the liver cells, a theory which HAITINGER and GEISER [18] as also NAIRN *et al.* [36] tried to prove by means of the fluorescence microscope.

TROWELL [49] suggests that vacuolar degeneration is due to a rise of capillary pressure, while KETTLER [23, 23*a*, 24] attributes it to increased permeability of the capillary walls. SHERLOCK [44, 45] ascribes an important role to VDM (vasodepressor material). It has been emphasized by BÜCHNER [5] that the parenchymal cells are more sensitive than the capillary endothelium and thus more easily damaged by a lack of oxygen; he regards the alteration as the result of disturbed cell metabolism.

We encountered empty vacuoles or such containing protein in all of the examined cases. The number of vacuoles was, however, small in most of our cases (in 20 out of a total of 32), and they were confined to the area adjacent to the necrotic foci; therefore, we do not regard their occurrence as the most significant, in any case not as significant as it appears to be in animal experiments. It is quite possible that our patients did not die of the hypoxia suddenly developing in the acute phase of shock, *i. e.* their death did not occur in that phase which coincides with the development of experimentally-induced vacuolar degeneration.

As long ago as 1907 did RÖSSLE [42] suggest that the central hepatocellular fatty change was of hypoxic origin. This kind of degeneration was observed by LEWINSTEIN [26] and BALÓ [3] in animals exposed to low atmospheric pressures. Recent investigations support the view that acute hypoxia causes centrilobular fatty degeneration (usually with large fatty vacuoles), a lesion attributed by BÜCHNER [5] to the inhibition of ATP-formation.

In 12 of our cases could we observe centrally-situated large fatty vacuoles, but they were widespread in 5 cases only. In the rest there were minute fatty vacuoles in the liver cells, and their number was not proportional with the gravity of liver injury. The possibility cannot be excluded that fatty degeneration may in these cases have been due to hypoxia that was in no connection with the disease immediately preceding death.

It was in cases of protracted oxygen deficiency that MARTIN *et al.* [32], ZALKA [51], CAMPBELL [9] and LOEWY [29], and in oxygen deficiency of short duration that PICHOTKA [39] observed hepatocellular necrosis. On the evidence of autopsy material, HESSE [20] and MOON [33] also ascribed the necroses to the lack of oxygen.

The necroses vary in extent. According to ALTMANN [1], necrosis of single cells is characteristic of moderate hypoxia. Necrosis extending to many cells is usually centrolobular, a phenomenon due to the special circulatory features of the liver, the area around the central vein being the least supplied with oxygen. Zonal necrosis has been interpreted by RÖSSLE [42] and CAMERON [8] as due to the fact that not all capillaries are simultaneously

open and further that the portal vein and the hepatic artery drain into the sinusoids separately (OLDS and STAFFORD, 37). ELIAS [11] even supposes that the arterial capillaries may reach the centre directly.

It was after administration of thyroxin that GERLEI [16], and after that of tannic acid that KORPÁSSY [25] observed centrilobular necrosis. Toxic agents elicit vasospasm according to HIMSWORTH [21]. Poisons responsible for hepatocellular necrosis induce, according to LICHTMAN [28], first a temporary constriction and then a dilation of the hepatic vessels. Other authors suggest that centripetal circulation were impeded by the swelling of marginal and midzonal cells and this would lead to necrosis.

SHERLOCK [45] in biopsy and autopsy specimens of livers from cases of acute heart failure observed a peripheral spreading of necroses. She suggests that circulatory disturbances responsible for liver injury depend on the following factors: (i) cardiac output; (ii) arterial oxygen saturation; (iii) portal pressure; (iv) duration of the process.

*

We observed necrosed foci in all of our cases. Minute and mostly central necroses were found in Group I. Necroses in Group II were likewise central, but more widespread, often sectoral; the adjacent necrotic foci were sometimes coalescent. The necrotized area contained blood pools in 6 cases. In Group III it was combined with chronic congestion that widespread necroses developed, almost invariably with central blood pools. Necrosis was the most characteristic hepatic lesion in our material, presumably because the patients had died after a longer phase of hypoxia: death was always preceded by a state of shock that lasted a day at least. We, too, attribute the necroses to oxygen deficiency induced by circulatory disturbance.

The question arises as to what happens to the described changes after transitory shock. As regards the vacuoles, TROWELL [49], ALTMANN [1] and others think that the cells are capable of so to say isolating the invading fluid in the form of droplets. The protein may later be ejected from the vacuoles and is then secreted with the bile (albuminocholia), a phenomenon observed by FRANKE and SYLLA [15] under the fluorescence microscope. At autopsy of patients who died of myocardial infarction CLARKE [10] observed disappearance of the necrotic foci a month after infarction. The observation made by BYWATERS [7] and SHERLOCK [44] after traumatic shock is indicative of parenchymal regeneration. In ALTMANN's animal experiments [1] the number of mitoses following shock was, however, not sufficient to indicate cellular replacement, wherefore he explained the regeneration process by endoamitoses. We observed a great number of dividing cells in one of our cases only, and are inclined to agree with ALTMANN as regards amitoses. In favourable cases, the preservation of the reticulin framework offers a possibility of complete

parenchymal regeneration. Studying the reticulin in convalescing cases, SHERLOCK [45] observed condensation and proliferation. We saw proliferation of the reticular fibres only in a few cases belonging to Group III; they might have rather been due to the prolonged congestion.

We analyzed the kidneys in 23 cases, and discovered morphological changes in 11 of them. Taking into account the clinical and laboratory data, renal dysfunction had been diagnosed in 9 cases: it had manifested itself with oliguria, a rise of N. P. N. and, in cases 8 and 32, with uremia. In these last two cases, the clinical symptoms were well justified by the grave injury similar to that observed by one of the present authors in connection with shock [12]. This would mean that acute circulatory failure often affects the kidneys as well. The occurrence of lesions is not so frequent in the kidneys as in the liver, but if they do occur, they mean an extremely grave, often fatal, complication.

Many authors are of the view that the disturbed permeability of the sinusoid wall plays a decisive role in the origin of pathological changes. EPPINGER [13] speaks of "Albuminurie ins Gewebe" and RÖSSLE [42] of serous hepatitis. Dyshoria has been the term applied by SCHÜRMANN and MACMAHON [43] to the pathological alternation of the subendothelial basement membrane: they attributed parenchymal damage to the histotoxic action of the leaking plasma. The primary role of these changes has been questioned.

ALTMANN [1] and POPPER [40] regard the appearance of protein-rich fluid in the dilated spaces of Disse a terminal-agonal phenomenon. We, too, had occasion to observe this phenomenon, especially when the terminal phase was protracted; we do not think, however, that the lesion of the vessel walls precedes, and is more important than, the damage of the sensitive parenchymal cells.

BÜCHNER *et al.* [5, 6] and BECKER [4] were chiefly responsible for introducing hypoxydosis, a new pathogenic principle: it is by a reduction of the cells' biological oxidative capacity that the theory of hypoxydosis tries to explain those morphological and functional changes which are observed in shock. Hypoxydosis may be of three kinds: 1. hypoxic hypoxydosis when, for various reasons, there is not enough oxygen available to the cells; 2. hypoxydosis caused by a want of oxidable substances ("Substratmangel"); 3. dysenzymatic hypoxydosis due to a damage of the cells' enzyme system. There exists, according to the said authors, a correlation between histological changes and the duration of hypoxia. While the suddenly arising, milder form of hypoxia causes vacuolar degeneration of the reversible type, gradually developing hypoxia is followed by fatty degeneration, whereas grave hypoxia of long duration induces cellular necrosis.

As regards our own material, we attribute the observed hepatic damages to acute deficiency of oxygen caused by acute circulatory disturbance, no

matter by what it is released. It is the special blood supply of the liver which we regard the decisive factor in pathogenesis. This is why alterations appear first — and in the gravest form — in the centre of the lobules, the area with the weakest blood supply. The observed alterations bear a certain resemblance to the picture of nutmeg liver concomitant of cardiac failure. While the nutmeg liver is characterized by a process of gradual congestion and a slow development of parenchymal atrophy, our material was dominated by suddenly arising and grave cellular damage. Although we examined the liver in all cases where death had been preceded by a state of shock, only about 60 per cent showed a characteristic histological picture. That some 40 per cent of the said cases were negative from this point of view may, in our opinion, have been due to the fact that — apart from the duration of the shock and the gravity of hypoxia — some regulative mechanisms played a major or minor role in the origin of the pathological changes. None of our numerous other cases showed a similar picture; this argues for the specificity of the alterations and justifies the use of the term "shock liver". It deserves comment that hepatic lesions, however serious and widespread they were, never manifested themselves with clinical symptoms. This may partly be due to the great reserve power of the liver and partly to the fact that the patients died before the hepatic damage had time to influence the clinical picture. It was obviously due to the great regenerative power of the liver that no permanent trace or chronic form of the discussed alterations was observed in any case of our material.

Summary

1. Pathological changes of the hepatic tissue, to which the collective term "shock liver" may be applied, were observed in 32 subjects who had died with secondary shock, acute abdomen or cardiac failure.

2. The cases were divided into four groups: I. slight lesions with few necroses of small size; II. typical cases with extensive necroses; III. alterations accompanied by chronic congestion; IV. alterations accompained by cirrhosis.

3. Protein vacuoles and fatty degeneration were not general, probably because death was usually preceded by hypoxia of longer duration.

4. Centrilobular necrosis, often with hemorrhages in the necrotized area, was the most characteristic lesion observed.

5. We attribute the observed pathological changes to hypoxia caused by acute circulatory disturbance, and suggest that their centrolobular position is determined by the special blood supply of the liver.

6. The absence of clinical symptoms is obviously due to the liver's great reserve power, and complete regeneration may be expected whenever the patient is able to survive the state of shock.

REFERENCES

1. ALTMANN, H. W. (1949): Über Leberveränderungen bei allgemeinem Sauerstoffmangel, nach Unterdruckexperimenten an Katzen. Frankfurt. Z. Path. *60*, 376. — 2. ATERMAN, K. (1952): Some Local Factors in the Restoration of the Rat's Liver after Partial Hepatectomy. Arch. Path. (Chicago) *53*, 209. — 3. BALÓ, J. (1928): Die Wirkung der Luftverdün-

nung auf das Blut und die blutbildenden Organe. Z. ges. exper. Med. *59*, 303. — 4. BECKER, V. (1954): Geweblich gebundener Sauerstoffmangel. Klin. Wschr. *32*, 577. — 5. BÜCHNER, F. (1945): Die pathogenetische Wirkung des allgemeinen Sauerstoffmangels. Zbl. allg. Path. path. Anat. *83*, 53. — 6. BÜCHNER, F. (1957): In Büchner, Letterer, Roulet: Handbuch der allgemeinen Pathologie. Die Hypoxydosen. IV/2, 569. Springer, Berlin. — 7. BYWATERS, E.G.L. (1946): Anatomical Changes in the Liver after Trauma. Clin. Sci.*6*, 19. — 8. CAMERON, G. R., KARUNARATNE, W. A. E. (1936): Carbon Tetrachloride Cirrhosis in Relation to Liver Regeneration. J. Path. Bact. *42*, 1. — 9. CAMPBELL, J. A.: cited by Altmann (1). — 10. CLARKE, W. T. W. (1950): Centrilobular Hepatic Necrosis following Cardiac Infarction. Amer. J. Path. *26*, 249. — 11. ELIAS, H.: cited by Kettler (24). — 12. ENDES, P., TAKÁCS-NAGY, L., SZÉCSÉNY, A. (1954): Pathologie der bei Shock und toxischen Schädigungen entstehenden Nierenlaesionen. Acta morph. hung. *4*, 379. — 12a. ENDES, P. (1954): Kombinált trichrom festés. Kísérl. Orvostud. *5*, 479. — 13. EPPINGER, H. (1949): Permeabilitätspathologie. Springer, Wien. — 14. FARKAS, K. (1944): Experimentell-morphologische Beobachtungen an den peripheren Ganglien und innersekretorischen Drüsen von an „Lufttaucher" bzw., Höhenkrankheit zugrunde gegangenen Tieren. Zbl. allg. Path. path. Anat. *82*, 231. — 15. FRANKE, K., SYLLA, A.: cited by Altmann (1). — 16. GERLEI, F. (1933): Nécrose du foie consécutive à l'empoisonnement par la thyroxine. Ann. Anat. path. méd.-chir. *10*, 555. — 17. GRANDPIERRE, R., GROGNOT, P. (1947): Les modifications histologiques du foie dues à l'altitude. Méd. éronaut. *2*, 18. — 18. HAITINGER, M.—GEISER, P.: cited by Altmann (1). — 19. HANZON, V. (1952): Liver Cell Secretion under Normal and Pathologic Conditions Studied by Fluorescence Microscopy on Living Rats. Acta physiol. Scand. *28* (Suppl.), 101. — 20. HESSE, W. (1942): Untersuchungen über das Bild der vakuoligen Degeneration in der Leber an menschlichem Sektionsgut. Beitr. path. Anat. *107*, 173. — 21. HIMSWORTH, H. P. (1947): The Liver and its Diseases. Harvard Univ. Press, Cambridge. — 22. HORTEGA, cited by Altmann (1). — 23. KETTLER, L. H. (1948): Über die vakuolige Degeneration der Leberzellen. Virchows Arch. path. Anat. *315*, 587. — 23a. KETTLER, L. H. (1954): Parenchymschädigungen der Leber. Erg. allg. Path. *37*, 1. — 24. KETTLER, L. H. (1957): In E. Kaufmann: Lehrbuch der speziellen pathologischen Anatomie, W. de Gruyter, Berlin. — 25. KORPÁSSY, B. (1949): Leberschädigung durch Gerbsäure. Schweiz. Z. Path. Bakt. *12*, 13. — 26. LEWINSTEIN, G. (1897): Zur Kenntnis der Wirkung der verdünnten Luft. Pflügers Arch. ges. Physiol. *65*, 278. — 27. LEWIS, R. B.—HAYMAKER, W. (1948): High Altitude Hypoxia. Observations at Autopsy in Seventy-five Cases and an Analysis of the Causes of the Hypoxia. J. Aviat. Med. *19*, 306. — 28. LICHTMANN, S. S. (1953): Diseases of the Liver, Gallbladder and Bile Ducts. Lea and Febiger, Philadelphia. — 29. LOEWY, A. (1935): Wirkung der Hyperämie auf die Folgen der Luftverdünnung an Leber und Nieren. Virchows Arch. path. Anat. *294*, 702. — 30. MALLORY, F. B. (1901): Necroses of the Liver. J. Med. Res. *6*, 264. — 31. MACMAHON, H. E.: cited by Altmann (1). — 32. MARTIN, H. G.—LOEVENHART, A. S.—BUNTING, C. H.: cited by Altmann (1). — 33. MOON, V. H. (1948): The Pathology of Secondary Shock. Amer. J. Path. *24*, 235. — 34. MÖLBERT, E.—GUERRITORE, D. (1957): Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Leberparenchym bei akuter Hypoxie. Beitr. path. Anat. *117*, 32. — 35. MÜLLER, E.—ROTTER, W. (1942): Über histologische Veränderungen beim akuten Höhentod. Beitr. path. Anat. *107*, 1956. — 36. NAIRN, R. C.—CHADWICK, C. S.—MCENTEGART, M. G. (1958): Fluorescent Protein Tracers in the Study of Experimental Liver Damage. J. Path. Bact. *76*, 143. — 37. OLDS—STAFFORD: cited by Kettler (24). — 38. PAPPENHEIMER, A. M.—HAWTHORNE, J. J. (1936): Amer. J. Path. *12*, 625. cited by Altmann (1). — 39. PICHOTKA, J. (1942): Tierexperimentelle Untersuchungen zur pathologischen Histologie des akuten Höhentodes. Beitr. path. Anat. *107*, 117. — 40. POPPER, H. (1948): Significance of Agonal Changes in the Human Liver. Arch. Path. (Chicago) *46*, 132. — 41. ROSIN, A. (1927): Morphologische Organveränderungen bei der Leber unter Luftverdünnung. Beitr. path. Anat. *76*, 153. — 42. RÖSSLE, R. (1930): Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie V. *1*, 243. Springer, Berlin. — 43. SCHÜRMANN, P.—MACMAHON, H. E. (1933): Die maligne Nephrosklerose, zugleich ein Beitrag zur Frage der Bedeutung der Blutgewebsschranke. Virchows Arch. path. Anat. *291*, 47. — 44. SHERLOCK, S. (1956): Diseases of the Liver and Biliary System. Blackwell, Oxford. — 45. SHERLOCK, S. (1951): The Liver in Heart Failure, Relation of Anatomical, Functional and Circulatory Changes. Brit. Heart J. *13*, 273. — 46. STRUGHOLD, H.: cited by Büchner (6). — 47. TERBRÜGGEN, A. (1945): Aussprache. Zbl. allg. Path. path. Anat. *83*, 58. — 48. TÖRŐ, I. (1951): Die Entstehung von Wasservakuolen in Leberzellen. Acta morph. hung. *1*, 313. — 49. TROWELL, O. A. (1943): Liver Vacuoles and Anoxemia. Nature (London) *151*, 730. — 50. ULRICH, H. (1938): Organverfettung bei Sauerstoffmangel und Hunger. Frankfurt. Z. Path. *52*, 80. — 51. ZALKA, E. (1931): Blutkörperchenzahl und Organveränderungen nach Luftverdünnung und das reticuloendotheliale System. Z. ges. exp. Med. *76*, 120.

