ACTA MORPHOLOGICA

ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE

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

REDIGIT
I. TÖRŐ

TOMUS X FASCICULUS 1

AKADÉMIAI KIADÓ BUDAPEST

1961

ACTA MORPH. HUNG.

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 I. Fő utca 32. 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 I. Fő utca 32. 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 X

AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST
1961

INDEX

Tomus X

Csaba, Gy.—Horváth, J.—Ács, T.—Horváth, C. : Effect of Galvanic Current and X-ray-Irradiation on the Tissue Reaction of Thymus 1

Barabás, Cs.—Barta, O.—Z. Szabó, L.—Vizkelety, T. : Beiträge zur funktionellen Anatomie des Sakroiliakalgelenks 7

Donáth, T.—Lengyel, I. : Analysis of the Staining Properties of Acridine Orange in Epithelial Cells 21

Katona, I. : Procédés de conservation des préparations anatomiques à l'aide de l'air raréfié 33

Gyévai, A.—Kapa, E. : Succinic Dehydrogenase Activity in the Thymus of Laboratory Rodents 49

Schranz, D. : Die quantitativen Veränderungen einzelner Bestandteile des Humerus und der Mandibula während des Seniums 59

Maros, T.—Csiky, M.—Seres-Sturm, L.: Über die nach Chlorpromazinbehandlung eingetretene Modifikation der Mikrogliareaktion an der Stelle experimenteller Gehirnläsionen 65

Kneiszl, F.—Bonivárt, A.: Angaben zu den Entwicklungsanomalien von Frühgeborenen 81

Ривензон, А.—Неделеску, П.: Вспомогательное лечение опухолей при хроническом введении не вызывающих лейкопению доз цитостатиков 97

Rappay, Gy.—Balogh, Gy.: Vergleichende histochemische Untersuchung der Nukleoproteide in den Blutzellen von Wirbeltierarten I. Untersuchung der Wirkung proteolytischer Enzyme 111

Csaba, Gy.—Horváth, C. : Transplantation of Regenerative Hepatic Tissue 119

Pályi, I.—Kapa, E. : Über das Verhalten der Hassallschen Körperchen nach Röntgenbestrahlung 127

Pósalaky, Z.—Gyévai, A.—Bukulya, B. : Contributions to the Mechanism of Spermatogenesis, on the Basis of Studies of the Acid-fast Staining, Succinic Dehydrogenase Activity and Histochemical Examination of Lipids 137

Mangold, O.: Freie Linsen in augenlosen Köpfen und Isolaten von *Triturus alpestris* 153

Bucher, O. : A propos du rythme fonctionel cellulaire dans les reins 177

Токин, Б. П.—Еричева, Ф. И.—Калинина, Е. И.: Регенерация, соматический эмбриогенез и сопутвующие им явления у *Laomedea flexuosa* и у некоторых других низших *Coelenterata* 185

Stanek, I. : Mikrokinematographischer Beitrag zur Problematik der Entstehung und Vermehrung der Makrophagen in Nervengewebekulturen 209

Vigh, B.—Aros, B.—Zaránd, P.—Törk, I.—Wenger, T. : Gomori-positive Secretion in the Subcommissural Organ of Different Vertebrates 217

Karmazsin, L. : Probleme der embryonalen Faserentwicklung 237

Krompecher, St. : Zelle und Gewebseinheit 259

Tokin, I. B. : On the Electron Microscopy of Membrane Structures of Cells 269

Menkes, B. : Transsektionsexperimente am 12-Somiten Hühner-Embryo 277

Mayersbach, H. : Probleme der histologischen Mitochondriendarstellung 285

Müller, M.—Röhlich, P. : Studies on Feeding and Digestion in Protozoa II. Food Vacuole Cycle in *Tetrahymena corlissi* 297

Szentágothai, J. : Somatotopic Arrangement of Synapses of Primary Sensory Neurons in Clarke's Column 307

Baló, J. : Zur Frage der Fettmobilisierung 313

Selye, H.—Nielsen, K. : Histogenesis of Experimental Cutaneous Calcinosis 327

Kellner, B. : Progression of Tumour Growth and Formation of Metastases 337

Bierwolf, D.—Graffi, A.—Baumbach, L. : Über den elektronenmikroskopischen Nachweis des Polyomastammes BB-T 2 357

INDEX AUTORUM

A

Aros, B. vide *Vigh, B.—Zaránd, P.—Török, I.—Wenger, T.* 217
Ács, T. vide *Csaba, Gy.—Horváth, J.—Horváth, C.* 1

B

Baló, J. 313
Balogh, Gy. vide *Rappay, Gy.* 111
Barabás, Cs.—Barta, O.—Z. Szabó, L.—Vizkelety, T. 7
Barta, O. vide *Barabás, Cs.—Z. Szabó, L.—Vizkelety, T.* 7
Baumbach, L. vide *Bierwolf, D.—Graffi, A.* 357
Bierwolf, D.—Graffi, A.—Baumbach, L. 357
Bonivárt, A. vide *Kneiszl, F.* 81
Bucher, O. 177
Bukulya, B. vide *Pósalaky, Z.—Gyévai, A.* 137

Cs

Csaba, Gy.—Horváth, J.—Ács, T.—Horváth, C. 1
Csaba, Gy.—Horváth, C. 119
Csiky, M. vide *Maros, T.—Seres-Sturm, L.* 65

D

Donáth, T.—Lengyel, I. 21

G

Graffy, A. vide *Bierwolf, D.—Baumbach, L.* 357

Gy

Gyévai, A.—Kapa, E. 49
Gyévai, S. vide *Pósalaky, Z.—Bukulya, B.* 137

H

Horváth, C. vide *Csaba, Gy.—Horváth, J.—Ács, T.* 1
Horváth, C. vide *Csaba, Gy.* 119
Horváth, J. vide *Csaba, Gy.—Ács, T.—Horváth, C.* 1

I

Ieritshewa, F. I. vide *Tokin, B. P.—Kalinina, E. I.* 185

K

Kalinina, E. I. vide *Tokin, B. P.—Ieritshewa, F. I.* 185
Kapa, E. vide *Gyévai, A.* 49
Kapa, E. vide *Pályi, I.* 127
Karmazsin, L. 237
Katona, I. 33
Kellner, B. 337
Kneiszl, F. 81
Krompecher, St. 259

L

Lengyel, I. vide *Donáth, T.* 21

M

Mangold, O. 153
Maros, T.—Csiky, M.—Seres-Sturm, L. 65
Mayersbach, H. 285
Menkes, B. 277
Müller, M.—Röhlich, P. 297

N

Nedelescu, P. vide *Rivenzon, A.* 97
Nielsen, K. vide *Selye, H.* 327

Ö

Ökrös, S. 78.

P

Pályi, I.—Kapa, E. 127
Pósalaky, Z.—Gyévai, A.—Bukulya, B. 137

R

Rappay, Gy.—Balogh, Gy. 111
Rivenzon, A.—Nedelescu, P. 97

S

Schranz, D. 59
Selye, H.—Nielsen, K. 327
Seres-Sturm, L. vide *Maros, T.—Csiky, M.* 65
Stanek, I. 209

Sz

Szabó, L. vide *Barabás, Cs.—Barta, O.—Vizkelety, T.* 7
Szentágothai, J. 307

T

Tokin, I. B. 269
Tokin, B. P.—Ieritshewa, F. I.—Kalinina, E. I. 185
Törk, I. vide *Vigh, B.—Aros, B.—Zaránd, P.—Wenger, T.* 217

V

Vigh, B.—Aros, B.—Zaránd, P.—Törk, I.—Wenger, T. 217
Vizkelety, T. vide *Barabás, Cs.—Barta, O.—Z. Szabó, L.* 7

W

Wenger, T. vide *Vigh, B.—Aros, B.—Zaránd, P.—Törk, I.* 217

Z

Zaránd, P. vide *Vigh, B.—Aros, B.—Törk, I.—Wenger, T.* 217

Department of Histology and Embryology (Director: Prof. I. TÖRŐ) and Department of Radiology (Director: Prof. N. RATKÓCZY), University Medical School, Budapest

EFFECT OF GALVANIC CURRENT AND X-RAY-IRRADIATION ON THE TISSUE REACTION OF THYMUS

GY. CSABA, J. HORVÁTH, T. ÁCS and CECILIA HORVÁTH

(Received September 1, 1959)

We observed in earlier experiments that the tissue reaction of the thymus gland was uniform howewer different stimuli had elicited it [1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 11, 12]. The thymus of tumorous, pregnant and tuberculous rats showed characteristic changes which, depending on the gravity or stage of the causative process were a contraction of the epithelial reticulum, the accumulation of epithelial cells, epithelial cysts containing a PAS positive substance; simultaneously, mast cells appeared. — These phenomena were always observed in experiments where processes of tissue proliferation were taking place in the organism, where the normal harmony and normal structure of the tissues seemed to be disturbed. Such observations led us to assume a correlation between tissue proliferation and the described reaction of the thymus. The problem nevertheless seemed unsolved considering that stressor stimuli elicited quite similar although weaker responses.