ИЗМЕНЕНИЯ ПЕЧЕНИ В СВЯЗИ С ВТОРИЧНЫМ ШОКОМ И ОСТРОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ СЕРДЦА

А. ХАРАСТИ и П. ЭНДЕШ

1. На умерших вследствие вторичного шока, острой брюшной катастрофы и острой недостаточности сердца авторы наблюдали в 32 случаях тканевые изменения печени, которые можно объединить под термином «шоковая печень».

2. Эти случаи можно распределить на четыре группы: I) случаи со слабыми изменениями, с некрозами небольшого распространения, II) типичные случаи с обширными некрозами, III) изменения, развивавшиеся при хроническом застое и IV) изменения при циррозе печени.

3. Белково-капельное вакуольное перерождение и жировое перерождение на данном материале оттесняются на задний план. Это можно объяснить тем обстоятельством, что вскрытие, как правило, состоялось после длительной гипоксии.

4. Самым характерным изменением в материале оказался некроз в центральной дольке. В этой области часто наблюдались также кровотечения.

5. Изменения объясняются недостатком кислорода (гипоксией), сопровожденном острым расстройством кровообращения, а их локализация — своеобразными условиями кровоснабжения печени.

6. Отсутствие клинических симптомов предположительно связано с значительной резервной силой печени и в случае выживания после вызывающего изменения шокового состоянии можно считаться с полной регенерацией.

LEBERVERÄNDERUNGEN BEI SEKUNDÄREM SCHOCK UND AKUTER HERZINSUFFIZIENZ

A. HARASZTI und P. ENDES

1. Bei mit sekundärem Schock, akutem Abdomen- und chronischer Herzinsuffizienz Verstorbenen wurden in 32 Fällen Gewebsveränderungen in der Leber wahrgenommen, die unter dem Namen Schock-Leber zusammengefasst werden können.

2. Diese Fälle wurden in vier Gruppen unterteilt: I. Fälle mit geringen Veränderungen, mit wenig Nekrosen geringer Ausdehnung, II. typische Fälle mit ausgedehnten Nekrosen, III. Fälle in denen die Veränderungen mit chronischer Stauung und IV. mit Zirrhose vergesellschaftet waren.

3. Vakuoläre Entartung infolge Entstehung von Eiweisstropfen, sowie fettige Degeneration war im Material nicht ausgeprägt, was damit erklärt werden kann, dass die untersuchten Fälle meist nach längere Zeit bestehender Hypoxie zur Sektion gelangten.

4. Als typischste Veränderung erwies sich im Material die zentrolobuläre Nekrose, häufig mit Blutungen.

5. Die Veränderungen werden auf die mit der akuten Zirkulationsstörung einhergehende Hypoxie zurückgeführt, und ihre Lokalisation mit den eigenartigen Blutversorgungsverhältnissen der Leber erklärt.

6. Das Fehlen von klinischen Symptomen hängt offenbar mit der grossen Reservekraft der Leber zusammen, und wenn der Schockzustand überlebt wird, kann mit einer vollkommenen Regeneration gerechnet werden.

Dr. Antal HARASZTI
Prof. Dr. ENDES
Debrecen, 12 Kórbonctan, Hungary

State Institute of Dermato-Venerology and Dept. of Dermatology and Venerology of the University Medical School, Budapest (Director: Prof. F. FÖLDVÁRI)

THE AGAR BINDING REACTION IN SKIN DISEASES

E. LIEBNER, GY. TEMESVÁRY, JÚLIA LENGYEL and J. ANGYAL

(Received October 20, 1959)

The diagnostic method of CSABA and TÖRŐ, published in 1958, is based on the observation that agar becomes turbid if brought into contact with the serum of patients suffering from malignant tumour. According to the authors' theory, the malignant proliferating tumour cells break through the normal hyaluronic acid—heparin barrier, giving thus rise to the formation of depolymerizates, become attached to proteins, and induce the production of immune substances against themselves. Specific antibodies produced in the organism against mucopolysaccharides can be demonstrated by the turbidity of agar, a polysaccharide of vegetable origin which has a similar chemical structure.

CSABA and TÖRŐ obtained with their reaction (CsTR in the following) a positive result in 85.9 per cent of carcinomas, 60 per cent of sarcomas, 78.4 per cent of their cases of Hodgkin's disease and 90 per cent of melanomas, all histologically verified. They emphasized that the proportion of false negative reactions was especially high (26.8 per cent) in the group of superficial carcinomas (skin, vagina, vulva, larynx, lip, tongue). The serum of carcinomatous patients in the diffuse, final stage of the disease proved positive in 24 per cent, while a false positivity was observed in 12.8 per cent of the controls. Part of these false positive reactions has been attributed to lipemia, and it was attempted to avoid the misleading positive reactions by lipid-free diet. Animal experiments, performed by CSABA and KISS, yielded similar results; they encountered around the tumours numerous mast cells or free heparin granules and stated that their number was proportional to the positivity of the reaction. Such a direct relation is well borne out by the fact that the serum of rabbits (the connective tissues of which contain no mast cells) gives a negative reaction even after successful transplantation of tumours. Experiments *in vitro* disclosed that all negative sera become positive on adding 800 μ g of histamine, and that the same happens after treatment with 0.5 per cent protamine sulphate. Lipoproteins, specific for the reaction, remain latent as long as the equilibrium between heparin and histamine is maintained, and are released after the balance has been overthrown. According to the

authors, involved in the CsTR are lipoprotein-antigens with their antibodies and mucopolysaccharide-antigens with their antibodies of the properdin type; besides, the C_3 complement fraction and histamine seem to play a certain part. All these substances are present in normal serum; when malignant tumour is formed, their equilibrium is upset.

An increased number of mast cells around carcinomas was first observed by EHRLICH and confirmed later by WESTPHAL, FROMME, WEILL, STAEMMLER, HIGUCHI and QUENSEL, who pointed out that, while a particularly large number of mast cells appeared in the zone between the carcinoma and its intact surroundings, very few — or no — such cells were observed in the tumour itself. Mast cells are according to SYLVEN larger, and their granules more variable in and around the growing part of the tumour than in the areas of degeneration. On the other hand JANES and MCDONALD found only a few mast cells in the stroma of gastric, duodenal, sigmoid, rectal, mammary, renal, ureteral and prostata carcinomas and in lymphnode metastases, while they observed many mast cells in regional nodes which did not contain metastases; the number of mast cells in the stroma of gastric ulcers was four times that found in carcinomas. Studying melanotic cc-metastases, WEILL failed to find mast cells in the parenchymal organs but saw a great number in the lymphnodes and the surrounding connective tissues; he concluded that a mast cell reaction could occur only in tissues which contain mast cells under normal conditions. STAEMMLER claimed that the number of mast cells decreases if a tumour rich in connective tissue develops in a tissue which contains many mast cells as, for instance, in the case of fibroadenoma mammae. This has been confirmed by HIGUCHI who detected no mast cells in sarcomas. It was in the vicinity of skin carcinomas that ASBOE—HANSEN observed the increased amount of mast cells and hyaluronic acid. Numerous mast cells were found by LENGYEL and VÉRTES around the circumscribed cell nests of basal-celled carcinomas and the stroma assumed a metachromatical bright red colour. This colour disappeared under the influence of hyaluronidase, thus revealing the presence of hyaluronic acid. On the other hand, metachromasia was scarce and limited to a small area around the cell nests of spinocellular carcinomas. The different behaviour of the two types of tumour has led to the conclusion that hyaluronic acid constitutes an important factor of stromal defence; its increase around the basal cell nests restricts tumorous proliferation, while its considerably smaller amount around spinocellular carcinomas (a phenomenon presumably due to higher hyaluronidase activity) promotes spreading and metastasis. Increase in the amount of hyaluronic acid went hand in hand with an increase in the number of mast cells. This seems to support ASBOE—HANSEN's theory that hyaluronic acid is produced by the mast cells. LENGYEL and SZEMESI observed an abundance of hyaluronic acid around the small tumour-cell nests in the epithelial carcinoma of the

uterine cervix, but failed to do so in cases of large tumorous conglomerates poor in stroma: the amount of hyaluronic acid seems to depend on the proportion of stroma and parenchyma, as also on invasive growth. From the increased amount of hyaluronic acid around the stroma-rich, small spinocellular tumour-nests as also around epidermal and lymphnode metastases, SZEMESI and LENGYEL concluded that the phenomenon in question was determined not so much by the nature of the tumour cells as rather by the local reactivity of the stroma which latter is a function of the interaction between tumour and organism.

It was likewise in the stroma round the buds of basal-cell carcinomas that SWERDLOW observed intensive metachromasia in the overwhelming majority of his cases. It would seem as if the stroma formed an integral part of basal-cell tumours, growing together with the epithelium, while the stroma of spinocellular cancers, melanomas and metastatic tumours first resists invasion and is finally torn apart. Observations made on growing experimental tumours also point to the important role of mast cells. The formation of subepithelial mast-cell tumours was observed after the painting of the skin of white mice with tar (SCHREUSS, ROCA DE VINYALS), and the cutaneous and subcutaneous accumulation of mast cells after its painting with various carcinogenic substances (TWORT and TWORT): it was in proportion with the degree of the subepithelial inflammation and had grown until it became quite tumour-like. Investigations made by CRAMER and SIMPSON gave the result that the development of mast-cell reaction precedes the formation of tumours, and that it is more pronounced in animals resistant than in those sensitive to experimental tumours; the mast-cell reaction is a defence against carcinogenic stimuli, and it is the heparin contained in the mast cells that inhibits the increased hyaluronidase action in tumours (GLICK and SYLVÉN; GREENSTEIN). That heparin tends to inhibit tumoruos growth has been confirmed by several authors (HOLMGREN and WOLFHART, FISCHER, BALAZS and HOLMGREN, HARDING, HEILBRUNN and WILSON), although SZEMESI and LENGYEL failed to prevent tumorous growth in animals either with heparin or with hyaluronidase. Of fundamental significance is the statement of JORPES, HOLMGREN and WILANDER that in tissues the number of mast cells and the amount of heparin are in a direct ratio; it is moreover probably the irritative action of the growing tumour which increases the number of the mast cells and so the amount of heparin produced by these cells. This would mean that heparin plays a double role in the production of stromal reaction: (i) it is a precursor of hyaluronic acid (ASBOE—HANSEN); (ii) it inhibits hyaluronidase activity and so increases the viscosity of the interstitial space, while promoting — as a formative factor — the formation of connective tissue fibres. The concept that the principal function of the mast cells consists in the production of the ground substance of connective tissues (STAEMMLER, SYLVÉN, ASBOE-

HANSEN, BENSLEY, etc.) is supported by the results of WICHMANN who succeeded in demonstrating that in healing wounds the number of mast cells — after a decrease on the first day — grew gradually from the second day to reach its peak on the 8th to 10th day by which time fresh connective tissue had been formed. It might be assumed that a somewhat similar — though slower — process occurs in the initial phase of tumorous growth.

The theory that mast cells play a paramount role in the production of heparin seems to be contradicted by the fact that MENEGHINI, by repeated intra- and subepidermal injections of heparin and mucin derived from human umbilical cord, and PASCHOUD, by that of glucosamine, succeeded in producing mast-cell infiltration; that this is possible by means of heparin and mucin is, according to PASCHOUD, due to the fact that both these substances contain glucosamine either as a decomposition product or as contamination. Although it is likewise possible that the phenomenon is actually due to a storage in the fixed connective-tissue cells (BURKL), possibly a process of synthesis and no true accumulation of mast cells, the experimental results seem to indicate that the process in these cases is still more intricate and that — while heparin is produced by mast cells — heparin or glucosamine, its structural component, may somehow produce a formative stimulus and so facilitate the conglomeration of the ubiquitous mast cells.

Histamine is another product of the mast cells. Its amount is likewise proportional to the number of mast cells; it is especially high in animal mast-cell tumours and in human urticaria pigmentosa (RILEY and WEST; WEST). Heparin and histamine are supposed to form a complex in the granules of the mast cells from which they are liberated in allergen-antibody reactions as also in response to temperature, chemical and light stimuli. Histamine does not seem to play any role in fibrous reactions because structural changes in the peritumoral connective tissue are essentially different from the characteristic acute, exudative inflammatory symptoms induced by the liberation of histamine. Histamine, an antagonist of heparin and hyaluronic acid, while able to prevent the growth of connective-tissue fibres in a direct way, may probably do so also through the acute inflammatory oedema it provokes, *i. e.* by diluting and washing away the mucoid substances which are between — or attached to — the fibres, and so preventing their organisation. It may be due to the liberation of histamine and the development of oedema that the fibrous reaction is prevented in the circumscribed mast cell infiltrations of the skin in urticaria pigmentosa, although this would be more possible here than in the surroundings of epithelial tumours which are poorer in mast cells. The special histological features of the various types of animal mast cell tumours (dog, cat, ox) may be interpreted similarly. An analysis of HEAD's observations on a large material seems to make evident that the system of collagenous fibres is highly developed, thick and fascicular in those types which

are free from oedema (I*a*, I*c*, III, IV) and *vice versa:* the network is delicate and thin in oedematous stroma (types I*b* and II). The existence of transitory forms between the two types points likewise to a reciprocity of the two phenomena. Moreover, in tumours of this type it is not only the connective tissue-forming effect of hyaluronic acid which seems to be inhibited: the special anticoagulant action of heparin seems to be likewise suppressed, for as a rule no haemorrhages are demonstrable in the tumours themselves, nor does the blood of the tumorous animals reveal any anticoagulative action (REILLY). That coagulation is protracted after removal of the tumour may be due to the surgical injury (SCHWARTZMAN and ORKIN). By way of analogy, the haemorrhagic form of urticaria pigmentosa is likewise infrequent, and data on the patients coagulation time are contradictory.

The theoretical foundation of the CsTR and the said results have induced us to examine from a dermatological point of view its (i) diagnostic value; (ii) its connection with stromal reaction; (iii) its behaviour in other processes where the mast cell-heparin-hyaluronic acid system seems to have a significant role. It was hoped that such investigations would allow a deeper insight into inner relationship connected with the matter in question.