The present experiments, in which the effect of galvanic current eliciting intensive stress and X-ray irradiation destroying part of the tissues was studied, were aimed at settling the above problem.

Method

We used 44 rats of the Wistar strain, weighing about 200 g each. They were divided into 3 groups.

(i) *First group.* 10 animals were treated once with galvanic current of 2 mA for 4.5 minutes. One pole was a wet metal plate forming the floor of the cage and being thus in connection with the paws of the animals. The other pole was a bent lead plate applied to the wet tail of the animals.

(ii) *Second group.* 12 animals were irradiated with 200 r of X-rays (Siemens "Stabilivolt" apparatus; 180 Kv; 6 ma; 2.5 mm aluminium filtre; 50 cm target distance) in a cage with a 5 mm thick plexiglass cover. Irradiation lasted 4½ min.

(iii) *Third group.* 22 animals were treated with both galvanic current and irradiation.

Thymus and spleen were taken out 24 to 27 hours after treatment, fixed in Carnoy's fluid, embedded in paraffin, sectioned at two levels 2 mm apart and stained with PAS, Giemsa and toluidine blue.

Results

(i) *Galvanic current*

The thymus revealed no gross changes. Its average weight was 199 mg, about 10 to 20 per cent less than in untreated animals of the same body weight. Of the 10 specimens, in 5 there were marked signs of excitation under the microscope. Slight signs of incipient evacuation were observed especially in the marginal lobes. An increased number of mast cells was seen especially in the capsule and the cortex of the marginal lobes. Some of the lobes underwent complete mast cell transformation (Figs. 1, 2), a phenomenon to be interpreted as an intensive mast-cell reaction. In one case there was a cyst formed of columnar epithelium and filled with PAS-positive substance.

(ii) *X-ray irradiation*

The weight of the thymus was considerably reduced, on the average to 108.2 mg, which is not even half the weight recorded in the untreated controls. Under the microscope, the thymus seemed to be completely loosened up so that in some parts its normal structure was almost unrecognizable. A remarkable feature was the advanced evacuation. There were occasional cysts but these were smaller than that observed in the first group, nor did they contain as much PAS-positive substance. The number of mast cells was increased but they were in a state of degeneration especially in the connective tissue; there were many vacuolated and hypergranulated forms, most of which had disintegrated into granules.

(iii) *Combined treatment with galvanic current and X-rays*

The weight of the thymus was considerably below normal, 105 mg on the average. Under the microscope the tissues seemed more or less intact, the structure characteristic, the cortex well distinguishable from the medulla. Seven out of the 22 specimens contained cysts made up of a layer of columnar epithelium and filled with PAS-positive substance. The number of mast cells was increased (Fig. 3). Most of them were found beneath the capsule and seemed to be unimpaired; there were only a few disintegrated forms.

*

We examined also the spleen of the animals in all the three groups. This organ was generally poorer in cells than the spleen of untreated animals: we were, however, unable to establish any connection between this phenomenon and the evacuation of the thymus. No abnormal increase in the number of mast cells was observable in the spleen.

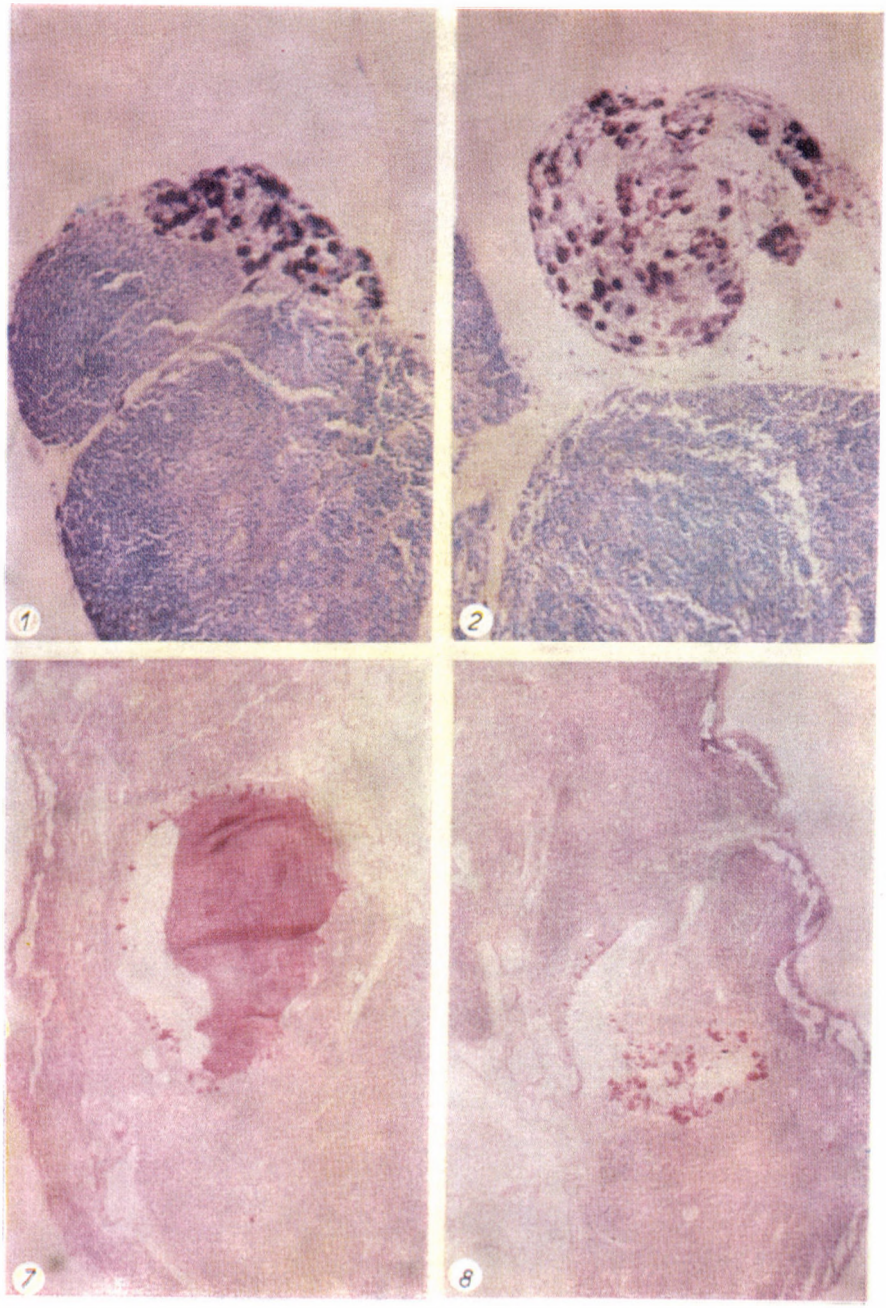


Fig. 1. Section of thymus from animal treated with galvanic current. The marginal portion of the lobe has completely transformed into mast cells. Toluidine blue, ×60

Fig. 2. Section of thymus removed from an animal treated with galvanic current. Complete transformation of a thymus lobe into mast cells. Toluidine blue, ×60

Figs. 7—8. Two sections of the same cyst, 2 mm apart. PAS, ×60

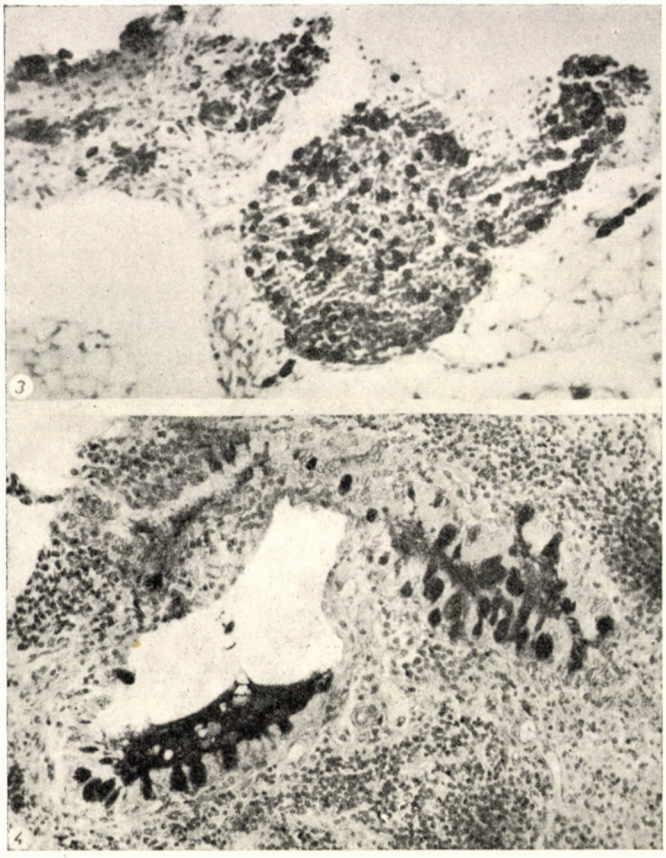


Fig. 3. Section of thymus removed from animal treated with galvanic current and X-rays. Complete transformation of a marginal lobe into mast cells. Toluidine blue, ×60

Fig. 4. A presumably incipient cyst in the thymus of an animal treated with galvanic current and X-rays. Cylindrical cells and their PAS-positive secretion well visible in the right upper corner. A complete cyst with goblet cells, somewhat to the left. PAS, ×60

Discussion

The chief effect of galvanic current in our experiments was an increase in the number of mast cells in the thymus. Entire lobes were seen to have undergone mast cell transformation (Figs. 1, 2, 3). An interpretation of this phenomenon — one which is in good agreement with the results of our experiments now in progress — would be that the galvanic current releases the process of mast-cell formation; since the tissues are not seriously damaged, there is no stimulus to cause a migration "en masse" of the mast cells which, thus, remain in the thymus. This would be the way how galvanic current is responsible for the accumulation of mast cells in the thymus, and it is for this

reason that treatment with galvanic current is a most suitable method for observing the transformation of thymocytes into mast cells.