Method

We proceeded according to the technique described by CSABA and TÖRŐ; the dietary rules — established with a view to avoiding turbidity due to lipemia — as also those regarding medication (prohibition of veronal) were strictly observed. We had our results checked at the beginning by sending the sera (labelled with pseudonyms) to the Institute of Histology and Embryology where the procedure was repeated; as its findings were invariably in agreement with ours, we dispensed with regular checking in the later course of the experiments and contented ourselves with occasional controls. Likewise at the beginning, every reaction was repeatedly examined; since, however, there occurred neither doubtful nor contradictory results, later we repeated only such reactions where we wanted to ascertain the effect of some handling upon their positivity or degree. The reaction is quite clear readable, and both its weakening and strengthening are generally well visible.

We always began with the histological confirmation or correction of the clinical diagnosis and right from the beginning we strictly differentiated the types of epithelioma, the cases of precancerous conditions and incipient tumours. We employed haematoxylin-eosin or van Gieson's stain to study the penetration or demarcation, the nature and quantity of connective-tissue fibres, possible reactions of cellular inflammation and oedema; cresyl-violet was used for the study of acid polysaccharides, and toluidine-blue for that of mast cells. As regards fixing fluids, we dispensed with the use of the generally recommended basic lead acetate and Carnoy's fluid; in doing so, we were led by the consideration that mucosaccharides, the decisive factor of fibrous reaction, are incorporated in the fibres so that they are not or hardly washed away by fixation in formalin solutions, whereas a pathological accumulation of hyaluronic acid can only be inferred if it remains perceptible even after usual fixation in formalin. We did not make use of the hyaluronidase reaction which serves to distinguish hyaluronic acid from chondroitin-sulphuric acid B because the amount of the latter is negligible in the stromal reaction of tumours. We furthermore omitted to carry out a systematic examination of neutral mucopolysaccharides which would have only further complicated the elucidation of the intricate correlations.

Material

In order to determine the principal question, *i. e.* to ascertain the diagnostic value of the CsTR we selected our cases originally so as to be able to compare a group of carcinomatous patients with one composed of non-carcinomatous subjects. Therefore patients with various well-defined skin diseases were chosen as controls, and very few healthy persons were examined. Cutaneous processes in which the involvement of mast cells and hyaluronic acid had been recognized formed a separate group. This enabled us to obtain data which seemed suitable for the elucidation of certain questions. Likewise separate groups were formed of malignant systemic diseases; precancerous cases; other tumours; chronic and acute inflammations. In selecting our material, we did not lay especial stress on great numbers; what we wanted to obtain was a material composed of cases well defined both clinically and histologically and thoroughly examined in accordance with the nature of the disease; we also attempted to exclude patients suffering from cancer of some inner organ.

The number of our test cases was 201, of which 123 were males and 78 females; their age varied between 18 and 85 years with an average of 50 years. Fifty-two patients had epithelioma and 149 some other disease.

Results

The CsTR was positive in 34 cases of epithelioma, *i. e.* in 65.4 per cent of a total of 52 such cases. The history varied between 4 weeks and 8 years; the size of the tumour ranged from lentil to plum; all cases were histologically confirmed; no metastases were found in any of them; none of the patients was cachectic. The reaction was usually repeated; the result was invariably identical.

Since the category of "other diseases" lacked uniformity, the results yielded by it were not suited for general comparison. In 3 cases were positive reactions obtained: these patients had been operated or treated with X-rays a number of years before on account of carcinoma (uterine, laryngeal or rectal), and had no symptoms at the time of the examination. We regarded them as positive controls. The rest was divided into separate groups in accordance with the nature of the epidermal lesions.

The results are shown in tables, each of them assembling a separate group of diseases.

The group with basal-cell carcinoma shown in Table 1 included a case of superficial epithelioma with doubtful malignancy: the epithelial buds were regularly lobate, uniform and sharply marked towards the cutis; shape, staining and palisade arrangement of the cells were normal; no polymorphism or mitoses were observable; the CsTR was negative. Likewise questionable is the classification of Queyrat's erythroplasia which is regarded by many authors as precarcinosis. Keratoacanthoma, on the other hand, is often benign and heals spontaneously; only 43.9 per cent of such cases were observed by VENKEI and SUGÁR to develop into spinocellular carcinoma. Among our 3 cases of keratoacanthoma there was incipient spinocellular proliferation in one case only; another case seemed to have already turned into a prickle-cell tumour.

Table 1

Cases of carcinoma

Type	Number of cases	Positive	Negative
Basocellular	26	21	5
Spinocellular	11	4	7
Intraepithelial (Jadassohn—Borst)	1	—	1
Bowen	5	3	2
Non-differentiated carcinoma in lupo	3	1	2
Non-differentiated carcinoma of penis	2	2	—
Erythroplasia Queyrat	1	—	1
Keratoacanthoma	3	3	—
Total	52	34	18

A comparison of the clinical data with the results of the CsTR makes it evident that positivity did not depend on the duration of the tumours' development, their size or the degree of their malignancy. Most of the positive tumours were of the size of a pea or a bean and some of them were not older than 3 to 8 weeks, while one of the serologically negative tumours was 30 years old and had the size of a child's palm; the negativity in these cases might be attributed to a relative benignancy. As regards duration of positivity, there seems to be no hard and fast rule: a patient yielded a positive reaction 8 years after the surgical removal of the basal-cell tumour, while in another case the CsTR became negative 6 months after the operation.

To sum up: the proportion of positive and negative reactions varied from disease to disease; the CsTR was positive in 84 per cent of the cases of basal-cell epithelioma and in 34.4 per cent of those with spinocellular epithelioma as also 3 out of 5 cases of Bowen's disease and non-differentiated carcinoma, whereas every case of keratoacanthoma gave a positive reaction.

The incidence of positive reactions in the whole group shown in Table 2 amounted to 53 per cent. The incidence varied from category to category. Worthy of note is the fact that all cases of senile keratosis gave a positive reaction although no histological sign of carcinomatous degeneration was observed in any of them. In our case of leukoplakia there was advanced acanthosis extending deep into the cutis; inflammatory infiltration, oedema, swelling and pale staining of the basal cells at certain spots pointed to cellular disturbance without pronounced malignancy. In spite of the small number of the examined cases of chronic X-ray ulcer — such cases may be regarded as precancerous — it is worthy of attention that both gave negative reactions.

Table 2

Other malignant skin tumours and precarcinomatoses

Disease	Number of cases	Positive	Negative
Kaposi's sarcoma	8	3	5
Mycosis fungoides	1	—	1
Leukaemia cutis	1	1	—
Melanosarcoma	1	1	—
Leukoplakia labii	1	1	—
Keratosis senilis	3	3	—
X-ray skin with chronic X-ray ulcer	2	—	2
Total	17	9	8

Likewise negative was the serum of a patient who was suffering from histologically verified multiple X-ray cancer. The cases of Kaposi's sarcoma showed no parallelism in the positivity of the reaction and the extent, duration and ulceration of the process, special features of the histological structure will be discussed later.

Table 3

Benign tumours and miscellaneous skin diseases

	Number of cases	Positive	Negative
Tumours			
Epithelioma adenoides cysticum	2	0	2
Atheroma inflammatum	1	1	0
Fibroma	5	0	5
Neurofibromatosis	1	1	0
Xanthoma disseminatum	1	0	1
Multiple haemangiomata	1	1	0
Condyloma acuminatum	1	0	1
Naevus pigmentosus	4	2	2
Verruca senilis	2	0	2
Acrodermatitis atrophicans, with juxtaarticular node	1	0	1
Tuberculosis cutis			
luposa	7	1	6
ulcerosa	14	6	8
colliquativa	1	1	0

Table 3 continued

	Number of cases	Positive	Negative
verrucosa	1	1	0
papulonecrotica	2	0	2
miliaris faciei	1	0	1
indurativa Bazin	1	0	1
Sarcoid Darrier—Roussy	1	0	1
Cheilitis glandularis	1	0	1
Eczema chronicum	7	2	5
Neuroderma	6	1	5
Pyoderma	2	0	2
Acne conglobata	1	1	0
Seborrhoea capitis	2	0	2
Lichen ruber planus	1	0	1
Lichen corneus hypertrophicus	1	0	1
Induratio penis plastica	2	0	2
Vitiligo	1	0	1
Chloasma	1	0	1
Dysidrosis	3	0	3
Lichenoid purpura Gougerot—Blum	1	0	1
Acne rosacea, rhinophyma	1	0	1
Scleroderma	5	0	5
Acrosclerosis	1	0	1
Hydroa aestivalis	1	0	1
Ulcus cruris varicosum	5	1	4
Status varicosus	2	0	2
Ulcus trophicum (poliomyelitis)	1	0	1
Lupus erythematosus chronicus	2	0	2
Pityriasis rosea	1	0	1
Dermatitis herpetiformis	1	0	1
Pemphigus vulgaris	5	1	4
No skin disease	3	0	3
Total	104	20	84

The cases assembled in Table 3 were regarded as controls.

The incidence of positivity for the whole control group tabulated in Table 3 was 19.2 per cent, considerably less than in the preceding groups; it is, nevertheless, almost the double of what CSABA and TÖRŐ ascertained in their non-cancerous material (12.8 per cent). The difference could not be

due to lipemia as no such sera were involved in the reactions; there was but a single case of xanthomatosis and the reaction was negative. We have no data regarding cholelithiasis. The incidence of positivity was approximately the same for tumorous and inflammatory diseases. There were four cases of naevus pigmentosus in the category of tumours; two of them gave a positive reaction, and it is noteworthy that neither of these positive cases showed any symptom of malignant proliferation either clinically or histologically. Among the inflammatory processes the tbc cutis ulcerosa showed a high incidence of positivity which was the reason of our having examined a greater number of such cases. On the other hand, the serum of patients suffering from non-ulcerative lupus was positive only exceptionally, which makes us think that a certain correlation may exist between positivity and ulceration. We were inclined to suppose that the positivity of the CsTR in these cases was due to the formation of lupus carcinoma; since, however, no signs thereof were detected histologically and since, further, adequate antituberculosis therapy (INH; PAS; also streptomycin) had proved successful in these cases, the possibility of lupus carcinoma had to be excluded. Although the number of our cases of other forms of skin tuberculosis was not sufficient to justify general conclusions, it is worth mentioning that those which presented a picture of colliquation gave often positive, and those of a proliferative character mostly negative reactions. It is — in any case — evident that the frequent positivity of ulcerative lupus cases, as observed in our experiments, is not in harmony with the statement of CSABA and TÖRŐ that tuberculous conditions are rarely positive; this contradiction seems to point to the existence of specific factors involved in this process.

The interesting feature of our single case of crural ulcer was that a number of ulcers had healed with the exception of two; these continued to proliferate and formed tumour-like growths, which, however, histological analysis revealed as non-tumorous. There was much Schiff-positive material in the granulation, while only a few small well-defined spots of acid mucopolysaccharides and no mast cells.

The control group does not include 14 patients who had previously been treated with corticosteroids; after such treatment the CsTR seems to be very frequently positive. For instance, out of 8 pemphigus cases 7 gave a positive reaction. Considering that of our untreated pemphigus cases only one was positive it seems to be obvious that corticosteroids promote positivity. The effect may be explained by the theory that the mast cells are damaged by corticoids which would be in harmony with the observation made by CAVALLERO and BRACCINI that in the connective tissue of rats treated with cortisone the number of mast cells and the amount of hyaluronic acid are decreased. The role of hyaluronic acid in the pathomechanism of pemphigus has not been fully elucidated; it was in 14 cases out of a total of 30 that

FÖLDVÁRI and NÉKÁM observed a great number of mast cells, while only in 3 cases did they find pronounced metachromasia. Corticosteroid treatment might facilitate the breakdown of mast cells and their decomposition products might promote the formation of antibodies. In any case, during corticosteroid therapy, the CsTR cannot be used for diagnostic purposes.

Separately tabulated are those diseases in which the behaviour of the CsTR may throw some light on the theoretical foundation of the reaction so as to obtain fresh data for a further elucidation of the reaction and the interpretation of certain pathological phenomena. We are referring in the first line to urticaria pigmentosa that is histologically characterized by mast cell infiltration, and clinically by urtication due to histamine liberation by rubbing. Recently several authors have mentioned also heparin as a factor involved. ASBOE-HANSEN demonstrated the presence of hyaluronic acid and mast cells in cases of circumscribed myxoedema and pointed to inner secretory correlations, while — as regards Buschke's scleroedema — FREUND was the first to demonstrate the presence of a characteristic metachromatic mucoid substance between connective tissue and muscle fibres, as also an abundance of mast cells. The mucoid substance in question proved to be hyaluronic acid (BRAUN-FALCO). While we were able to examine 11 patients with urticaria pigmentosa, the other two diseases being less frequent, the number of cases examined was accordingly low.

Table 4

	Number of cases	Positive	Negative
Urticaria pigmentosa	11	11	—
Myxoedema circumscriptum	1	1	—
Scleroedema adultorum	2	2	—

The results in Table 4 were exactly those we had expected. It should be noted that, although we repeated the reactions several times, urticaria pigmentosa gave invariably strong positive reactions independent of the extent of the disease; a weakening of the CsTR or its negativity could be induced only by artificial intervention, *i. e.* rubbing. (A detailed account of our experiments concerning urticaria pigmentosa forms the subject of a separate communication). That the reaction was invariably positive must be regarded as a proof of the fundamental principle of the theory on which the CsTR is based. We failed in the course of our own urticaria experiments to detect either an increased amount of hyaluronic acid or a proliferation of connective tissue in the area of mast-cell infiltrations; this seems to indicate very clearly that hyaluronic acid is not involved in the formation of

precipitating immune substances and that this is induced either by heparin which is continuously released by the mast cells or by a derivate of heparin. The positivity of the reaction furnishes evidence to show that not merely local, morphologically ascertainable but also immuno-biological factors must play a part in the process; to a certain extent, it further supports the concept that — although urticaria pigmentosa is in fact no urticaria but a mast-cell naevus — it nevertheless has a certain allergic character which throws new light on KRITCHEVSKY's successful experiments. Also, it enables us to appreciate the bullous (KONRAD and WINKLER) or late papular reaction which is regarded by MELCZER as a sign of pathergic hypersensitivity.

Likewise as a proof of the soundness of the CsTR's theoretical foundation must be regarded the fact that the result was positive in our case of circumscribed myxoedema and in our two cases of Buschke's scleroedema. An increase in the amount of hyaluronic acid and in the number of mast cells are characteristic features of both diseases.

We think that our experience with the three diseases covered by Table 4 should be regarded as a striking confirmation of the theory of CSABA and TÖRŐ. There are, nevertheless, many new problems that arise in connection with processes in which results are not so uniform and correlations not as simple as in the above-discussed cases. Why does one and the same disease give a positive reaction in one and a negative reaction in another case? Why does the percentage of positivity vary from one type of epithelioma to the other? Is there any correlation between the duration, size and malignancy of the tumours, on the one hand, and the positive or negative result of the reaction, on the other? If it is true that when the reaction turns out positive it is due to the fact that the proliferating malignant tumour cells penetrate through the normal barrier of heparin and hyaluronic acid and that the formation of antibodies is then started by the depolymerizates thus formed, why do we occasionally — or even as frequently, as in the case of malignant tumours — obtain positive reactions in processes with an utterly different mechanism? What is it that upsets the physiological equilibrium in such cases?