X-ray irradiation is a much rougher intervention which causes marked destruction of the tissues not merely on the periphery but also in the central parts. In addition to being newly formed, the mast cells become engorged with metachromatic matter, and most of them show signs of disintegration. This phenomenon may have two reasons. Either the whole of the thymus has suffered grave damage or else the X-rays are responsible for the transformation: increased amounts of heparin are taken up by the cells in excess so that they are transformed into mast cells and disintegrate into granules. A similar phenomenon produced by X-rays was described by SMITH and LEWIS [8]. Further experiments will have to elucidate this question. What our observations in all three groups seem to prove beyond doubt is that the effect of the above factors on the thymus is to transform the thymocytes into mast cells.

The evidence of these observations makes it possible to follow the formation of cysts. There are several among our sections which show quite clearly that the PAS-positive substance is secreted by the thymic epithelium; accumulated, this substance pushes apart the cells of the reticulum so that cysts are produced (Fig. 4). A comparison of a series of sections makes it apparent that the PAS-positive matter is stored by the cells only for some time and is then eliminated. Structures resembling goblet cells are observable among the epithelial cells in several cysts; these structures have a basally situated nucleus, their apex is filled with PAS-positive substance which seems to be in direct contact with the content of the cyst (Fig. 5). The impression one gains from these pictures is that the cells are just emptying their PAS-positive contents into the cyst. Our results substantiate those of DIDERHOLM and HELLMANN [6] obtained by means of autoradiography, although we want to emphasize that the substance contained in the cysts has not proved to be metachromatic either in the present or in any of our earlier experiments. We are nevertheless convinced that the PAS-positive substance is actively secreted (Fig. 6). The cysts are fairly large. The fact that two sections in Figs. 7 and 8, made of the same thymus at two different levels 2 mm apart, show the same cyst, proves that at least one diameter of this cyst must have been 2 mm long. The number of cysts was highest in Group 3 (combined treatment). The experiments afforded no clue to show why this was so.

The above-described experimental results justify the claim that the uniform tissue reaction characteristic of the thymus appears not only in processes involving a tissue disharmony, but arises under the influence of stress-like stimuli as well, although not all components of the reaction are present and its intensity shows quantitative variations in such cases. Tissue proliferation is undoubtedly the strongest and most usual stimulus to elicit the complete reaction.

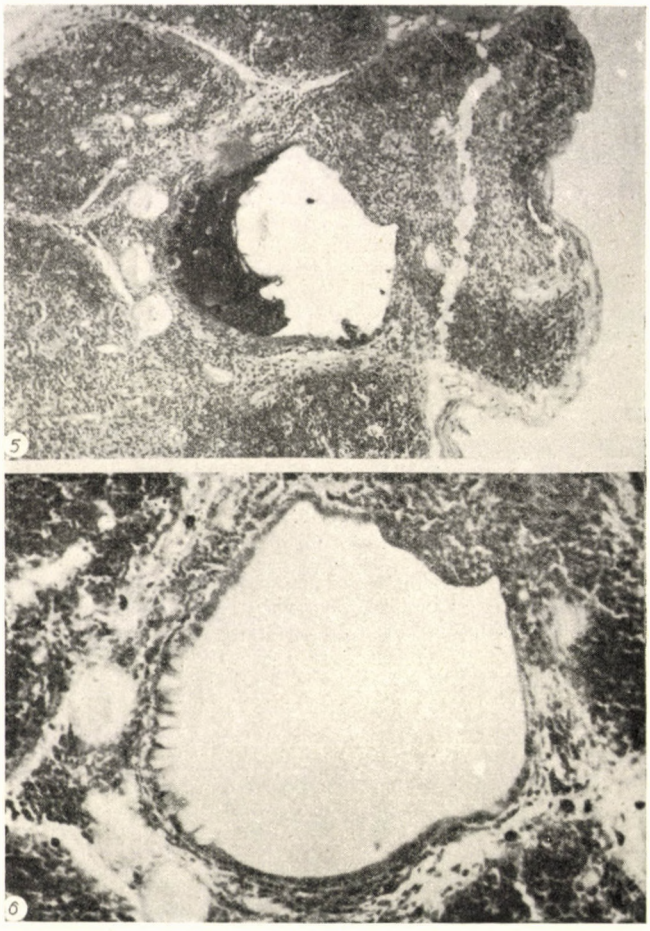


Fig. 5. Complete thymus cyst containing PAS-positive substance, from an animal treated with galvanic current and X-rays. Close connection between goblet cells and cyst. PAS, ×60

Fig. 6. Same cyst as in Fig. 5 under high power. No toluidine metachromasia. Row of goblet cells visible. Toluidine blue, ×60

Summary

The effect of galvanic current, X-ray irradiation, and the combined effect of both, on the thymus of rats were studied. Such stimuli elicit the well-known characteristic reaction of the thymus. The tissue reaction consists of various components which are more or less pronounced according to the nature and intensity of the stimulus. Even the combined application of a galvanic current and X-rays failed to elicit a tissue reaction as marked as is encountered in cases with intensive tissue proliferation.

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—196. — 2. Csaba, Gy., Törő, I., Kapa, E.: (1960) Provoked Tissue Reaction on the Thymus in Tissue Culture.

Acta morph. hung. *9*, 197—202. — 3. CSABA, GY: (1960) The Human Thymus Gland: The Problem of the Thymus-Mast-Cells. Acta morph. hung. *9*, 285—289. — 4. CSABA, GY., TÖRŐ, I., KAPA, E.: (1960) New Contributions to the Heparin-Affinity of the Thymus. Acta morph. hung. *9*, 291—295. — 5. CSABA, GY., TÖRŐ, I., VATAI, M.: (1960) New Contributions to the Heparin-Affinity of the Thymus. II. Acta morph. hung. *9*, 297—300. — 6. DIDERHOLM, H., HELLMANN, B.: (1958) Nature and Metabolism of a Thymus Cyst (Studied by Histochemistry and Autoradiography). Z. Zellforsch. *48*, 450—454. — 7. RADITZ, M., TÖRŐ, I.: (1954) Behaviour of Thymus Transplanted to Chorioallantoic Membrane. Acta biol. hung. *5*, 88—96. — 8. SMITH, D. E., LEWIS, Y. S.: (1954) Influence of Hypophysis and Adrenal Cortex upon Tissue Mast Cell of the Rat. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) *87*, 515—518. — 9. TÖRŐ, I.: (1955) A csecsemőmirigy histophysiologiája. (Histophysiology of Thymus.) Debreceni Orvosegyetem Évkönyve. *1—5*. — 10. TÖRŐ, I.: (1957) Histologische Beiträge zur Funktion des Thymus. Verh. Anat. Ges. 54. Versammlung, Freiburg/Br. 22—25. Sept. — 11. TÖRŐ, I., AROS, B.: (1958) Gewebsreaktion des Thymus auf verschiedene Einwirkungen. Acta morph. hung. *8*, 152—171. — 12. VADÁSZ, J.: (1954) Beiträge zur Entstehung der Thymozyten. Acta morph. hung. *4*, 279—292.

ДЕЙСТВИЕ ГАЛЬВАНИЧЕСКОГО ТОКА И РЕНТГЕНОВСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ НА ТКАНЕВУЮ РЕАКЦИЮ ЗОБНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

ДЬ. ЧАБА, Я. ХОРВАТ, Т. АЧ и Ц. ХОРВАТ

Авторы исследовали на зобной железе крыс действие гальванического тока, рентгеновского облучения и одновременного применения этих двух способов воздействия. Описанные воздействия обусловливают уже раньше описанные авторами типичные реакции зобной железы. В зависимости от качества и от силы воздействия различные компоненты тканевой реакции в различной степены выражены. Совместным применением гальванического тока и рентгеновского облучения также не удалось вызвать сильной тканевой реакции, наблюдаемой в состояниях с значительным разрастанием тканей.

DIE WIRKUNG VON GALVANISCHEM STROM UND RÖNTGENBESTRAHLUNG AUF DIE GEWEBSREAKTIONEN DES THYMUS

GY. CSABA, J. HORVÁTH, T. ÁCS und C. HORVÁTH

Die Wirkung von Galvanstrom, Röntgenbestrahlung und der gleichzeitigen Anwendung dieser beiden Behandlungen am Rattenthymus wurde untersucht. Die Einwirkungen lösten die von den Verfassern bereits früher beschriebene charakteristische Reaktion des Thymus aus. Die verschiedenen Komponente der Gewebsreaktionen waren in Abhängigkeit von der Art und Stärke der Einwirkung in verschiedenem Maße ausgeprägt. Auch bei gleichzeitiger Anwendung von Galvanstrom und Röntgenbestrahlung gelang es keine so intensive Gewebsreaktion hervorzurufen, wie dies bei den mit starker Gewebswucherung einhergehenden Zuständen beobachtet wird.

Dr. György CSABA
Tamás ÁCS
Dr. Cecilia HORVÁTH
Budapest IX. Tűzoltó u. 58. Hungary

Dr. József HORVÁTH Budapest VIII. Üllői ut 78/b. Hungary

Orthopädische Klinik der Medizinischen Universität, Budapest (Vorstand: Prof. A. GLAUBER)

BEITRÄGE ZUR FUNKTIONELLEN ANATOMIE DES SAKROILIAKALGELENKS

CS. BARABÁS, O. BARTA, L. Z. SZABÓ und T. VIZKELETY

(Eingegangen am 16. Oktober 1959)

Eine der häufigsten Erkrankungen der Bewegungsorgane, der Kreuzschmerz kann neben zahlreichen anderen Ursachen auch von einer Erkrankung und Funktionsstörung des Sakroiliakalgelenks ausgelöst werden. Die verhältnismäßige Seltenheit der Sakroiliakalgelenkveränderungen läßt sich darauf zurückführen, daß die klinische und röntgenologische Untersuchung des Gelenks schwierig ist und unsichere Resultate ergibt, so daß seine Erkrankung als Auslösungsursache der Kreuzschmerzen oft verborgen bleibt. Im Hinblick auf die versteckte Lage des Gelenks und die geringe Ausdehnung der Bewegungen vermag man eine Verringerung oder Steigerung der Gelenkbewegung durch klinische Untersuchung nur selten festzustellen. Die komplizierte Lage der Gelenkflächen im Raum erschwert die röntgenologische Untersuchung.

Obgleich sich mit der funktionellen und Röntgenanatomie des Sakroiliakalgelenks zahlreiche Mitteilungen befaßt haben, gibt es keine einheitliche Meinung über die Bewegung des Gelenks. Die zur Darstellung des Gelenks ausgearbeiteten Aufnahmeverfahren [1, 3, 9, 13] eignen sich zum Nachweis der pathomorphologischen Veränderungen, die im Gelenk zustande kommenden Verschiebungen lassen sich jedoch in diesen Aufnahmen nur unsicher bewerten.

Von einem Teil der Forscher wurde noch im vorigen Jahrhundert der echte Gelenkcharakter der Sakroiliakalverbindung in Zweifel gezogen; heute wird das Gelenk jedoch in der anatomischen Fachliteratur im allgemeinen als echtes beschrieben. PATURET [12] nennt das Gelenk Diarthro-Amphyarthrosis; eine Diarthrose wegen der Anwesenheit der Gelenkkapsel, der Bänder und der Synovialmembran, eine Symphyse auf Grund der interossealen Bänder und der geringen Ausdehnung der Bewegungen.

Wie bereits *Hippokrates* feststellte, findet beim trächtigen Tier im Gelenk Bewegung statt, die PARÉ auch am Menschen beobachtete. In der zweiten Hälfte des vorigen Jahrhunderts hat man die Bewegung des Gelenks hauptsächlich in geburtshilflicher Beziehung untersucht und ermittelt, daß sich die Größe des geraden Beckendurchmessers in Abhängigkeit von der Lagerung verändert. FICK [2] teilte zahlreiche — zum Teil einander widersprechende — Untersuchungsbefunde mit. Laut MEYER [11] kommt die Bewegung um zwei

Querachsen zustande, von denen eine hinter den Gelenkflächen, die andere durch die Gelenkflächen verläuft. Nach PATURET [12] kommt die »nutation« bzw. »contrenutation« des Sacrums, d. h. das nach vorn und unten bzw. nach hinten und oben erfolgende Kippen der Sacrumbasis um die hinter dem zweiten Sacralwirbel verlaufende Querachse zustande.

WEISL [14, 15] hat mit seiner speziellen röntgenologischen Untersuchungsmethode festgestellt, daß die größte Bewegung im Gelenk, die Verschiebung des Promontoriums in ventraler Richtung, beim Aufrichten vom Liegen, d. h. bei der Kyphotisierung der Lendenwirbel und gleichzeitigen Flexion der Hüftgelenke stattfindet. ILLI [6] untersuchte die Bewegung des Gelenks an Leichen und veranschaulichte die Amplituden mit an der Hüftpfanne angebrachten Zeigern. Nach seinen Feststellungen lösen die beim Gehen wirkenden Kräfte auch im Sakroiliakalgelenke Bewegungen aus. Wie die Untersuchungen ergaben, ist die Bewegung des Gelenks von sehr geringer Ausdehnung. Über die Richtung der Bewegung gibt es abweichende Angaben.

Infolge der Form der Gelenkflächen und des starken Bandapparates ist das Sakroiliakalgelenk außerordentlich straff. Bezeichnend für das Gelenk ist die große Belastungsfähigkeit ebenso wie die geringe Bewegungsmöglichkeit. Über dieses Gelenk und das Becken wird das Rumpfgewicht auf die unteren Extremitäten übertragen. Durch die Symphyse und die Sakroiliakalgelenke wirkt das Becken als elastischer Puffer zwischen den beiden Körperhälften. Hierzu eignet es sich infolge der Struktur des Gelenks, der Elastizität des Bandapparates, Knochens und Knorpels. Die Belastung ruht in erster Linie auf der ligamentösen Verbindung. Das Gelenk selbst gewährleistet die Elastizität der Verbindung und bestimmt die Richtung der Bewegungen. Im Verlaufe der Phylogenese fällt der sakroiliakalen Verbindung entsprechend den Veränderungen der funktionellen Inanspruchnahme eine ständig größere Rolle zu [4].

Angesichts der Belastungs- und Bewegungsverhältnisse des Gelenks ist es verständlich, daß seine Schädigung leicht eintreten kann. Es ist zwischen der unteren und oberen Körperhälfte großen Krafteinwirkungen ausgesetzt, die insbesondere infolge der aufrechten Körperhaltung zur Geltung kommen. Der Beckenring bildet eine elastische Einheit, und wenn diese an irgendeinem Punkt infolge Trauma oder aus einer anderen Ursache gestört wird, führt dies zu verschiedenen Beschwerden, meistens zu Kreuzschmerzen. Zu einer Störung der Einheit des Beckenringes kann es in der Sympyse, im Sakroiliakalgelenk und infolge von Frakturen auch an den Knochen kommen. Die Funktionsstörung eines Gelenkes wirkt wechselseitig auch auf andere Gelenke. Das bekannte Krankheitsbild der Beckenringlockerung beruht [7] auf der funktionellen Insuffizienz bzw. Lockerung der Symphyse und Sakroiliakalgelenke. In der Entwicklung dieser Erkrankung können auch hormonale Faktoren eine Rolle spielen. In diesem Falle nimmt die Beweglichkeit des Gelenks zu, die

Stabilität wird beeinträchtigt, was mitunter zu ernsthaften Beschwerden führt.

Im Sakroiliakalgelenk kommen auch sämtliche auf andere Gelenke lokalisierten Erkrankungen vor. Das verhältnismäßig häufige Auftreten der Arthrosis deformans läßt sich mit den eigentümlichen Verhältnissen des Gelenks erklären. ZÖLLNER [16] hat in seinem Obduktionsmaterial nahezu in der Hälfte der Fälle Arthrosen im Sakrioiliakalgelenk nachgewiesen. Infolge der Einengung der Bewegungen, der Versteifung der Gelenke führt die Verringerung der Elastizität des Beckenringes zu Beschwerden.

Besondere Bedeutung wird der pathologischen Bewegung des Gelenks, der Fixierung des verschobenen Gelenks in pathologischer Lage von den Chiropraktikern beigemessen. Die Feststellung dieser Tatsache stößt indessen ungeachtet der zahlreichen Untersuchungsverfahren auf Schwierigkeiten und ergibt unsichere Resultate. Auf den Röntgenaufnahmen verschiedener Einstellung sind die pathomorphologischen Veränderungen des Gelenks gut darstellbar, zur Beurteilung des funktionellen Zustandes jedoch ungeeignet. Im Hinblick auf ihre Lage im Raum läßt sich die ganze Gelenkspalte nicht auf einer Aufnahme wiedergeben. Die Anwendung einer Standard-Aufnahmetechnik ist deshalb schwierig, weil Form und Lage der Gelenkflächen große individuelle Abweichungen zeigen und auch dem Alter entsprechend verschieden sind [5].