As it was in connection with skin tumours that we were faced with a good many contradictions, and as the difference between the high incidence of positive reactions in cases of basal-cell tumour and the low incidence in those of a spinocellular tumour was especially conspicuous — a phenomenon possibly due to the different stromal reactions of the two types of tumour — we attempted to find some connection between the histological structure of the peritumoral tissues and the result of the CsTR. We made comparative estimations with a view to determining the demarcation of the tumours or their penetration into the surrounding tissue, the amount and site of hyaluronic acid, the number, position, shape and granulation of the mast cells,

the free granules, as also the presence and extent of the inflammatory infiltration and oedema. In order to eliminate possible subjective elements in assessing our results, we simultaneously performed blank experiments, *i. e.* such made in ignorance of the serological results. We were, of course, quite aware that this method was not entirely reliable, since there exist many factors which may effect the morphological picture. For instance, size and granulation of the mast cells tend to change according to the phase of their glandlike function so that their possible absence may be the very indication of intensive activity, evacuation and consequent disintegration; too, the excision itself, together with the preceding local anaesthesia (BEARE) and the subsequent fixation and staining (DEVITT, SAMUELS, PIROZYNSKI and WEBSTER) may give rise to distortion. We therefore tried to determine in the first place their number and their relationship with the collagenous fibres. It was from the same angle that we examined all other cases in which seroreactions were either uniformly negative, uniformly positive, or incidentally positive. We examined at least 3 sections in each case because the distribution of the factors to be determined is frequently uneven so that they may be absent or scanty in one specimen and abundant in the next.

We present in the following a summary of our histological studies.

Epithelioma. The outcome of the CsTR in cases of epithelioma does not depend on the extent of tumorous penetration. It is rather determined by the nature of the tumour: widespread spinocellular carcinomas usually gave negative reactions, while certain fairly circumscribed ones gave positive reactions. The opposite was the case with basal-cell tumours: most (75 per cent) of the sharply defined, solid tumours were positive. Worthy of note is the fact that we saw no penetration into the surrounding tissues in a case of a 30 year-old seronegative epithelioma planum superficiale cicatrisans, in two cases of seropositive Bowen's disease, in three cases of keratoacanthoma and in three cases of seropositive senile keratosis. The last-named three cases were especially interesting, for — as a rule — carcinomas developing from these tumours have a spinocellular character, and it is just in the malignant phase that the reaction is usually negative. It is highly improbable that precancerous positivity should turn into negativity during the process of cancerous growth. That, on the other hand, the CsTR was positive in our case of labial leukoplakia was quite in accordance with the histological analysis which revealed a certain structural disturbance of the cells at a given point and an inflammatory infiltration underneath. In general, we discovered no connection between peritumoral inflammation and the result of the reaction, although the usual inflammatory reaction was entirely absent in two negative cases of basal-cell epithelioma.

As regards fibrous reaction, our observations were in perfect agreement with those mentioned in the introductory part of this paper. A considerable

accumulation of the collagenous fibres around the tumour nests, their thickening and their frequently pronounced capsular arrangement were present in the overwhelming majority of the basal-cell tumours (in 23 out of a total of 26); it was only in 3 negative cases that the development of new fibres seemed to be scanty or altogether invisible. Again, in our fourth case we saw no fibrous reaction and positive CsTR, while in two cases there was a strong fibrous reaction and negative CsTR. Around spinocellular carcinomas the fibrous reaction was less pronounced, but we saw two exceptions with marked fibrous reaction, one of which was CsTR positive and the other negative. We observed no fibrous reaction in any of the CsTR positive cases of Bowen's disease, keratoacanthoma and senile keratosis, but encountered it in those two cases of keratoacanthoma which had developed into spinocellular carcinoma.

All basal-cell tumours revealed an increased amount of acid mucopolysaccharides; the increase was especially marked in 12 cases. On the other hand, out of 11 cases of spinocellular carcinoma it was only in four that there was some slight metachromasia; two of these cases were CsTR negative. No metachromasia could be demonstrated in any of the CsTR positive cases of keratoacanthoma, keratosis senilis and Bowen's disease. Though in general a parallelism seems to exist between fibrous reaction and the degree of metachromasia. Certain cases deviated from this rule; metachromasia, for example, was fairly marked beneath the carcinoma developing from leukoplakia although connective tissue fibres were neither increased in number nor thickened. Our impression was that in this case the primary phenomenon had really been the increased appearance of mucopolysaccharides and the formation of fibres in consequence. A similar interpretation may apply to the fact that not even traces of acid mucopolysaccharides were present in a case of melanosarcoma that had developed from a blue naevus, although, apart from spindle-shaped pigment cells, the presence of thick, almost homogenized bundles of connective tissue fibres is a characteristic feature of tumours of this type. It is obvious that the growth of collagenous fibres is already accomplished in tumours of the naevus type, while it is a continuous process in the surroundings of malignant epithelial tumours. It is at any rate undeniable that, as regards epithelioma and as yet non-tumorous epithelial hyperplasia, we failed to find a regular correlation between fibrous reaction and accumulation of hyaluronic acid on the one hand and the positivity of the CsTR on the other, however much the three phenomena are in statistical agreement as regards the groups of basal-cell and prickle-cell tumours.

Results concerning mast cells were similar to those described above. While they abounded in the vicinity of basal-cell epitheliomas, especially around the tumour-cell nests, only a few, mostly degenerated mast cells with but slight granulation were seen around spinocellular epitheliomas; the num-

ber of mast cells was, as a rule, proportional to the growth of fibres and the amount of mucopolysaccharides, but sometimes great amount occurred of the latter and no ± or hardly any — mast cells. In CsTR positive cases of Bowen's disease we observed, on the other hand, a great number of mast cells without fibrous reaction or the accumulation of hyaluronic acid.

We tried to establish a correlation between the outcome of the CsTR and the number of mast cells but did not succeed: we found just a few, degenerated mast cells in a negative case of basal cell epithelioma and some more such cells in two cases of CsTR positive spinocellular epithelioma. There were very few mast cells in the other two cases of spinocellular tumour and in those of keratoacanthoma, while a great number of mast cells was present beneath the verrucae seniles, fibromas and pigmented naevi giving a negative CsTR. Therefore the number of mast cells in itself does not seem to determine the result of the CsTR.

Considering the striking difference between the low incidence of negative results in lupus vulgaris and the high incidence of positivity in tuberculosis exulcerativa, we examined these cases histologically. Since they are characterized by the formation of granulation tissue, it is not quite easy to ascertain fibrous reaction. No or hardly any hyaluronic acid was found in either of the conditions; the number of mast cells was equally high in the positive and the negative cases alike, and there was a positive case in which only occasionally was a mast cell to be seen.

As against these partly contradictory findings, we obtained very interesting data in Kaposi's sarcoma. All positive cases revealed a great accumulation of hyaluronic acid, as also numerous mast cells around the abundantly produced thin-walled capillaries. The number of newly-formed capillaries was considerably less and their walls considerably thicker in the CsTR negative cases; metachromasia was rare and occurred only around some thin-walled capillaries; the number of mast cells was very low. We seem therefore justified in concluding to the existence of a direct relation between the outcome of the CsTR and the site and increase of hyaluronic acid; the latter, in their turn, are determined by the number and especially the developmental degree of the tumorously growing capillaries, one of the factors of the variable and complex tissue structure of Kaposi's sarcoma.

Our experimental results have convinced us that the humoral, immunobiological process which manifests itself in the result of the CsTR of the four diseases under review (urticaria pigmentosa, Buschke's scleroedema, circumscribed myxoedema and Kaposi's sarcoma) is in harmony with the histological features. It remains, however, to elucidate a number of details.

Summary

CSABA and TÖRŐ's agar binding reaction (CsTR) has been performed in 201 cases of skin disease; the result was compared to the histologic findings.

1. Of 52 cases of malignant epithelioma, 34 (65.4 per cent) were positive. Grouped according to types the percentage of positive reactions was 84 per cent in cases of basal-cell epithelioma; 34.4 per cent in spinocellular epithelioma; in 3 out of 5 cases of Bowen's disease and of non-differentiated cancers too; in 3 cases each of keratoacanthoma and non-cancerous keratosis senilis; 53 per cent in other kinds of malignant tumours and precarcinomatous conditions; 19.2 per cent in various benign tumours and inflammatory processes, especially ulcerative skin tuberculosis. A high incidence of positivity occurred during corticosteroid therapy; 7 out of 8 pemphigus cases so treated were positive as against 1 out of 5 untreated cases.

2. The incidence of positivity was different between basal-cell and prickle-cell epitheliomas; this may have been due to the more intense stromal reaction, the greater number of mast cells and the accumulation of hyaluronic acid in the first-named group, although histology yielded no clue to the cause of the discrepancy in some cases, and was in many respects contradictory.

3. No correlation was found to exist between the positivity of the reaction, on the one hand, and the malignancy, size, extension and penetration of the tumours, on the other.

4. The results have substantiated the theory on which the reaction is based. In spite of this the CsTR is not suited for diagnosis of malignant skin tumours, and cannot replace clinical diagnostics, as already stated by CSABA and TÖRŐ.

5. The reaction was positive in 11 cases of urticaria pigmentosa, in 2 cases of Buschke's scleroedema adultorum and in 1 case of circumscribed myxoedema. Histological changes in these cases were in agreement with the outcome of the reaction. In Kaposi's sarcoma CsTR positivity might be determined by the increased number of mast cells and the increased amount of hyaluronic acid around the freshly-formed thin-walled capillaries.

REFERENCES

1. ASBOE-HANSEN, G.: (1950) Urticaria Pigmentosa Haemorrhagica. Acta derm.-venereol. (Stockh.) *30*, 159. — 2. ASBOE-HANSEN, G.: (1950) Variability in Hyaluronic Acid Content of Dermal Connective Tissue under Influence of Thyreoid Hormone. Ibidem. *30*, 221. — 3. BALÁZS, A. and HOLMGREN, H.: (1949) Effect of Sulfamucopolysaccharides on Growth of Tumor Tissue. Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.) *72*, 142. — 4. BEARE, M.: (1958) Urticaria Pigmentosa and Allied Disorders. Brit. J. Derm. *70*, 418. — 5. BENSLEY, S. H. (1950): Histological Studies of Reactions of Cells and Intracellular Substances of Loose Connective Tissue to Spreading Factor of Testicular Extracts. Ann. (N. Y.) Acad. Sci. *52*, 983. — 6. BRAUN — FALCO, O.: (1952) Zur Behandlung frischer Keloide mit Hyaluronidase. Derm. Wschr. *125*, 465. — 7. BURKL, W.: (1952) Ueber Mastzellen und ihre Aufgaben. Wien. klin. Wschr. *64*, 411. — 8. CAVALLERO, C. and BRACCINI, C.: (1951) Effect of Cortisone on the Mast Cells of the Rat. Proc. Soc. Exp. Biol. *78*, 141. — 9. CRAMER, W. and SIMPSON, W. L.: (1944) Mast Cells in Experimental Skin Carcinogenesis. Cancer Res. *4*, 601. — 10. CSABA, GY. and TÖRŐ, I.: (1957) Agarkötési reakció mint rákdiagnosztikai eljárás. Orv. Hetil. *98*, 1237. — 11. CSABA, GY. and TÖRŐ, I.: (1958) Új rákdiagnosztikai eljárás: az agarkötési reakció. Orv. Hetil. *99*, 553. — 12. CSABA, GY. and TÖRŐ, I.: (1958) Ein neues Verfahren zur Krebsdiagnose. Die Agar-Bindungsreaktion. Krebsforsch. *62*, 481. — 13. CSABA, GY. and KISS, F. I.: (1958) Az agar-kötési rákdiagnosztikai eljárás állatkísérletekben. Magy. Onkológia. 167. — 14. DEVITT, J. E., SAMUELS, P. B., PIROZYNSKI, W. J. and WEBSTER, D. R.: (1954) Morphology of Tissue Mast Cells. The Frequency of Artifacts and the Influence of Certain Biologic Agents. Amer. Path. *30*, 391. — 15. EHRLICH, P.: (1877) Beiträge zur Kenntnis der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik. Arch. mikr. Anat. *13*, 263. — 16. EHRLICH, P.: (1879) Beiträge zur Kenntnis der granulierten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukocythen. Arch. Anat. Phys. *166*. — 17. FISCHER, A.: cit. Sundberg. — 18. FÖLDVÁRI, F. and NÉKÁM, L.: (1956) Die Rolle des Hyaluronsäure-Hyaluronidase-Gleichgewichtes in der Pathogenese einzelner bullöser Erkrankungen. Arch. klin. exp. Derm. *203*, 433. — 19. FROMME, E.: (1906) Demonstration über das Verhalten der Mastzellen beim Karzinom. Zbl. Gynäk. *30*, 1146. — 20. GLICK, D. and SYLVÉN, B.: (1951) Evidence for the Heparin Nature of the Nonspecific Hyaluronidase Inhibitor in Tissue Extracts and Blood Serum. Science *113*, 388. — 21. GREENSTEIN, J. P.: cit.: Csaba—Törő. — 22. HARDING, D.: (1949) Effect of Heparin on Artificial Activation in the Frog Egg. Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.) *71*, 14. — 23. HEAD, K. W.: (1958) Cutaneous Mast-Cell Tumours in the Dog, Cat and Ox.

Brit. J. Derm. *70*, 389. — 24. HEILBRUNN, L. V. and WILSON, W. L.: (1949) The Effect of Heparin on Cell Division. Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.) *70*, 179. — HIGUCHI, K.: (1930) Die Gewebsmastzellen in der Mamma. Folia haemat. (hpz.) *41*, 401. — 26. HOLMGREN, HJ. and WILANDER, O.: (1937) Beitrag zur Kenntnis der Chemie und Funktion der Ehrlichschen Mastzellen. Z. mikr.-anat. Forsch. *42*, 242. — 27. HOLMGREN, HJ. and WOHLFART, G.: (1949) Mast Cells in Experimental Rat Sarcomas. Cancer Res. *7*, 686. — 28. JANES, J. and MC. DONALD, J.: (1948) Mast Cells: Their Distribution in Various Human Tissues. Arch. Path. (Chicago) *45*, 622. — 29. JORPES, E.: cit. Sundberg. — 30. JORPES, E., HOLMGREN, HJ. and WILANDER, O.: (1937) Über das Vorkommen von Heparin in den Gefässwänden und in den Augen. Z. mikr.-anat. Forsch. *42*, 279. — 31. KONRAD, J. and WINKLER, A. :(1953) Zur Pathogenese der Urticaria pigmentosa im Zusammenhang mit der Mastzellenfunktion. Hautarzt *4*, 119. — 32. KRITCHEVSKY, A.: (1935) Quelques nouvelles données sur la pathogénèse des dermatoses allergiques determinées par les agents physiques. Delib. Congr. Derm. Internat. IX. (Budapest) Vol. I. 240. — 33. LENGYEL, J. and SZEMESI, I.: (1955) Hyaluronsäure-Untersuchungen im Stroma des Plattenepithelkrebses am Gebärmutterhals. Gynaecologia (Basel) *140*, 116. — 34. LENGYEL, J. and VÉRTES, B. :(1953) Adatok a hyaluronsav dermatológiai jelentőségéhez. Orv. Hetil. *94*, 657. — 35. MELCZER, M.: (1954) Beiträge zur Ätiologie und Pathogenese der Urticaria pigmentosa. Derm. Wschr. *129*, 5. — 36. MENEGHINI, C. L.: cit. Paschoud. — 37. PASCHOUD, J. M.: (1954) Experimentelle Untersuchungen zur Heparin-Genese der Urticaria pigmentosa. Dermatologica (Basel) *108*, 361. — 38. QUENSEL, U.: (1933) Studien über die Gewebsmastzellen. Acta path. microbiol. scand. Suppl. 102. — 39. REILLY, E. B., SHINTANI, J. and GOODMAN, J.: (1955) Systemic Mast-Cell Disease with Urticaria Pigmentosa. Arch. Derm. Syph. (Chicago) *71*, 561. — 40. RILEY, J. F. :(1954) The Riddle of the Mast Cells. Lancet *I.*, 841. — 41. RILEY, J. F. and WEST, G. B. :(1953) The Presence of Histamin in Tissue Mast Cells. J. Physiol. *120*, 528. — 42. ROCA DE VINYALS, R.: (1931) Le „Mastzellen" dans le cancer expérimental de la souris blanche. C. R. Soc. Biol. (Paris) *108*, 177. — 43. SCHREUSS, H. T. :(1924) Ueber einen Mastzellen-Tumor bei der weissen Maus nach Teerpinselung. Derm. Z. 40., 9. — 44. SCHWARTZMAN, R. M. and ORKIN, M.: (1958) A Comparative Study of Canine and Human Dermatology. Arch. Derm. Syph. (Chicago) *78*, 630. — 45. STAEMMLER, M.: (1921) Untersuchung über Vorkommen und Bedeutung der histiogenen Mastzellen im menschlichen Körper unter normalen und pathologischen Verhältnissen. Frankfurt. Z. Path. *25*, 391. — 46. SUNDBERG, M.: (1955) On the Mast Cells in the Human Vascular Wall. Acta path. microbiol. scand. Suppl. 107. — 47. SWERDLOW, M.: (1958) Histogenesis of Basal-Cell Carcinoma. Arch. Derm. Syph. (Chicago) *78*, 563. — 48. SYLVÉN, B.: (1945) Acta radiol. (Stockh.) Suppl. 59. Cit. Sundberg. — 49. SZEMESI, I. and LENGYEL, J.: (1957) A stromavédekezés és a hyaluronsav jelentőségének további vizsgálata rosszindulatú daganatokban. Magy. Nőorv. Lapja. *242*. — 50. TWORT, C. C. and TWORT, J. M. :(1930) Classification of Four Thousand Experimental Oil and Tar Skin Tumours of Mice. Lancet *218*, 1331. — 51. VENKEI, T. and SUGÁR, J.: (1958) Krebsartige Proliferation des Keratoakanthoms. Derm. Wschr. *137*, 620. — 52. WEILL, P.: (1919) Mastzellenstudien an Sarkommetastasen. Folia haemat. (hpz.) *23*, 185. — 53. WEST, G. B.: (1958) Pharmacology of the Tissue Mast Cell. Brit. J. Derm. *70*, 409. — 54. WESTPHAL, E.: cit.: Sundberg. — 55. WICHMANN, B. E.: (1955) The Mast Cell Count during the Process of Wound Healing. Acta path. microbiol. scand. Suppl. 108.