*

Die eigenen Untersuchungen verfolgten den Zweck, zwei Fragen zu klären:

1. Was für Bewegungen gehen im Sakroiliakalgelenk vor sich, und in welcher Beziehung stehen diese Bewegungen zum Gehen?

2. Ist die im Gelenk zustande kommende Verschiebung röntgenologisch darstellbar, bzw. kann die im Gelenk künstlich herbeigeführte Verschiebung röntgenologisch (nach den an unserer Klinik gebräuchlichen Aufnahmeverfahren) bewertbar dokumentiert werden?

Die Untersuchung der Beweglichkeit des Sakroiliakalgelenks ist in vivo kaum durchführbar. Da wir die passive Übertragung der mit dem Gang zusammenhängenden Bewegung der unteren Extremitäten untersuchten, schienen uns für diesen Zweck Leichenuntersuchungen geeignet. In vivo ist die Übertragung vom Spannungszustand der einzelnen Muskelgruppen als aktivem Faktor und von der Kapsel- und Bänderspannung bzw. dem Zusammenstoße der Knochen als passivem Faktor abhängig. Bei unseren Leichenversuchen spielten in der Bewegungsübertragung nur die passiven Faktoren eine Rolle, was indessen keinen qualitativen Unterschied bedeutet. In Mittelstellung der Extremität kann keine Bewegung im Sakroiliakalgelenk ausgelöst werden, sondern nur am Endpunkt der Flexion und Extension. In vivo ist jedoch die Bewegung auf das Sakroiliakalgelenk je nach dem Muskeltonus in allen Phasen der Flexion und Extension übertragbar.

Methodik

Die Untersuchungen wurden an Leichen 36—48 Stunden nach Eintritt des Todes vorgenommen. In 14 Fällen prüften wir an der zusammenhängenden unteren Körperhälfte, ob sich die passive Bewegung des Hüftgelenks auf das Sakroiliakalgelenk übertragt. Nachdem wir dies festgestellt hatten, führten wir die Untersuchungen zwecks genauerer Analyse der Bewegungen im weiteren an 16 ligamentösen Becken in der Weise durch, daß wir das Os ileum selbst in seiner Beziehung zum fixierten Sacrum mit Hilfe eines daran befestigten Eisenstabes — als Krafthebel — bewegten. Die beiden Untersuchungen führten zu denselben Resultaten. Das Sacrum wurde für die Untersuchung mit zwei Schrauben an einem Holzstück befestigt, das, der Rückfläche des Sacrums angepaßt, in einen Schraubstock gespannt war. Die Spina iliaca anterior superior und den Processus transversus des V. Lumbalwirbels der untersuchten Seite verbanden wir mit Zeigern, welche die Bewegung der untersuchten Punkte am Kymographion registrierten. Die Bewegung des Sakroiliakalgelenks wurde durch

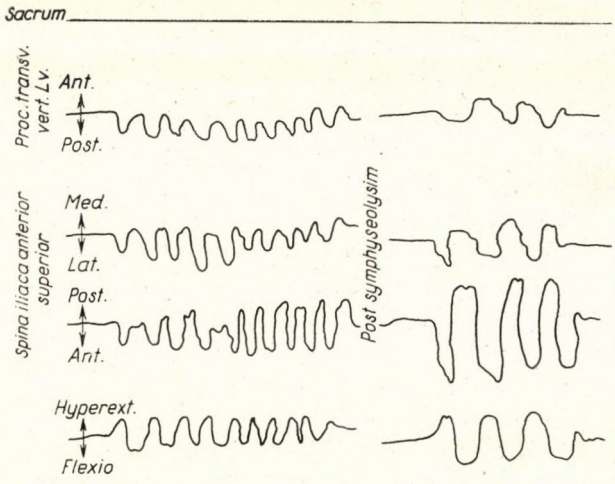


Abb. 1. Flexion und Extension des Hüftgelenks sind von der Wegbewegung der Spina iliaca ant. sup. und des V. Lumbalwirbels begleitet. Die auf die Hyperextension folgende Bewegung ist größer. Nach Durchtrennung der Symphyse und der hinteren sakroiliakalen Bänder verstärkt sich die Bewegung

Bewegung der unteren gleichseitigen Extremität bzw. des Eisenstabes hervorgerufen. Die Bewegung der Extremität registrierten wir ebenfalls; sie erfolgte zwischen Hyperextension und maximaler Flexion. Zur Kontrolle der Sacrumfixierung wurde auch die Sacrumbasis mit einem Zeiger verbunden. Im Falle guter Fixierung beschrieb der Sacrumzeiger eine gerade Linie, während er bei ungenügender Fixierung Abweichungen zeigte.

Die Bewegungsuntersuchungen wurden erst unter intakten Verhältnissen durchgeführt, dann nach Durchtrennung der Symphyse. In 10 Fällen durchtrennten wir auch die hinteren Sakroiliakalbänder. Die Abb. 1—4 zeigen die charakteristischen Bewegungskurven. Die unterste Kurve gibt die im Hüftgelenk ausgelöste Flexions-Extensionsbewegung, die beiden folgenden Kurven geben die Verschiebung der Spina iliaca anterior superior nach vorn und hinten bzw. zur Seite, die vierte Kurve gibt die nach vorn und hinten gerichtete Bewegung des gleichseitigen Processus transversus des V. Lumbalwirbels wieder. Die oberste Linie zeigt die Fixierung des Sacrums an.

Die röntgenologische Darstellungsmöglichkeit der im Gelenk herbeigeführten Bewegung untersuchten wir folgendermaßen: Von den ligamentösen Becken stellten wir Summationsaufnahmen nach BÁRSONY und SCHULHOF [1] her. Die Becken wurden so gelagert, daß die Lage dem Ausgleich der Lumballordose entspreche, und die Röntgenröhre wurde um 15° in kranio-kaudaler Richtung gewendet. Sodann machten wir eine Spaltenaufnahme des auf der Rückenseite liegenden Beckens unter Anheben der untersuchten Seite um 30° von der Tisch-

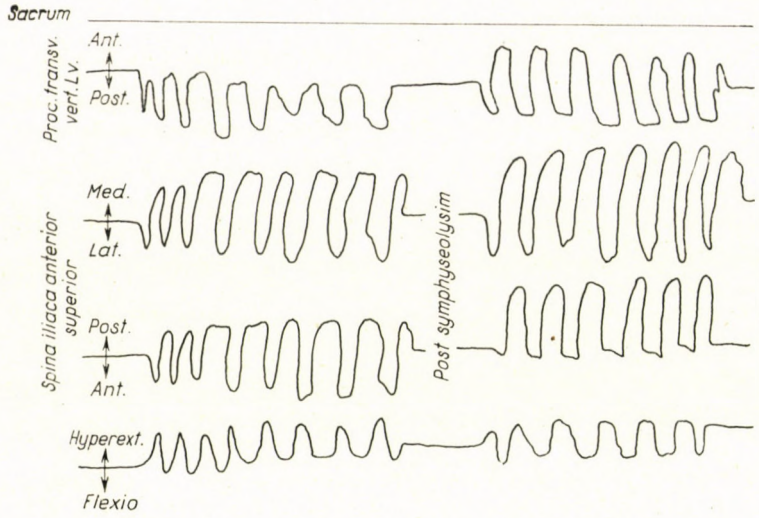


Abb. 2. Die Bewegung der Spina iliaca ant. sup. ist nach Flexion und Extension gleich groß. Nach Durchtrennung der Symphyse bleibt die Bewegungsamplitude fast unverändert

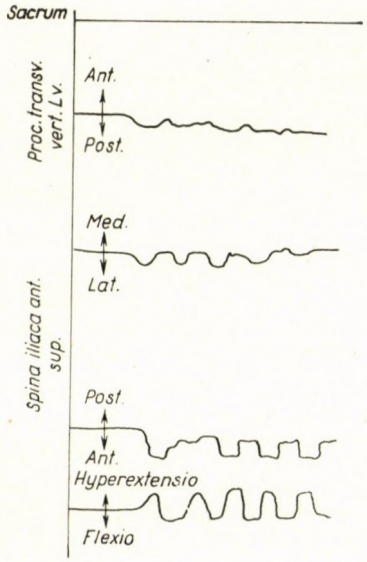


Abb. 3. Die Verschiebung der Spina ist nach der Hyperextension größer, aber die Begleitbewegung von sehr geringer Ausdehnung

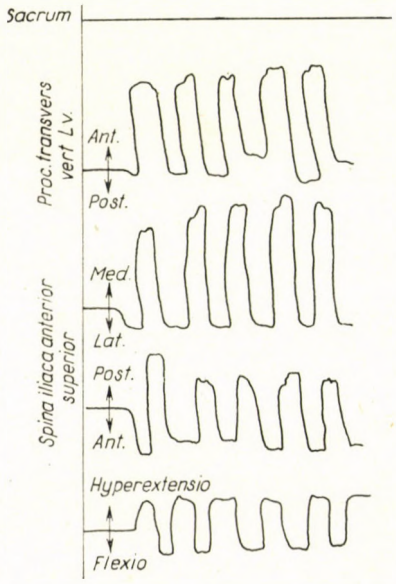


Abb. 4. Nach der Flexion ist die Bewegungsamplitude der Spina iliaca ant. sup. größer

ebene. Hiernach durchtrennten wir die Symphyse des untersuchten Beckens, schoben die Schambeine seitlich bzw. kaudo-kranial auseinander und wiederholten die Röntgenaufnahmen in dieser Lage.

Endlich legten wir die Gelenke der untersuchten Becken frei, machten photographische Aufnahmen der Gelenkflächen. In einigen Fällen wurden einzelne Teile der Gelenkflächen auch histologisch aufgearbeitet.

Ergebnisse

Bei der angewendeten Untersuchungsmethode wurden kymographisch registrierbare Bewegungen des Sakroiliakalgelenks durch Bewegungen im Hüftgelenke ausgelöst. Die experimentelle Bewegung des Hüftgelenks entsprach der Hüftbewegung beim Gehen, obwohl infolge Fehlen des Muskeltonus, Hyperextension und maximale Flexion angewendet wurde.

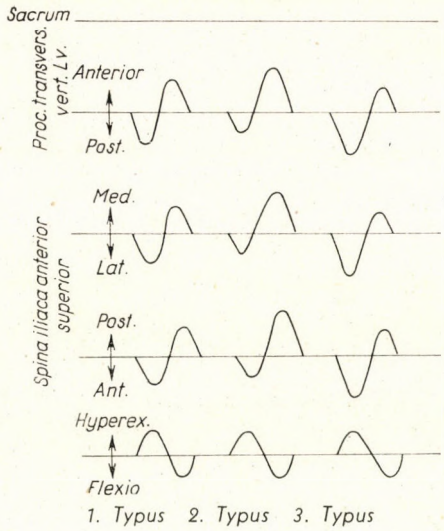


Abb. 5. Die drei Typen der Begleitbewegung der Spina iliaca ant. sup.

Aus den am Kymographion registrierten Bewegungskurven läßt sich folgendes feststellen:

1. Die Bewegung der unteren Gliedmaßen bzw. Hüftgelenke beim Gehen löst im Sakroiliakalgelenk eine Mitbewegung aus. In der Größe der im Gelenk zustande kommenden Verschiebung treten große individuelle Unterschiede zutage (Abb. 1—4).

2. Im Sakroiliakalgelenk geht eine sehr geringe Verschiebung vor sich. Am Kymographion wurde die Bewegung im Verhältnis 1:10 vergrößert. Aus dem Maßverhältnis läßt sich errechnen, daß die Verschiebung der Spina iliaca anterior superior 0,5—5 mm ausmacht. Diese Bewegung ist am Vorderrand

des Sakroiliakalgelenks noch geringer, weil dieser sich näher zur Drehungsachse befindet.

3. Bei Hyperextension des Hüftgelenks bewegt sich die Spina iliaca anterior superior der gleichen Seite im Vergleich zum fixierten Sacrum nach vorn und lateralwärts, bei Flexion in entgegengesetzter Richtung.

4. Die Bewegung der Spina war in 25 der untersuchten Fälle, von der Mittelstellung der Extremität ausgehend, bei Hyperextension größer als bei

Abb. 6. Übersichtsaufnahme des Beckens

Flexion (Abb. 1, 3). In 2 Fällen war die Verschiebung bei Flexion größer (Abb. 4). In 3 Fällen war die Bewegung der Spina bei Flexion und Extension gleich groß (Abb. 2). Abb. 5 veranschaulicht die drei Bewegungstypen.

5. Die im Sakroiliakalgelenk entstehende Bewegung überträgt sich auch auf den V. Lumbalwirbel. Die bei Hyperextension der Extremität erfolgende Bewegung der Spina nach vorn und lateralwärts wird von der Vorwärtsdrehung des gleichseitigen Querfortsatzes des V. Lumbalwirbels als Resultat der Rotationsbewegung des V. Lumbalwirbels begleitet (Abb. 1—4).

6. Nach Durchtrennung der Symphyse war die Bewegung im Sakroiliakalgelenk nicht oder kaum gesteigert (Abb. 2), während die Bewegung größer wurde, wenn auch die hinteren Sakroiliakalbänder durchtrennt waren (Abb. 1).

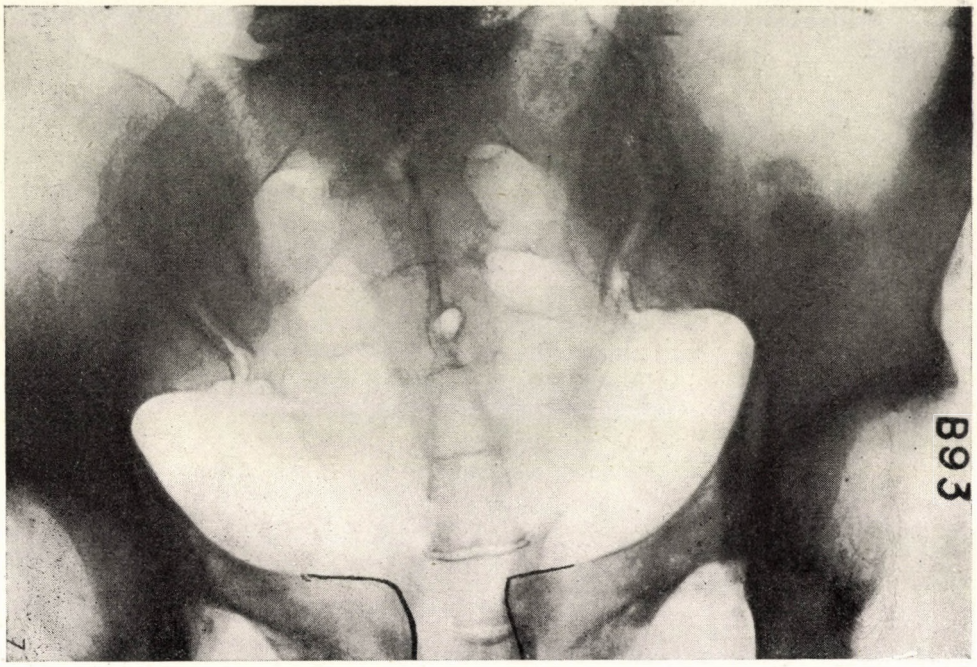


Abb. 7. Übersichtsaufnahme desselben Beckens wie in Abb. 6, nach Auseinanderspreizen der Symphyse. Die Breite des Sakroiliakalgelenks hat sich nicht verändert