ИССЛЕДОВАНИЯ РЕАКЦИИ СВЯЗЫВАНИЯ АГАРА ПРИ КОЖНЫХ БОЛЕЗНЯХ

Э. ЛИБНЕР, ДЬ. ТЕМЕШВАРИ, Ю. ЛЕНДЬЕЛ и Й. АНДЬАЛ

Серологическое и гистологическое исследование 201 кожного больного.

1. Из 52 случаев злокачественного рака кожи 34 давали положительную реакцию (65,4%). При разбивке по отдельным типам: 84% исследованных случаев базоцеллюлярной эпителиомы, 34,4% случаев спиноцеллюлярного рака, 60% случаев болезни Боуэна и недифференцированного рака, как и все случаи кератоакантомы и ракоподобно не перерожденных старческих кератодермий оказались положительными. В группе прочих злокачественных опухолей и предраковых заболеваний положительная реакция получилась в 53% случаев, в группе различных доброкачественных опухолей и воспалительных процессов — в 12,2% случаев, причем в последней группе сравнительно часто при язвенной форме туберкулеза кожи. При лечении кортикостероидами соотношение положительных реакций оказалось также высоким: в 7 из 8 леченных случаев получа-

лась положительная реакция, в то время как она была выявлена в 5 случаях нелеченных больных только в 1 случае.

2. Разницу в соотношении положительности реакций между группами базо- и спиноцеллюлярных кожных раков в общем можно объяснить большей реакцией стромы, размножением тучных клеток и гиалуроновой кислоты, однако, в первой группе, гистологическая картина отдельных случаев во многих отношениях противоречива и не выясняет данных отклонений.

3. Нельзя установить связи между положительностью реакций и злокачественностью, величиной, размером и проникании опухолей.

4. Исследования доказывают правильность теоретической основы реакции. Однако, данный метод все же не оказывается подходящим для практического диагностицирования злокачественных опухолей кожи, и не может заместить клинического диагноза, как это в отношении опухолей кожи также было установлено исследователями *Чаба* и *Тёрё*.

5. В 11 случаях **urticaria pigmentosa**, 2 случаях **scleroedema adultorum Buschke** и 1 случае **myxoedema circumscriptum** получалась 100%-ая положительная реакция. В этих трех картинах болезни тканевые изменения также теоретически находятся в полном согласии с гуморальным процессом, проявляющемся в реакции; при **Sarcoma haemorrhagicum (Kaposi)** кажется, что положительная реакция связана с размножением тучных клеток и гиалуроновой кислоты вокруг новообразованных тонкостенных капилляров.

DIE AGARBINDUNGSREAKTION BEI HAUTKRANKEN

E. LIEBNER, GY. TEMESVÁRY, J. LENGYEL und J. ANGYAL

Bei 201 Hautkranken wurde die Agarbindungsreaktion ausgeführt und auch histologische Untersuchung wurde vorgenommen.

1. 34 von 52 Fällen maligner Epitheliome ergaben eine positive Reaktion (65,4%). Nach Typen geteilt ergaben 84% der basozellulären Epitheliomen, 34,4% der spinozellulären Epitheliomen, 60% der untersuchten Fälle von Bowen-Krankheit und nichtdifferenzierter Krebserkrankungen und alle utersuchten Fälle von Keratoakanthom und nicht krebsartig entartetem Keratosis senilis eine positive Reaktion. In der Gruppe der übrigen malignen Geschwülste und präkanzerösen Erkrankungen wurde eine positive Reaktion bei 53%, in den von gutartigen Geschwülsten und entzündlichen Prozessen bei 19,2% ermittelt, in der letzteren Gruppe besonders ulzerierter Hauttuberkulose. Während der Behandlung mit Kortikosteroiden waren die positiven Reaktionen häufig: 7 von 8 behandelten Pemphigusfällen ergaben eine positive Reaktion, während aus 5 unbehandelten Fällen nur 1 Fall positiv ausfiel.

2. Die häufigere Positivität der basozellulären Epitheliome im Vergleich zu den spinozellulären Epitheliomen kann mit der intensiveren Stromareaktion, der Vermehrung der Mastzellen und der Hyaluronsäure bei den ersteren erklärt werden, doch ist das histologische Bild in vieler Beziehung widersprechend.

3. Zwischen der Positivität der Reaktion und der Bösartigkeit, Ausdehnung, sowie Penetration der Geschwülste konnte kein Zusammenhang festgestellt werden.

4. Die Untersuchungen bestätigen die Richtigkeit der theoretischen Grundlage der Reaktion. Sie scheint jedoch für die Diagnose von malignen Hautgeschwülsten nicht geeignet zu sein und kann die klinische Diagnose nicht ersetzen, wie dies in bezug auf Hautgeschwülste auch von CSABA und TÖRŐ festgestellt wurde.

5. Bei 11 Fällen von Urticaria pigmentosa, 2 von Scleroedema adultorum Buschke und 1 Fall von umschriebenem Myxödem fiel die Reaktion ausnahmslos positiv aus. — Bei diesen drei Krankheitsbildern zeigten auch die Gewebsveränderungen eine Übereinstimmung mit dem in der Reaktion sich manifestierenden humoralen Prozess. Bei Kaposischer Sarkomatose scheint die Positivität der Reaktion mit den in der Umgebung der neugebildeten dünnwandigen Kapillaren sich vermehrenden Mastzellen und der Hyaluronsäure zusammenzuhängen.

Dr. Ernő LIEBNER
Dr. György TEMESVÁRY
Dr. Júlia LENGYEL
Dr. János ANGYAL

Budapest, VIII. Mária u. 41., Hungary

Department of Anatomy, Histology and Embryology (Director: Prof. St. Krompecher) and Department of Tuberculosis (Director: F. Pongor) University Medical School, Debrecen

MUCOPOLYSACCHARIDES IN THE HISTOCHEMISTRY OF CANCER

PRODUCTION OF NEUTRAL MUCOPOLYSACCHARIDES AND THEIR DRAINAGE THROUGH DILATED LYMPHATICS IN MOUSE CANCER C_3H

St. Krompecher and Gy. Berencsi

(Received October 10, 1959)

According to our recent observations (Berencsi and Krompecher [3]), large quantities of what are apparently mucopolysaccharides can be demonstrated by histochemical methods in tuberculous tissue. Fermentation and chemical tests then disclosed in that tissue acid mucopolysaccharides and remarkable amounts of neutral mucopolysaccharides. On the basis of theoretical considerations supported in part by that experimental evidence we believe that the mucopolysaccharides are produced in tissues with altered metabolism, notably in such areas in which oxybiosis is replaced by metabolism involving anaerobic glycolysis. We think namely that in tissues that may suffer more or less marked necrobiosis under given conditions, normal metabolism is not replaced directly by necrobiosis, but various steps follow each other. Oxybiosis is followed first by hypoxia, then anaerobic glycolysis replaces aerobic glycolysis in the catabolism of sugars and it is only then that necrobiosis ensues. Thus large amounts of mucopolysaccharides may be expected to appear in areas where anaerobic glycolysis, the metabolic phase preceding local necrobiosis, prevails. This is why topographically the mucopolysaccharides occur in the area of necrobiosis and in the parts adjacent to it. In our work referred to above we have pointed out that the mucopolysaccharides produced in the tissue focus are drained away through the interspaces, and chiefly through the lymphatics accompanying the blood vessels into the blood stream, elevating the blood level of mucopolysaccharides. Thus in every condition in which the focus produces large quantities of mucopolysaccharides, the blood mucopolysaccharide level is significantly increased. Within certain limits, the blood mucopolysaccharide level reflects the activity of the focus or the foci, because the intensity of inflammation and of necrobiosis will decide the rate and intensity of mucopolysaccharide production by the focus.

The statements concerning tuberculosis should be valid also for cancer. In cancerous tissues namely — depending apparently on its poor blood supply — anaerobic glycolysis becomes predominant and more or less ex-

tensive necrobiosis may occur. One may therefore expect in or around cancerous tissues increased quantities of mucopolysaccharides to be demonstrated by histochemical methods.

* * *

We used the mouse strain C_3H. The sections embedded in paraffine were stained with haematoxylin eosin, according to VAN GIESON and RITTER-OLESON [35] and with toluidine blue. Staining according to RITTER-OLESON consists in the simultaneous application of HALE's stain [11] and the periodic acid-SCHIFF (PAS) stain. To prove that the material staining red with PAS is of carbohydrate nature, we performed the acetylation (blocking) test, and desacetylation with KOH. Prior to staining with PAS the sections were digested *lege artis* in pepsin or trypsin, to rule out that the material was of protein nature; MILLON's test was carried out. The sections were digested with diastase and saliva, to rule out glycogen. To eliminate lipids, the 8-micron sections were soaked 15 minutes in absolute ether, or absolute alcohol and stained with Sudan black. Digestion with BANGA's mucase 213/F3 was also made. As expected, staining according to RITTER-OLESON demonstrated the presence of large amounts of mucopolysaccharides (presumably neutral) in the sections of cancerous tissue. The gland-like structure formed by the tumour usually contained a strongly PAS positive substance in their lumina *(Fig. 1)*. The high-power appearance of the section of mouse cancer C_3H shows clearly that the PAS positive material in the lumina is continuous with the red material appearing in the interspaces of the neoplastic tissue. One has the impression as if the PAS positive substance collecting in the interspaces were flowing toward and accumulating in the lumen *(Fig. 2)*. Some of the gland-like lumina may dilate to a cyst-like cavity *(Fig. 3)*; their contents are strongly PAS positive *(Fig. 4)*. In some areas of the tumour PAS positivity tends to occur in the interspaces and is less marked in the lumina *(Fig. 5)*. At other sites the Prussian blue reaction of HALE [11] preponderates over the PAS positivity presumably indicating the presence of acid-mucopolysaccharides *(Fig. 6)*. In the PAS positive areas or near the PAS positive pools vessels accompanying the small arteries are remarkably dilated and the lymph in them is definitely PAS positive *(Fig. 7)*. This material, however, does not show metachromasia, at least when recently fixed. On the basis of the above this picture may be interpreted as showing that the mucopolysaccharides in the neoplastic focus are carried away in the lymph from the site of their production. As a natural result of this may be considered the well-known observation that in cancer, especially when the tumour is disintegrating, the blood mucopolysaccharide level is significantly elevated [6, 40, 41].

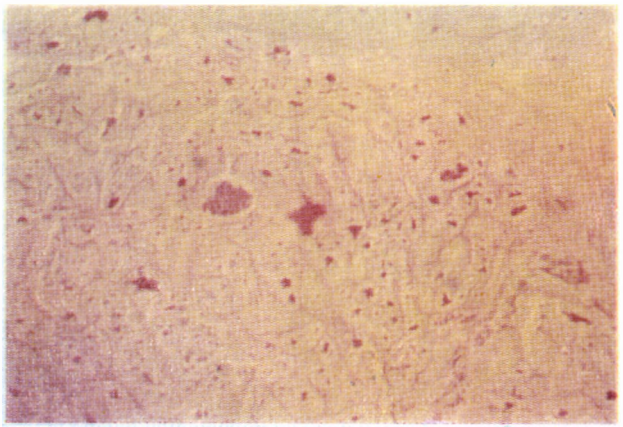


Fig. 1. Red PAS-positive material in the lumen of the cyst-like structure of mouse cancer C_3H

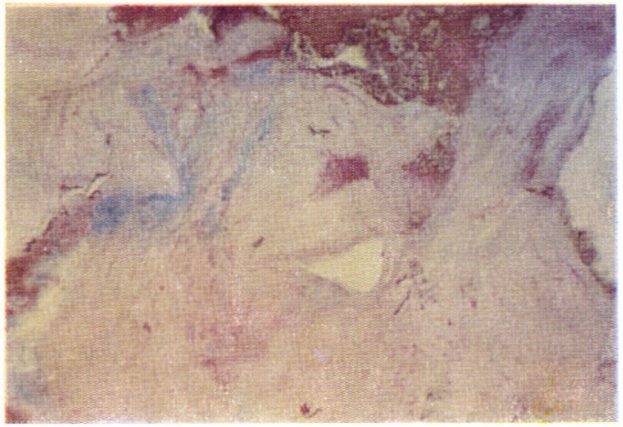


Fig. 2. PAS-positive substance collecting in the tissue interspaces in the direction of the lumenlike centre in regressive areas of mouse cancer C_3H

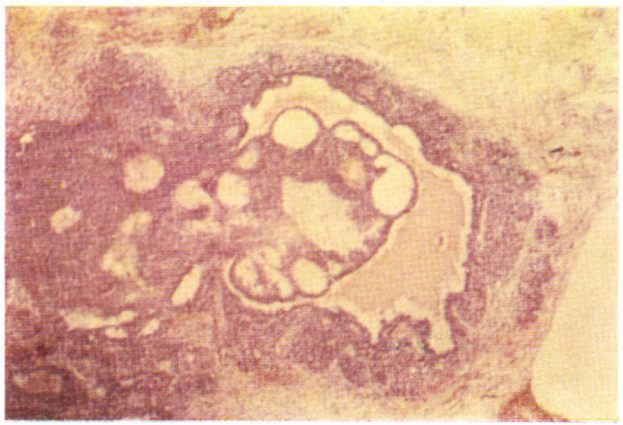


Fig. 3. Colloid-like material staining faintly with haematoxylin-eosin in the cyst-like lumen bordered by gland cells.