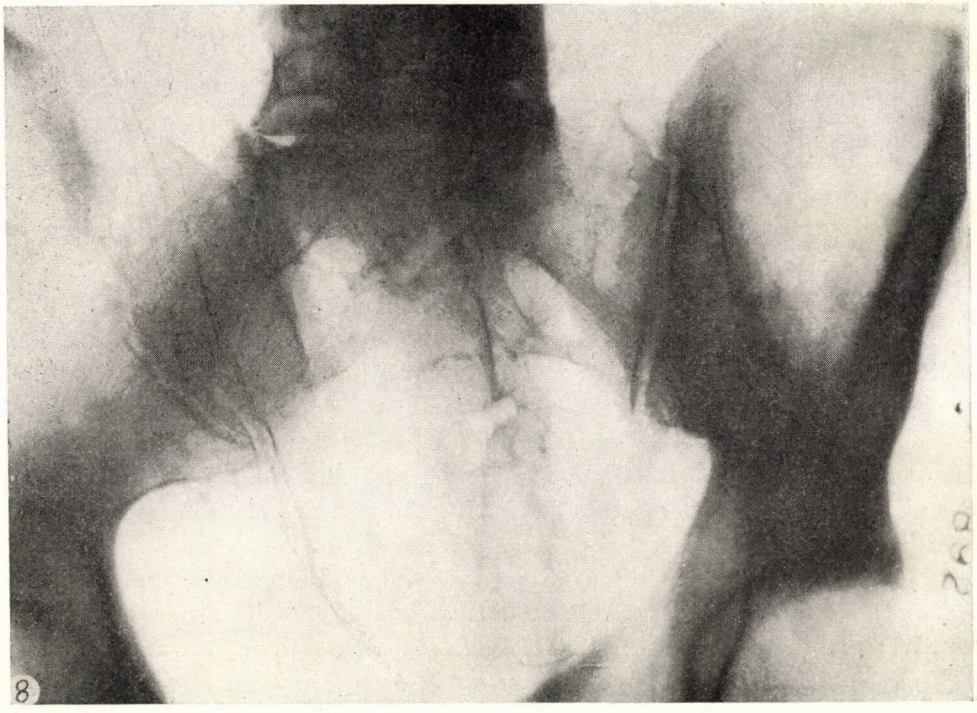


Abb. 8. Spaltenaufnahme desselben Beckens

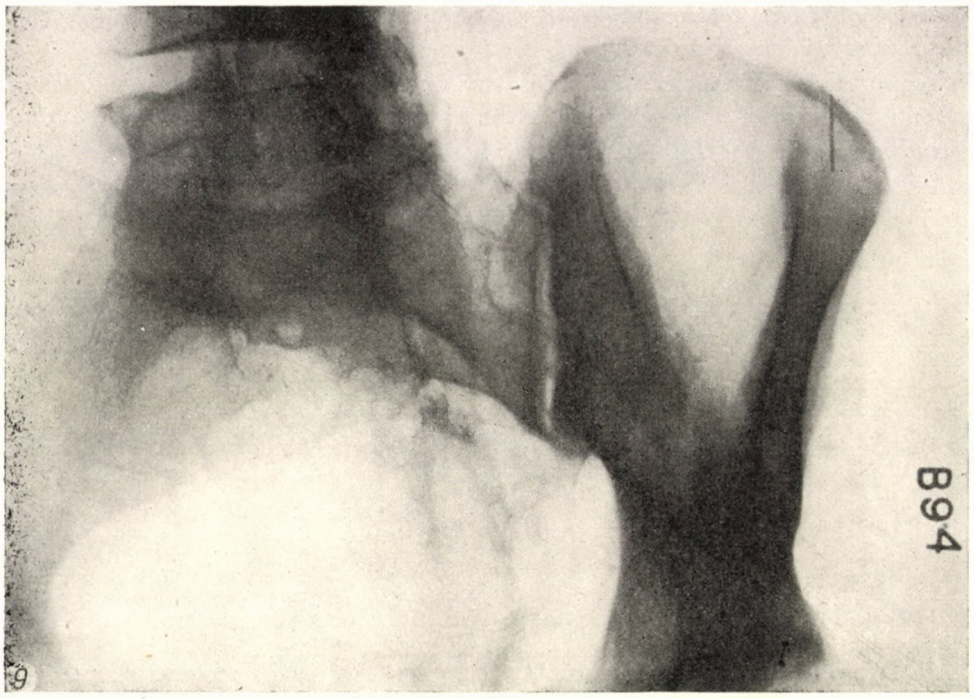


Abb. 9. Spaltenaufnahme desselben Beckens, nach Auseinanderspreizen der Symphyse. Die Breite des Gelenks hat sich nicht verändert

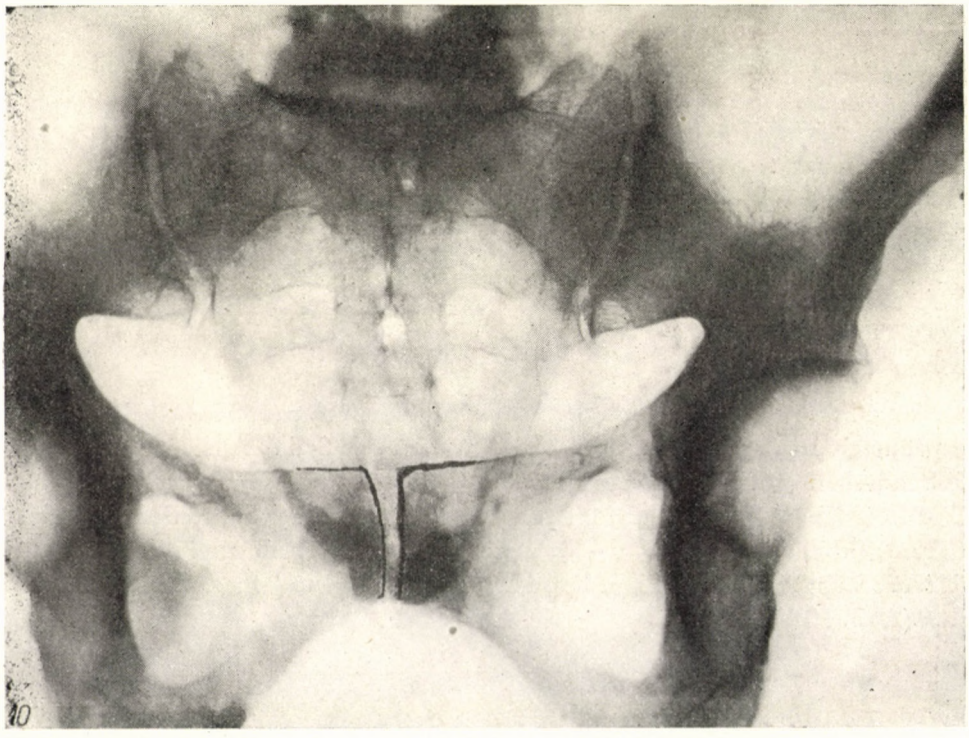


Abb. 10. Übersichtsaufnahme vom Becken

7. Die beobachtete Bewegung entspricht der Lage der Gelenkflächen im Raum. Obgleich sich unsere Untersuchungen nicht auf die genaue Lage der Bewegungsachse erstreckten, können wir doch aus der Richtung der Bewegungen feststellen, daß sie um eine hinter den Gelenkflächen schräg von hinten nach vorn verlaufende Achse zustande kommen.

Im Verlauf der Untersuchung hat sich das Sacrum nicht bewegt, was an der Sacrumlinie nachgeprüft werden konnte.

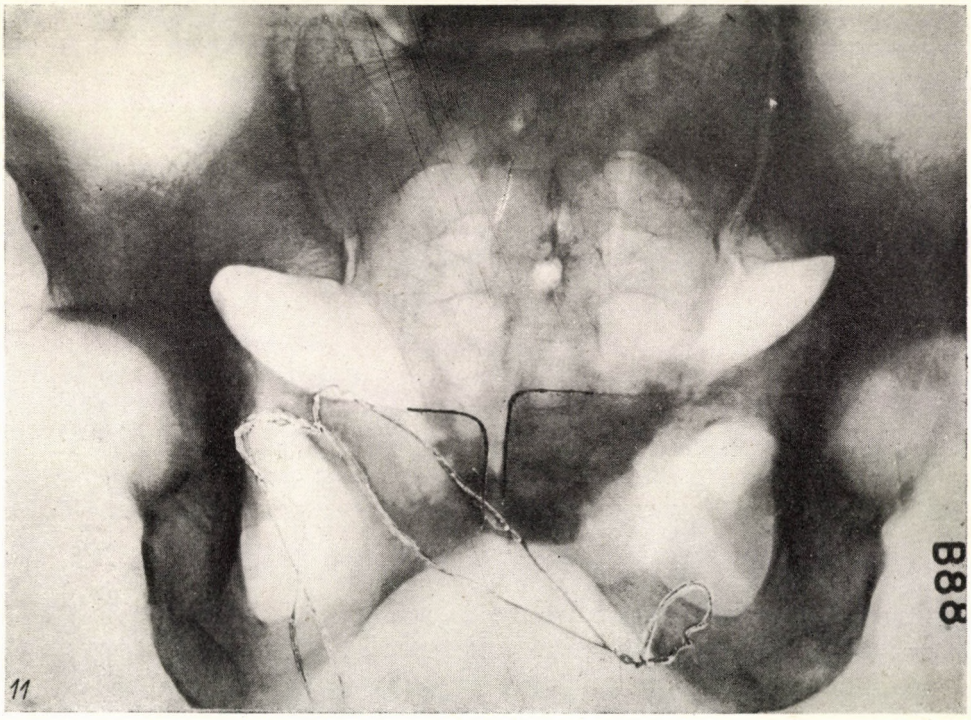


Abb. 11. Übersichtsaufnahme desselben Beckens wie in Abb. 10, nach Verschieben der Symphyse in kranio-kaudaler Richtung. Am Gelenk ist keine wesentliche Abweichung zu sehen

8. Über die röntgenologische Darstellung der im Sakroiliakalgelenk herbeigeführten Bewegung darf festgestellt werden, daß das Auseinanderziehen der Schambeine (um etwa 2 cm) nach Durchtrennung der Symphyse keine sicher bewertbare und charakteristische Verschiebung der Sakroiliakalgelenke im Röntgenbild ergibt (Abb. 6—9). Auch wenn die Schambeine in kranio-kaudaler Richtung verschoben werden, ist eine Verschiebung im Gelenk nicht zu sehen (Abb. 10—11).