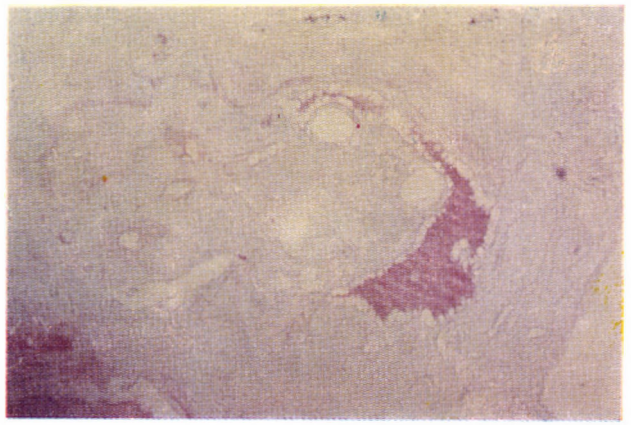


Fig. 4. Marked PAS-positivity of the material in the lumen; section next to that shown in Fig. 3

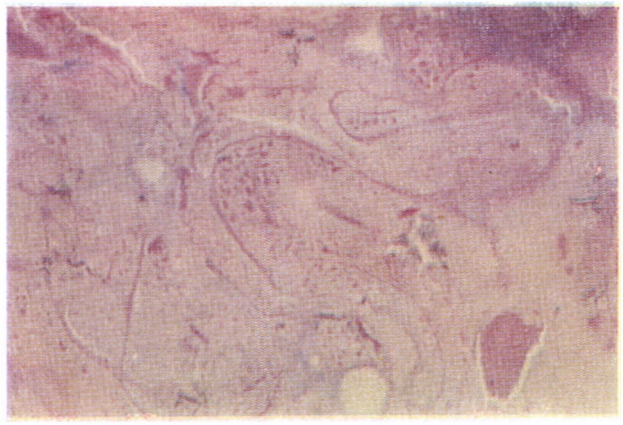


Fig. 5. In the central areas of the tumour that contain no capillaries and show regressive changes, large amounts of PAS-positive material are seen in the interspaces and in the lymph vessels

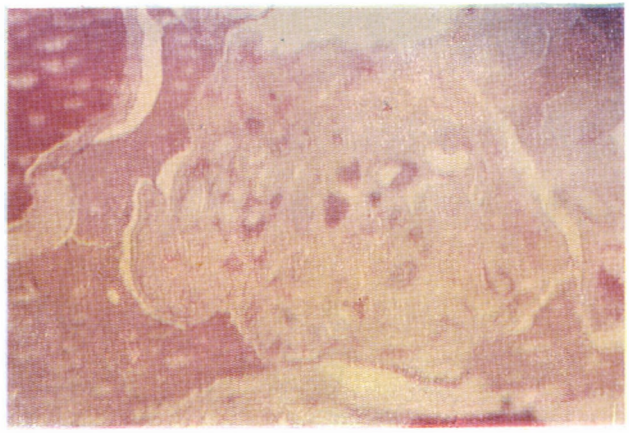


Fig. 6. In some areas blue Hale-positive material collects, instead of the PAS-positive substance

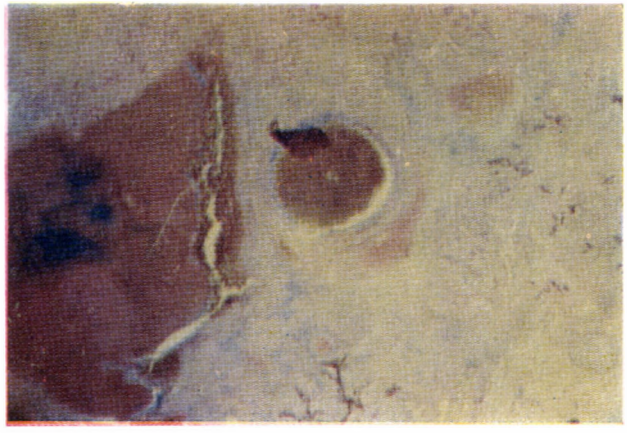


Fig. 7. Dilated lymphatic vessels filled with PAS-positive substance adjacent to the necrotic centre of mouse cancer C_3H

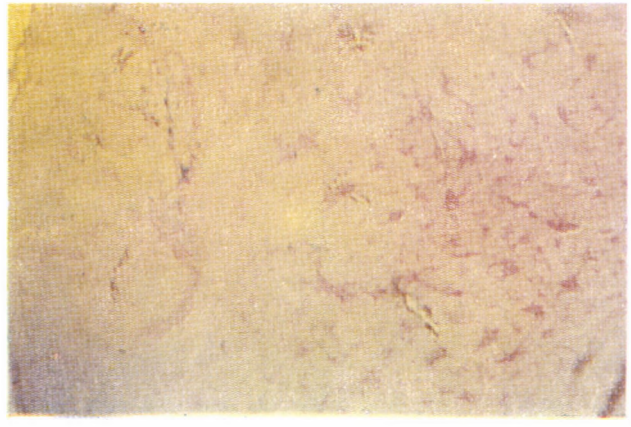


Fig. 8. Small amounts of PAS-positive material in the marginal areas of mouse cancer C_3H, that are relatively well vascularized and do not show regressive changes. More centrally, there is no capillary network, regressive changes are conspicuous and the PAS-positive material is present in large quantities

LENGYEL and SZEMESI [27, 28] have recently reported that in contrast with the surrounding normal tissue the smaller nests of tumour at the periphery of the neoplastic growth are surrounded by metachromatic, in other words acid, mucopolysaccharides. We, too, found no or very little metachromatic material in the centre of the tumour, while we succeeded in demonstrating large quantities of non-metachromatic neutral mucopolysaccharides in the centre of the tumour, as opposed to the marginal areas poor in PAS positive substance, where the capillary supply of the neoplastic tissue is good and thus metabolism is in all probability oxybiotic *(Fig. 8)*.

In this connection we should point out that according to SÜMEGI, GORECZKY and RÓTH [36, 37] in cancerous tissues an "elastic amyloid" would appear that is non-specific in nature and is ultimately a depolymerized glycoprotein. We think the said results lend support to our findings. These are further the observations by MOCHIZUKI [33] concerning the three types of PAS positivity and those reported by Soviet authors, first of all by AVERBAKH [1], who pointed out among others that the breast contains mucoids under physiological conditions, but an accumulation of mucoid occurs especially when there are fast-growing neoplastic foci in the breast. The more fast the malignant tumour grows the more mucoid it contains. AVERBAKH cites LAZOVSKI and others who stated that tissue hypoxia or anoxia would cause the accumulation of mucoids. Mucoids appear in the affected areas also in experimental hypoxia, serous oedema and when venous circulation is impaired. According to LAZOVSKI, mucoids may occur under physiologic conditions in areas poorly or not vascularized, for example in the valves of the heart, in which he thinks there is relative hypoxia. Thus, the appearance of mucoid may be traced back first of all to a disturbance in oxydative processes, to a preponderance of glycolytic processes. This is in harmony with the well-known fact that there is anoxia around tumours and there the glycolitic processes usually preponderate (OKUNIEV, NEUMANN and others [1]).

The presence of mucin-like substances in cancer tissue is not a new discovery. For example, E. KROMPECHER as early as around the turn of the century demonstrated mucoid in the interspaces of basal-cell cancer, eventually also in its cyst-like cavities, as well as in the connective tissue stroma around the cancerous tissue [21, 22, 24]. E. KROMPECHER [21] called this substance pseudomucin, as according to his investigations published in 1903 it showed no metachromasia [21, 22]. We can confirm this but have further developed the statement mad · n ore than half a century ago. The histologists of the turn of the century did not go further than to claim that the mucin in cancer tissue was a degeneration product. Our investigations, aided by improved methods and by a comparison with other evidence, have supplied data concerning the biochemistry of mucopolysaccharide formation and contributed to a better understanding of the problems involved.

Mucin formation may occur also in cancer of the lung; BALÓ [2] described and illustrated impressive cases of HAMPERL's [12] mucin granulomatosis.

Have the mucopolysaccharides arising in neoplastic tissue some influence on the malignancy of the tumour, or in other words, do they influence the relation between the tumour and the host organism? It is imperative to take this possibility into account, as mucin is known significantly to enhance the virulence of various microorganisms (bacteria, viruses [3]). It is therefore quite possible that mucopolysaccharides may increase what E. KROMPECHER [22] called the virulence of tumour cells. Some authors claim that the mucin formed would be a material into which the tumour may grow and along which it may proliferate. Thus, the mucin in the environment of cancer may increase the expansivity of the neoplasm. E. KROMPECHER [22] was also of this view while DELBOT and MENDARO [7], as well as DELBOT and HERRENSCHMIDT [8] are of the opposite opinion. According to them, tumours secreting mucin are relatively benign, as 48 per cent of the patients who had been operated for such tumours were found to be free from recurrence 5 years after operation. LEROUX and PERROT [30] share this view. BERTRAND and NAGY [4] do not consider this mucin production a sign of prognostic value and a similar conclusion has been drawn by FRANTZ [10] from 130 radically operated and histologically studied cases of cancer of the breast.

Thus the problem has not been solved; its clarification is a promising task since the mucopolysaccharide milieu (which according to E. KROMPECHER enhances expansivity), the modification of virulence by mucopolysaccharides (which protect the cancer cells against defensive forces of the host), and the close correlation between mucopolysaccharide production and tissue necrobiosis cannot be independent of the tumour's malignancy, and might therefore be of a prognostic significance. There is every reason to believe that careful studies will ultimately demonstrate the correlation.

We attribute particular significance in the formation of metastases to the disjunction of cancer cells from cancerous tissue, to tissue necrobiosis and to the eventual role of the mucopolysaccharide milieu. As early as 1913 E. KROMPECHER [23] stated: "The detachment of these epithelial cells and their propagation by infiltration actually constitute local metastases, which do not differ in principle from the subsequent formation of secondary deposits in more distant organs". . . "I think that the rapid spread of melanocarcinoma and formation of extensive metastases might be due to an increased rate of detachment of epithelial cells resulting from disintegration caused by pigmentation, which so creates more favourable conditions for the spread of the tumour." KELLNER [14—20] also ascribed great importance to cell disjunction in the cancerous focus and to the necrobiosis promoting it.

It may be asked whether one is justified in claiming the material present

in considerable quantities in mouse cancer C_3H to be neutral mucopolysaccharide. Is this material definable chemically, can it be differentiated from other materials, can we follow its formation, spread and accumulation? Can we detect its presence in the various stages of embryonic, postembryonic life, or in different pathological conditions? Recently we have succeeded in establishing some facts concerning the nature of the material we call neutral polysaccharide, as in our studies of embryonic and postembryonic cartilage breakdown, regenerative and neodifferentiative cartilage formation [9], exsudative pulmonary tuberculosis [3], crural ulcer [26], as well as mouse cancer C_3H. They are as follows.

1. The material in question is PAS positive, *i. e.* it stains red by the periodic acid-Schiff method. By the RITTER-OLESON technique it stains red, while the acid mucopolysaccharides stain blue.

2. The red staining does not appear after blocking by acetylation, and reappears when desacetylation is effected by treatment with KOH.

3. The PAS positivity is not lost after previous digestion with pepsin or trypsin.

4. The same applies to pretreatment with lipid solvents.

5. The PAS positive areas give a weak Millon reaction, and

6. are lightly stained by Sudan black.

7. The material supposed to be neutral mucopolysaccharide shows no metachromasia to toluidine blue, as opposed to the acid mucopolysaccharides which stain purple with that dye. For example, the material presumed to be heparin, that can be found in the mast cells of the skin over the mouse cancer, stains red.

8. On biochemical identification the material in question was dissolved in a few hours by mucase 213/F3, at pH 7.4, 37° C, in a n/40 veronal acetate buffer solution. During the same period the buffer system not containing mucase caused no change in staining. This means that the phenomenon is a true mucase effect.

9. As to the biological or pathological characteristics, it may be stated that the material is produced when tissues are disintegrating.

Large quantities of the material are formed in disintegrating exsudative caseous pulmonary tuberculosis [3], in the areas of the mouse cancer C_3H that show regression or disintegration, as well as in crural ulcers [26]. Thus, the material is produced where tissues are broken down or disintegrating, under both physiological and pathological conditions (cartilage [25], connective tissue, lung tissue, cancer).

If we look for the cause of tissue disintegration, local vascular changes and the hypoxia will feature prominently, both in the neodifferentiative cartilage formation, and in the three pathological conditions (tuberculosis, cancer, crural ulcer) examined.

As to physical characteristics, the material in question is highly viscous and liquid.

From the pathophysiological point of view it seems to be characteristic that the material formed in large quantities at the site of tissue disintegration is drained off through the lymphatics, which thus become dilated. This is apparently of significance in paving the way for the formation of metastases. The PAS positive substance can be demonstrated in both the cross and longitudinal sections of the lymphatics.

It is known from the literature, WINTZLER [40], WOLSTENHOLME and O'CONNOR [41] that in grave pulmonary tuberculosis, in cancer and other conditions the blood mucopolysaccharide level is significantly increased to 1.5 or even 2.5 times the normal, which is around 83 $\pm$ 4 mg per 100 ml. expressed in hexosamine.

The elevation of the serum mucopolysaccharide level in pulmonary tuberculosis to 1.5—2 times the normal level has been confirmed by EVA H. OLÁH, biochemist, in 70 determinations made in 45 subjects. She worked at the Institute of Anatomy, Histology and Embryology of the University Medical School of Debrecen, in cooperation with the Department of Tuberculosis.

As opposed to these positive data, we do not know the exact chemical structure of neutral mucopolysaccharides. It is not known whether the mucopolysaccharides found in the blood in cases of cancer, tuberculosis and similar conditions differ in structure, or in the glucosamine : galactosamine ratio. Still, the material may rather reliably be characterized on the basis of its histochemical (PAS positivity, negative metachromasia, acetylation, Millon reaction, Sudan staining, lipid solvents), biochemical (dissolution in mucase, pepsin, trypsin digestion), and pathological properties (occurrence at the site of tissue decomposition) as well as by the fact that its drainage through the lymphatics and accumulation in the blood can be followed up.

We have also studied the vascularization of mouse cancer C_3H. As it is shown by *Fig. 8*, the marginal, actively growing area of the tumour is satisfactorily vascularized. In that area there is hardly any, or no evidence of regressive tissue changes, neutral mucopolysaccharide production, or disjunction of cells. In contrast with this, in more central areas of the tumour vascularization is scarce or absent. Here the cells show regressive changes and neutral mucopolysaccharides are formed in large amounts. There are then the necrotic areas, in which blood vessels do not occur at all. We cannot speak of vascularization in such areas, though haemorrhages with haemosiderin formation originating from arroded blood vessels may occur. Thus, in a cancerous tumour we may distinguish between three zones, *viz.* (i) a PAS negative zone, with a relatively good blood supply and without tissue disintegration; (ii)

a PAS positive zone showing tissue regression, with a relatively poor vascular supply; and (iii) a zone of necrosis, without vascularization.

Considering the above, tissue hypoxybiosis is probably responsible for the formation of mucopolysaccharides in cancer tissue. In hypoxybiosis anaerobic glycolysis gains preponderance. This phenomenon might be part of some function which, perhaps as an atavistic trait of metabolism, takes effect in every instance of deficient oxygen supply. In other words, the living tissue tries to adapt itself to the lack of oxygen by breaking down sugar by the anaerobic mechanism. In this case the described production of mucopolysaccharides is a result of tissue adaptation, and plays a role in every condition in which adaptation to a deficiency in oxygen is involved. According to WEINHOUSE [39] cancer tissue and cancer cells possess a high aerobic and anaerobic glycolytic activity. For example, in the presence of oxygen cancer tissue can break down several times the amount of sugar broken down by resting or growing normal tissues. The more deficient the oxygen, the less marked the difference between cancerous and normal tissue, and under anaerobic conditions the difference is not more than ¼ to 3.5. According to WARBURG [38], the anaerobic glycolysis of cancerous tissue is characteristic of malignancy. We believe that a poor or absent vascular supply creates the conditions (hypoxybiosis, anoxybiosis), which cause cancerous tissue to adapt itself to the new milieu and switch over to anaerobic glycolysis, as a result of which mucopolysaccharide production is begun. Thus, the anaerobic glycolysis of cancer tissue is not just one characteristic property, but it is the result of a general biological law, of the adaptation to hypoxia. The described production of mucopolysaccharides may be interpreted in this way.

LE PAGE [29], as well as NOVIKOFF, POTTER and LE PAGE [34] have arrived at the conclusion that in tumours anaerobic glycolysis is based on the known EMBDEN—MAYERHOF scheme, *i. e.* it is not different from that in normal tissue. MEYERHOF et al. [31, 32] essentially confirmed that there is no qualitative difference in lactic acid formation between normal and tumour cells. WEINHOUSE [39] postulated that there is no evidence at present to show that glucose would be broken down to lactic acid in tumour tissue by a mechanism different from that in normal tissue. According to BURK [5], there is no difference in oxygen consumption between the cancerous liver cell and embryonic, aged, regenerating or cirrhotic liver cells. And if there is no difference in the mechanism of lactic acid fermentation between cancer and normal cells, why should there be a difference in the factors eliciting it?

Volumes have been filled with metabolic studies in cancer research and a number of valuable data have been published, yet we have very little exact knowledge as to the essence of the pathology of cancer.

According to WEINHOUSE [39], we should know the factors controlling and regulating cell metabolism in order to understand the excessive rate of

glycolysis in neoplastic tissue. He deems it unfortunate that we know so little about such factors. In this connection we call attention to the metabolism and vascular pauperisation of cancer tissue, as well as to the hypoxydosis resulting from them. Let it finally mention that in addition to the above we have succeeded in demonstrating the formation of mucopolysaccharides in human gastric and pulmonary cancer, as well as in tar cancer of the rabbit ear.

Summary

Sections of mouse cancer C_3H were treated by RITTER-OLESON's histochemical method demonstrating simultaneously the neutral mucopolysaccharides (by the periodic acid—SCHIFF reaction) and the acid mucopolysaccharides (by HALE's method). A material supposed to be neutral mucopolysaccharide has thus been demonstrated in considerable quantities. In the marginal areas of cancer tissue, which have a relatively good vascular supply and growing, no neutral mucopolysaccharide formation was demonstrable. In contrast with this, in areas with poor vascular supply, lying centrally and thus supplied poorly by diffusion, increased neutral mucopolysaccharide formation was observed. In the necrotic central parts of large tumours were the greatest quantities of neutral mucopolysaccharide found. It is concluded that the mucopolysaccharides are produced in the hypoxybiotic phase of the adaptive metabolic changes of cancer tissue (oxybiosis, hypoxybiosis, anoxybiosis, necrobiosis), when anaerobic glycolysis gains preponderance. In the relatively well vascularized areas of cancer tissue acid mucopolysaccharides, in the poorly supplied areas neutral mucopolysaccharides are formed. These neutral mucopolysaccharides arise when tissues are decomposing, disintegrating, as in the tuberculous foci. From their site of production the neutral mucopolysaccharides are drained away through the tissue interspaces and lymphatics into the blood stream (preparing apparently the way for the formation of metastases); this explains the well-known observation that in cancer the blood mucopolysaccharide level is significantly increased, roughly in proportion to malignancy and necrobiosis. Thus, in cancer and tuberculosis the neutral mucopolysaccharides are not deposited from the blood into the affected tissues. On the contrary, they are produced in the tissues with anaerobic glycolytic metabolism and are carried away by the lymph into the blood stream. The mucopolysaccharides formed in cancer tissue may influence the relation of the cancer tissue to the host organism and modify the expansivity of cancer and the formation of metastases.

REFERENCES

1. Авербах М. М. (1956): Значение мукоидних веществ в строении молочных желез и их новообразовании (The Significance of Mucoid Substances in the Structure of the Mammary Gland and its Neoplasms). Арх. пат. Москва, *18*, 74. — 2. BALÓ, J. (1957): Lungencarcinom und Lungenadenom. Akadémiai Kiadó, Budapest. — 3. BERENCSI, G. and KROMPECHER, ST. (1958): Mukopolysaccharidák a tbc szöveti pathomechanizmusában (Mucopolysaccharides in the Tissular Pathomechanism of Tuberculosis). Tuberkulózis (In the press). — 4. BERTRAND, J. et NAGY, A. (1931): Recherches sur quelques tests concernant le prognostic histologique des cancers du sein. Presse méd. *39*, 991. — 5. BURK, D. (1942): A Symposium on Respiratory Enzymes. Madison University Press, Wisconsin. — 6. CSABA, GY. and TÖRŐ, I. (1958): Új rákdiagnosztikai eljárás: az agarkötési reakció. (New Method for the Diagnosis of Cancer: the Agar-binding Reaction). Orv. Hetil. *99*, 553. — 7. DELBOT, P. et MENDARO, N. (1927): Les cancers du sein. Masson, Paris. — 8. DELBOT, P. et HERRENSCHMIDT, P. (1926): Les cancers du sein. Alcan, Paris. — 9. FÖLDES, I., MÉSZÁROS, L., BOT, GY. (1958): Effect of Glucose-1-Phosphate on Callus formation. Acta morph. hung. *8*, 203. — 10. FRANTZ, V. (1938): Prognostic Significance of Intracellular Mucicarminophilic Material in Carcinoma of the Female Breast. Arch. Path. (Chicago) *26*, 585. — 11. HALE, C. W. (1946): Histochemical Demonstration of Acid Polysaccharides in Animal Tissues. Nature (London), *157*, 802. — 12. HAMPERL, H. (1932): Über Schleimgranulome und granuläre Erosionen in den Speicheldrüsen und der Magenschleimhaut. Beitr. path. Anat. *88*, 193. — 13. HOTCHKISS, R. D. (1948): Microchemical

Reaction Resulting in Staining of Polysaccharide Structures in Fixed Tissue Preparations. Arch. Biochem. *16*, 131. — 14. KELLNER, B. (1938): A rákos áttételek diagnosztizálása a primaer daganat szövettani vizsgálata alapján. (Diagnosis of Cancerous Metastases from the Histology of the Primary Tumour) Gyógyászat, *78*, 569. — 15. KELLNER, B. (1939): Die Fettmorphologie der Carcinome mit besonderer Rücksicht auf die Disjunktion der Geschwulstzellen. Z. Krebsforsch. *49*, 633. — 16. KELLNER, B. (1940): Das periphärische Wachstum der Carcinome. Z. Krebsforsch. *50*, 299. — 17. KELLNER, B. (1940): Die Diagnose der Krebsmetastasen auf Grund des histologischen Befundes der Primärgeschwulst. Z. Krebsforsch. *51*, 36. — 18. KELLNER, B. and DÉNES, J. (1953): A rák terjedésére vonatkozó vizsgálatok II. A progressio meghatározása a primaer tumor szöveti vizsgálata útján (Investigations on the Progression of Cancer. Determination of Progression by the Histological Evidence of the Primary Tumour). MTA Orv. Tud. Oszt. Közl. *4*, 1. — 19. KELLNER, B. (1954): A metastasisképzés pathológiája. (Pathology of Metastasing). Magy. Radiol. *6*, 137. — 20. KELLNER, B. (1956): Significance of Pericancerous Metastases in Forming Opinion on Lymphogenous Progression. Acta Union. internat. c. Cancr. Louvain, *12*, 1. — 21. KROMPECHER, E. (1903): Der Basalzellenkrebs. Fischer, Jena. — 22. KROMPECHER, E. (1912): Zur Histogenese und Histologie des Krebses. Z. Krebsforsch. *12*, 1. — 23. KROMPECHER, E. (1914): A rák kóroktanáról és morphologiájáról. (Aetiology and Morphology of Cancer). Orvosképzés *2*, 11. — 24. KROMPECHER, E. (1925): Über Gesetzmässigkeiten in Aufbau der Krebse. Z. Krebsforsch. *22*, 410. — 25. KROMPECHER, ST. (1958): Die qualitative Adaptation der Gewebe. Z. mikr. anat. Forsch. *64*, 59. — 26. KROMPECHER, ST. (1959): Anaerob glycolysises szöveti anyagcsere és mucopolysaccharida-képződés ulcus cruris esetén. (Anaerobic Glycolytic Tissue Metabolism and Formation of Mucopolysaccharides in Crural ulcers). Bőrgyógy. vener. Szle., *35*, 214. — 27. LENGYEL, J. and SZEMESI, I.(1954):Hyaluronsav vizsgálatok a méhnyak laphámrákjának stromájában. (Hyaluronic Acid in the Stroma of the Epithelial Cancer of the Uterine Cervix). Magy. Nőorv. Lapja, *1*, 242. — 28. LENGYEL, J. and SZEMESI, I. (1957): Stroma védekezés és hyaluronsav jelentőségének további vizsgálata rosszindulatú daganatokban. (Further Studies on the Significance of Hyaluronic Acid and of the Defensive Role of Stroma in Malignant Tumours) Magy. nőorv. Lapja, *1*, 242. — 29. LE PAGE, G. A. (1948): Glycolysis in Tumor Homogenates. J. biol. Chem. *176*, 1009. — 30. LEROUX, R. et PARROT, M. (1930): Prognostic histologique des cancers du sein. Bull. Ass. franc. Cancer, *19*, 439. — 31. MEYERHOF, O. and GELIAZKOVA, N. (1947): Rate of Anaerobic Glycolysis of Various Hexoses in Mammalian Tissues. Arch. Biochem. *12*, 405. — 32. MEYERHOF, O. and WILSON, J. R. (1949): Studies on Enzymatic System of Tumor Glycolysis; Comparative Study of Rat and Mouse Tumor Homogenates. Arch. Biochem. *21*, 22. — 33. MOCHIZUKI, N. (1957): Histochemical Study on the Polysaccharides of Cancer Tissue. Keio J. Med. (Tokyo), *6*, 59. — 34. NOVIKOFF, A. B., POTTER, V. R. and LE PAGE, G. (1948): Phosphorylated Intermediates in Tumor Glycolysis; Glycolysis in Tumor Homogenates. Cancer Res. *8*, 203. — 35. RITTER, H. B. and OLESON, J. J. (1950): Combined Histochemical Staining of Acid Polysaccharides and 1,2 glycol Groupings in Paraffin Sections of Rat Tissues. Amer. J. Path. *26*, 639. — 36. SÜMEGI, I., GORECZKY, L. and RÓTH, I. (1954): Recent Studies on the Amyloid in Malignant Tumours. Acta morph. hung. *4*, 463. — 37. SÜMEGI, I., GORECZKY, L. and RÓTH, I. (1954): Újabb vizsgálatok a rosszindulatú daganatban előforduló amyloidról. (Recent Studies on the Amyloid in Malignant Tumours.) Kísérl. Orvostud. *6*, 350. — 38. WARBURG, O. (1926): Stoffwechsel der Tumoren. Springer, Berlin. — 39. WEINHOUSE, S. (1955): Oxidative Metabolism of Neoplastic Tissues. Advanc. Cancer Res. *3*, 269. — 40. WINZLER, R. J., GLICK, D. (1955): Methods of Biochemical Analysis. Ed. 2. Interscience. New York. — 41. WOLSTENHOLME, G. E. W. and O'CONNOR, M. (1958): Ciba-Foundation Symposium on the Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides. Churchill, London.

МУКОПОЛИСАХАРИДЫ В ГИСТОХИМИИ РАКОВОЙ ТКАНИ

И. КРОМПЕХЕР и ДЬ. БЕРЕНЧИ

Симультанно были выявлены на срезах C_3H рака мышей с помощью гистохимического метода *Риттер—Олесона* нейтральные и кислые мукополисахариды, причем авторы в значительном количестве обнаружили вещество, предположительно соответствующее нейтральным мукополисахаридам. Образования нейтральных мукополисахаридов не наблюдалось в снабженных сосудами растущих краевых частях рака, однако, в плохо снабженных сосудами или же центрально расположенных и следовательно также и путем диффузии плохо снабженных частях наблюдалось все большее и большего раз-

мера образование нейтральных мукополисахаридов. В центральной части более больших опухолей наблюдаются некрозы; в области некрозов образование нейтральных мукополисахаридов больше всего. Предполагается, что мукополисахариды образуются в сильно гипоксибиозной фазе возникающих в раковой ткани изменений обмена веществ адаптационного характера — оксибиоз, гипоксибиоз, аноксибиоз, некробиоз, — а именно тогда, когда обмен веществ тканей изменяется таким образом, что расщепление сахара происходит путем анаэробного гликолиза. В сравнительно лучше снабженных краевых частях раковой опухоли образуются кислые, а в выраженно плохо снабженных частях — нейтральные мукополисахариды. Эти нейтральные мукополисахариды возникают при расщеплении, при распаде тканей, подобно процессам, имеющим место в туберкулезных тканевых очагах. Возникающие в значительном количестве нейтральные мукополисахариды попадают с места их производства через межтканевые щели и расширенные лимфатические сосуды в кровяное русло. Этим объясняется общеизвестное наблюдение, что в раковой опухоли содержание мукополисахаридов в крови значительно повышается, и что оно до известной степени пропорционально злокачественности и некробиозу. Значит, как в случае рака, так и туберкулеза, нейтральные мукополисахариды не отлагаются из крови в патологическую ткань, а они производятся в тканях с гипоксибиозным обменом веществ и анаэробным гликолизом, откуда они через лимфатические пути попадают в кровяное русло. Быть может, что вышеописанные мукополисахариды воздействуют также и на отношение между раковой тканью и организмом хозяина, модифицируя распространение раковой ткани и метастазирование.

MUCOPOLYSACCHARIDE IM KREBSGEWEBE

I. KROMPECHER und G. BERENCSI

An C_3H Mäusekrebsschnitten wurden mit der histochemischen Methode von RITTER-OLESON die neutralen und sauren Mucopolysaccharide simultan nachgewiesen, wobei ein vermutlich den neutralen Mucopolysacchariden entsprechender Stoff in bedeutender Menge gefunden wurde. Die Bildung neutraler Mucopolysaccharide konnte an den vaskulär gut versorgten und wachsenden Randteilen des Tumors nicht wahrgenommen werden. Dagegen war in den vaskulär schlecht versorgten, bzw. zentral gelegenen und infolgedessen auch durch Diffusion schlecht versorgten Teilen die Bildung von immer mehr neutralen Mucopolysacchariden zu beobachten. Der zentrale Teil von grösseren Geschwülsten enthält Nekrosen; im Umkreis derselben ist die Bildung von neutralen Mucopolysacchariden am grössten. Wahrscheinlich entstehen die Mucopolysaccharide in der stark hypoxybiotischen Phase der im Krebswege entstehenden Stoffwechselveränderungen adaptiven Charakters — Oxybiose, Hypoxybiose, Anoxybiose, Nekrobiose — und zwar dann, wenn der Stoffwechsel der Gewebe sich in der Weise verändert, dass der Zuckerabbau durch anaerobe Glykolyse erfolgt.

In den noch verhältnismässig gut ernährten Randteilen der Krebsgeschwulst entstehen saure, in den ausgesprochen schlecht ernährten Teilen neutrale Mucopolysaccharide. Diese letzteren entstehen beim Abbau, beim Zerfall der Gewebe, ähnlich wie in den tuberkulösen Herden. Die in bedeutender Menge produzierten neutralen Mucopolysaccharide gelangen vom Ort ihrer Entstehung durch die Gewebsspalten und durch die erweiterten Lymphgefässe in die Blutbahn. Hierdurch erklärt sich die allbekannte Beobachtung, wonach in der Krebsgeschwulst sich der Gehalt an Mucopolysacchariden im Blut bedeutend erhöht und bis zu einem gewissen Grad proportional zur Bösartigkeit und zur Nekrobiose ist. Demnach werden sowohl bei Krebs, wie auch bei Tuberkulose die neutralen Mucopolysaccharide nicht aus dem Blut in das pathologische Gewebe abgelagert, vielmehr erfolgt ihre Produktion in den Geweben mit hypoxybiotischen Stoffwechsel und anaerober Glykolyse, von wo sie durch die Lymphbahn in den Blutstrom gelangen. Es ist nicht ausgeschlossen, dass die beschriebenen Mucopolysaccharide auch auf das Verhältnis zwischen Krebsgewebe und Wirtsorganismus eine Wirkung ausüben, und somit die Expansivität des Krebsgewebes und die Metastasenbildung modifizieren.

Prof. Dr. Stefan KROMPECHER Debrecen, 12. Anatómia
Dr. György BERENCSI Debrecen, Dept. of TBC. } Hungary

Department of Pathological Anatomy (Director: Prof P. ENDES) of the University Medical School, Debrecen, and Department of Anatomy (Director: Prof. J. SZENTÁGOTHAI) of the University Medical School, Pécs

THE GRANULATED CELLS OF THE JUXTAGLOMERULAR APPARATUS IN EXPERIMENTAL LESIONS OF THE HYPOPHYSEAL STALK AND OF THE HYPOTHALAMUS

(A preliminary report)

P. ENDES, I. DÉVÉNYI, B. HALÁSZ and SZ. GOMBA

(Received January 19, 1960)

Of the authors who have studied the granulated cells of the juxtaglomerular apparatus (JGC) pressure of space does not permit us to mention more than a few. GOORMAGHTIGH [1, 2], for example, suggests that these cells originate from the smooth muscle cells of the afferent arterioles and regards the granules in their cytoplasm as the secretion of the cells, a vasopressor substance, probably renin. HARTROFT and HARTROFT [3, 4, 5] found an increase in the granules of the JGC to be accompanied by hypertrophy of the zona glomerulosa, and a degranulation of the JGC to be associated with the atrophy of the said zone; they suggested that this parallelism was really due to changes in the blood sodium level inasmuch as a salt-deficient diet induces hypergranulation and a salt-rich diet degranulation. As regards the correlation between the number of granules in the JGC and other endocrine organs, it has been shown by HARTROFT that hypophysectomy does not significantly affect the degree of granulation. Inducing lesions of the hypophyseal stalk and the tuber cinereum, we studied their effect upon the granulation of the JGC.

Methods

Eighteen rats of the Wistar strain, kept under standard conditions, were used in the experiments. (The cause why we have examined up till now such a small number of animals lies in the lengthiness and laboriousness of the computations.)

Injury of the pituitary stalk and the hypothalamus was placed by means of a Horsley-Clark stereotactic apparatus modified by Szentágothai. Site and extent of the lesions were checked post mortem microscopically.

The rats were divided into 2 groups of 9 animals each. The rats in Series I were sacrificed 9 days, those in Series II 24 days, after inflicting the lesion.

Four sections in the largest horizontal plane of each kidney of each rat, an average of 850 glomeruli per animal, were examined with a magnification of 650. The mean for the four sections was regarded as the index of each individual animal.

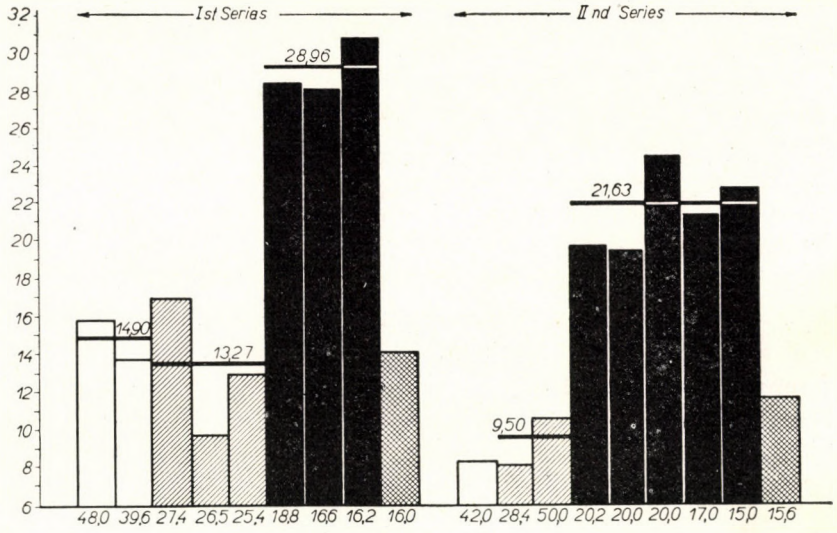
For staining, Endes' trichrome (6) dye was used, by which the granules stain electively a dark violet. Apart from a percentual assessment of the number of granulated cell groups, HARTROFT's method was used with some modifications to estimate the degree of granulation; complexes with a value of 1, 2, 4 resp. 8 were distinguished. The percentual value yielded by this semiquantitative method represented the so-called JGC index.

Results

In Series I, 2 control animals had an average index of 14.90. In 3 animals with partial infundibular lesion the average index was 13.27. In 4 animals the lesion embraced the whole pituitary stalk; at its site a crater had developed. Three of these animals displayed a high index, averaging 28.96, while in the fourth the index was as low as 9.85.

In Series II the one control had an index of 8.26. Infundibular lesion was unsuccessful in 2 animals; their index was 9.50. The average index for 5 of the successfully lesioned 6 animals was 21.63. In the sixth successfully lesioned animal the index was 12.58 (Table I).

Table I.



Control. Partial lesion of the pituitary stalk
Total lesion of the pituitary stalk
No JGC effect in spite of total infundibular lesion. The JGC index is indicated along the vertical axis; the thick line across each group of columns and the number indicate the average index of the group. Weight of the adrenals is given in mg below the columns

The 3 control animals of the two series, as also those 5 animals in which we had failed to injure the whole of the pituitary stalk, so that they may to some extent likewise be regarded as controls, displayed a low index, the range of which was comparable to that for our normal stock of Wistar rats.

The difference between the positive cases of Series I and Series II must have been due to the different survival times: in Series I there was less time for the changes to develop.

Every significant rise in the JGC index was accompanied by a considerable decrease in the weight of the suprarenal glands, to 20 mg, sometimes even less.

The hypothalamus, the pituitary, adrenal and thyroid glands and the gonads were all reduced in weight and exhibited atrophy and histological signs of hypofunction. In animals with a lesion extending to the whole infundibulum, the atrophy and lipoid depletion of the fasciculate and reticular zones showed a striking contrast to the broadened and sudanophilic zona glomerulosa. We cannot go beyond mere conjectures in respect of those two test animals which gave a negative response to the successful lesion. The injury of some hypothalamic structure may have prevented in these cases a hypergranulation of the cells of the juxtaglomerular apparatus.

Discussion

According to the literature, adrenalectomy or a salt-deficient diet is followed by a significant rise of the JGC index. Several authors observed a broadening of the zona glomerulosa in animals kept on a salt-deficient diet, and regarded the abnormally low blood sodium level as the primary factor. Having performed no chemical analyses, we cannot tell whether hyponatraemia did or did not occur in our animals; the observed hypergranulation of the JGC seems to point to an increased loss of sodium as the fundamental alteration, an assumption well in harmony with the histological picture of the adrenal cortex. We attribute the high index as well as the hypertrophy of the zona glomerulosa to the infundibular lesion. This might have influenced the zona glomerulosa directly and been the indirect cause of the hyperplasia and hypergranulation of the JGC. It is, however, possible that the two effects were independent of each other. Our experimental results point to the possibility of a hypothalamic regulation of the zona glomerulosa and the juxtaglomerular apparatus.

Summary

In the kidney of rats with infundibular and tuberal lesion hyperplasia and hypergranulation of the juxtaglomerular cells were observed with atrophy of the adrenals accompanied by a broadening of and lipoid accumulation in the zona glomerulosa. The two changes went parallel and were presumably induced by the lesion of the hypophyseal-hypothalamic system.

REFERENCES

1. GOORMAGHTIGH, N. (1939): Existence of an Endocrine Gland in the Media of the Renal Arterioles. Proc. Soc. exp. Biol. and Med. (N. Y.) *42*, 688. — 2. GOORMAGHTIGH, N. (1949): Démonstration des cellules endocrines de la paroi artériolaire du rein ischémique. Belg. Nederl. Cyto-embryol. Dagen, Gent p. 11. — 3. HARTROFT, PH. M.—HARTROFT, W. S, (1953): Studies on Renal Juxtaglomerular Cells. I. J. exp. Med. *97*, 415. — 4. HARTROFT, PH. M.—HARTROFT, W. S. (1955): Studies on Renal Juxtaglomerular Cells II. J. exp. Med. *102*, 205. — 5. PITCOCK, J. A.—HARTROFT, PH. M. (1958): The Juxtaglomerular Cells in Man. Amer. J. Path. *34*, 863. — 6. ENDES, P. (1954): Kombinált trichrom festés (Combined Trichrome Staining). Kísérl. Orvostud. *6*, 479.

Prof. Pongrác ENDES
Dr István DÉVÉNYI
Dr Szabolcs GOMBA
Debrecen, 12., Kórbonctan, Hungary

Dr Béla HALÁSZ
Pécs, Dischka Gy. u. 5., Hungary

A kiadásért felel az Akadémiai Kiadó igazgatója Műszaki szerkesztő: Farkas Sándor

A kézirat nyomdába érkezett: 1960. III. 2. — Terjedelem: 12,50 (A/5) ív, 83 ábra (35 színes), 11 melléklet

1960.50942 — Akadémiai Nyomda, Budapest — Felelős vezető: Bernáth György

The Acta Morphologica publish papers on experimental medical subjects in English German, French and Russian.

The Acta Morphologica appear in parts of varying size, making up volumes.

Manuscripts should be addressed to:

Acta Morphologica Budapest IX., Tűzoltó u. 58.

Correspondence with the editors and publishers should be sent to the same address.

The rate of subscription to the Acta Morphologica is 110 forint a volume. Orders may be placed with »Kultura« Foreign Trade Company for Books and Newspapers (Budapest VI. Népköztársaság útja 21. Account No. 43-790-057-181) or with representatives abroad.

Les Acta Morphologica paraissent en français, allemand, anglais et russe et publient des travaux du domaine des sciences médicales expérimentales.

Les Acta Morphologica sont publiés sous forme de fascicules qui seront réunis en volumes.

On est prié d'envoyer les manuscrits à l'adresse suivante:

Acta Morphologica, Budapest IX., Tűzoltó u. 58.

Toute correspondance doit être envoyée à cette même adresse.

Le prix de l'abonnement est de 110 forints par volume.

On peut s'abonner à l'Entreprise du Commerce Extérieur de Livres et Journaux «Kultura» (Budapest, VI., Népköztársaság útja 21. Compte-courant No. 43-790-057-181) ou à l'étranger chez tous les représentants ou dépositaires.

«Acta Morphologica» публикуют трактаты из области экспериментальных медицинских наук на русском, немецком, английском и французском языках.

«Acta Morphologica» выходят отдельными выпусками разного объема. Несколько выпусков составляют один том.

Предназначенные для публикации авторские рукописи следует направлять по адресу:

Acta Morphologica, Budapest IX., Tűzoltó u. 58.

По этому же адресу направлять всякую корреспонденцию для редакции и администрации.

Подписная цена «Acta Morphologica» — 110 форинтов за том. Заказы принимает предприятие по внешней торговле книг и газет «Kultura» (Budapest VI., Népköztársaság útja 21. Текущий счет № 43-790-057-181) или его заграничные представительства и уполномоченные.

42,— Ft

INDEX

MORPHOLOGIA NORMALIS ET EXPERIMENTALIS

Rosenberg, A.—Schächter, I.—Daghie, V.: Experimentelle Beiträge zum Problem der alkalischen Leberphosphatase. — *А. Розенберг—И. Шэхтер—В. Даги:* Экспериментальные данные о щелочной фосфатазе печени 245

Halász, B.—Szentágothai, J.: Control of Adrenocorticotrophic Function by Direct Influence of Pituitary Substance on the Hypothalamus. — *Б. Халас—Й. Сентаготаи:* Непосредственное обратное действие производимого передней долей гипофиза вещества на гипоталамус и производство адренокортикотропного гормона 251

Nagy, M.: Über einige Fragen des Alterns der menschlichen Plazenta. — *М. Надь:* Проблемь старения человеческой плаценты 263

Csaba, Gy.: The Human Thymus Gland: The Problem of the Thymus-Mast-Cells. — *Дь. Чаба:* Исследование человеческой зобной железы с точки зрения тучных клеток зобной железы 285

Csaba, Gy.—Törő, I.—Kapa, E.: New Contributions to the Heparin-Affinity of the Thymus. I. — *Дь. Чаба—И. Тёрё—Е. Капа:* О сродстве зобной железы к гепарину. I. 291

Csaba, Gy.—Törő, I.—Vatai, M.: New Contributions to the Heparin-Affinity of the Thymus. II. — *Дь. Чаба—И. Тёрё—М. Ватаи:* О сродстве зобной железы к гепарину. II. 297

Donáth, T.—Orbán, Gy.—Gimes, R.: New Data Regarding the Fluorescence Microscopic Picture of Vaginal Epithelium. — *Т. Донат—Дь. Орбан—Р. Гимеш:* Новые данные к картине эпителиальных клеток влагалища при флуоресцентной микроскопии 301

Pósalaky, Z.—Tóth, G.—Müller, M.—Csáky, L.: The Determination by Differential Extraction of the Distribution of P^{32} Label in Sections and Smears. — *З. Пошалаки—Г. Тот—М. Мюллер—Л. Чаки:* Определение распределения P^{32} в срезах и мазжах путем дифференциальной экстракции 309

PATHOLOGIA

Szendi, B.—Heim, V.: Genital Tuberculosis in the Female: The Mechanism of its Generalization. — *Б. Сенди—В. Хейм:* Данные к механизму генерализации туберкулеза женских половых органов 315

Haranghy, M.: Modifications de la structure nucléaire dans les éléments mobiles de l'écorce cérébrale humaine, lors de phénomènes de neuronophagie, chez des individus atteints de maladies mentales. — *М. Харанги:* Изменения ядерной структуры подвижных элементов человеческой коры головного мозга в ходе явлений невронофагии у душевнобольных 327

Haraszti, A.—Endes, P.: Hepatic Lesions in Secondary Shock and Acute Cardiac Failure. — *А. Харасти—П. Эндеш:* Изменения печени в связи с вторичным шоком и острой недостаточностью сердца 343

Liebner, E.—Temesváry, Gy.—Lengyel, J.—Angyal, J.: The Agar Binding Reaction in Skin Diseases. — *З. Либнер—Дь. Темешвари—Ю. Лендьел—Й. Андьал:* Исследования реакции связывания агара при кожных болезнях 357

ONCOLOGIA

Krompecher, St.—Berencsi, Gy.: Mucopolysaccharides in the Histochemistry of Cancer. Production of Neutral Mucopolysaccharides and Their Drainage through Dilated Lymphatics in Mouse Cancer C_3H. — *И. Кромпехер—Дь. Беренчи:* Мукополисахариды в гистохимии раковой ткани 375

COMMUNICATIO BREVIS

Endes, P.—Dévényi, I.—Halász, B.—Gomba, Sz.: The Granulated Cells of the Juxtaglomerular Apparatus in Experimental Lesions of the Hypophyseal Stalk and of the Hypothalamus 385