Besprechung

Bei Untersuchungen an Leichen konnte festgestellt werden, daß eine bestimmte, am Kymographion registrierbare Bewegung im Sakroiliakalgelenk stattfindet. Bei fixiertem Sacrum macht die Verschiebung an der Spina iliaca anterior superior 0,5—5 mm aus. Verglichen mit den Resultaten von KLEIN [8] haben wir die Größe der Bewegung wesentlich kleiner gefunden. Im Gegensatz zu MEYER [11] ermittelten wir, daß sich die Größe der Bewegung je nach der Form der Gelenkflächen verändert, aber der Charakter der Bewegung unverändert bleibt. Die im höheren Alter fast immer anwesende Arthrose führt durch die Destruction des Gelenkknorpels und die Verminderung seiner Elastizität zur Einschränkung der Bewegung. Nach unserer Beobachtung kommt bei der von PATURET [12] »nutation« bzw. »contre-nutation« genannten Bewegung des Sacrums die Verschiebung nicht in rein sagittaler Richtung zustande. In unseren Untersuchungen entspricht der »contre-nutation« des Sacrums die auf Hyperextension des Hüftgelenks eintretende Verschiebung. In diesem Fall ist die nach hinten und oben gerichtete Bewegung der Sacrumbasis von der lateralen Verschiebung des vorderen Teils der Hüftpfanne begleitet. Bei der »nutation« folgt der nach vorn und unten gerichteten Bewegung der Sacrumbasis die medial gerichtete Verschiebung des vorderen Abschnitts der Hüftpfanne. Diese von uns beobachteten Bewegungen bestätigen die Feststellung von MEYER [11], daß die sakroiliakale Gelenkfläche vom Gesichtspunkt der Bewegung als Teil von zwei entgegengesetzten Schraubengewinden aufgefaßt werden könne.

*

Wollen wir aus den von uns wahrgenommenen Bewegungen auf die Veränderung der Beckendurchmesser Schlüsse ziehen, so können wir neben der Bestätigung der früheren Feststellungen die einschlägigen Angaben noch dahingehend ergänzen, daß in der sog. Hängelage außer dem geraden Durchmesser des Beckeneingangs auch der Querdurchmesser größer wird.

Die Bewegung des Hüftgelenks beim Gehen löst eine Mitbewegung im Sakroiliakalgelenk aus, wozu sich noch die Rotationsbewegung des V. Lumbalwirbels gesellt. Beim Gehen kommt infolge der gegensätzlichen Bewegung der Hüftgelenke auch in den bilateralen Sakroiliakalgelenken eine Bewegung in gegensätzlicher Richtung zustande. In der Hyperextensionsphase des Schrittes bewegt sich die Hüftpfanne derselben Seite nach vorn und lateralwärts, zugleich ist die Hüftflexion auf der anderen Seite von der Verschiebung der Hüftpfanne nach hinten und medialwärts begleitet. Im Gegensatz zu ILLI [6] fanden wir, daß die Rotationsbewegung des V. Lumbalwirbels in entgegengesetzter Richtung vor sich geht. Bei der Hyperextension des Hüftgelenks

verschiebt sich der Processus transversus der gleichen Seite des V. Lumbalwirbels nach hinten.

*

Unter unseren Versuchsbedingungen war die Bewegung im Sakroiliakalgelenk nach Durchtrennung der Symphyse nicht oder kaum verändert, während die Bewegungen nach Durchtrennung der hinteren Sakroiliakalbänder größer wurden. Auch diese Tatsache zeigt, daß den hinteren starken Bändern eine sehr wichtige Rolle in der sakroiliakalen Verbindung zukommt. Im Krankheitsbild der Beckenringlockerung bildet die Lockerung dieser Bänder die pathologische Grundlage, die entweder nach Symphyseolyse oder infolge Lokkerung der Symphyse zustande kommt. Bei der Symphysenlockerung sind die sakroiliakalen Verbindungen stärker in Anspruch genommen, und noch vor Lockerung des Bandapparates kann die Spannung der Bänder Schmerzen auslösen. Nach Dehnung der Bänder werden die Beschwerden von der krankhaften Verschiebung im Gelenk, von der Fixierung in der geänderten Lage hervorgerufen. Auf Grund der Form der sakroiliakalen Gelenkfläche und der im Gelenk festgestellten Bewegungsmöglichkeit scheint uns die Annahme der Chiropraktiker bestätigt, daß nach forcierter Bewegung oder Lockerung des Bandapparates auch nach den üblichen Bewegungen pathologische Verschiebungen und Fixierung in pathologische Lage im Gelenk vorkommen können.

*

Es ist schwer, diesen pathologischen Zustand zu erkennen und von den anderen Ursachen der Kreuzschmerzen zu differenzieren, denn einen sicheren Anhaltspunkt könnte nur die in der Röntgenaufnahme sichtbare Verschiebung, die Entfernung der Gelenkflächen voneinander geben. Unter unseren experimentellen Bedingungen haben wir mit dem Auseinanderziehen der Symphyse bzw. ihrer Verschiebung in kranio-kaudaler Richtung eine größere Bewegung herbeigeführt, als klinisch im allgemeinen wahrzunehmen ist. Trotzdem ist eine gesteigerte Entfernung der Gelenkflächen voneinander oder ihre Verschiebung weder auf der Übersichts- noch in der Spaltenaufnahme des Sakroiliakalgelenks zu sehen. Noch weniger darf man dies bei der Untersuchung in vivo erwarten, wo die Herstellung der Aufnahme technisch schwieriger ist. Aus unseren Röntgenuntersuchungen ziehen wir folgende Schlüsse. Die Übersichts- und Spaltenaufnahmen eignen sich zur Klärung der auf die Knochen lokalisierten Prozesse. Ein zuverlässigeres und besser bewertbares Symptom der Lockerung des Sakroiliakalgelenks in der Röntgenaufnahme ist die bei halbseitiger Belastung zustande kommende Symphysenverschiebung, worauf im übrigen KAMIETH und REINHARDT [7] bereits hingewiesen haben.

Zusammenfassung

Die Untersuchung der Beweglichkeit des Sakroiliakalgelenks an Leichen und ihre kymographische Registrierung ergab, daß im Gelenke eine der Hyperextension und Flexion des Hüftgelenks folgende regelrechte Mitbewegung vor sich geht. Die Richtung der Bewegung ist konstant, ihre Größe erweist jedoch bedeutende individuelle Variationen. Nach Durchtrennung der Symphyse und der hinteren Sakroiliakalbänder wird die Bewegung größer. Auf Grund der Zusammenhänge zwischen den Bewegungsverhältnissen des Sakroiliakalgelenks und der Form der Gelenkflächen darf angenommen werden, daß eine krankhafte Verschiebung im Gelenk zustande kommen und das Gelenk in pathologischer Stellung fixieren kann. In der Übersichts- und Spaltenaufnahme des Beckens gibt die pathologische Verschiebung oder die gesteigerte Bewegung keine bewertbare Abweichung, man kann aber aus der ungleichen Stellung der Symphyse Rückschlüsse ziehen.

LITERATUR

1. Bársony, Th., Schulhof, Ö.: (1931) Wie liegt das Sakroiliakalgelenk im Röntgenbilde? Röntgenpraxis *3*, 313. — 2. Fick, R.: (1911) Handbuch der Anatomie und Mechanik der Gelenke. Fischer, Jena. — 3. Frick, W.: (1957) Die Darstellung der Sacroiliacalgelenke im transversalen Schichtbild. Stratigrafia — Planigrafie — Tomografie — Laminagraphy — Estratigrafia *2*, 216. — 4. Gegenbaur, C.: (1898) Vergleichende Anatomie der Wirbelthiere. Engelmann, Leipzig. — 5. Happel, P.: (1922) Das Sakroiliakalgelenk im Röntgenbild nach Alter und Geschlecht. Arch. orthop. Unfall-Chir. *20*, 576. — 6. Illi, F. W. H.: (1953) Wirbelsäule, Becken und Chiropraktik. Haug, Saulgau. — 7. Kamieth, H., Reinhardt, K.: (1955) Der ungleiche Symphysenstand. Ein wichtiges Symptom der Beckenringlockerung. Fortschr. Röntgenstr. *83*, 530. — 8. Klein, G.: (1891) Zur Mechanik des Ileosakralgelenkes. Z. Geburtsh. Gynäk. *21*, 74. — 9. Kovács, Á.: (1953) Die sakroiliakale Spaltenaufnahme. Röntgenpraxis, *7*, 763. — 10. Meese, Th.: (1956) Die dorsoventrale Aufnahme der Sacroiliakalgelenke. Fortschr. Röntgenstr. *85*, 601. — 11. Meyer, H.: zit. *Fick, R.* — 12. Paturet, G.: (1951) Traité d'Anatomie Humaine. Masson, Paris. — 13. Untereiner, J.: (1951) Die Röntgendiagnostik des Sakroiliakalgelenkes. Z. Orthop. *80*, 656. — 14. Weisl, H.: (1954) The Ligaments of the Sacroiliac Joint Examined with Particular Reference to their Function. Acta anat. (Basel) *20*, 201. — 15. Weisl, H.: (1955) The Movements of the Sacro-Iliac Joint. Acta anat. (Basel) *23*, 80. — 16. Zöllner, F.: (1930) Untersuchungen über die Erscheinungsformen der Arthritis deformans in den Sacroiliacalgelenken. Virchows Arch. path. Anat. *277*, 817.

ДАННЫЕ К ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АНАТОМИИ КРЕСТЦОВО-ПОДВЗДОШНОГО СУСТАВА

Ч. ВАРАБАШ, О. БАРТА, Л. З. САБО и Т. ВИЗКЕЛЕТИ

При исследовании движений в крестцово-подвздошномо суставе на трупах и при запаси этих движений кимографом было установлено, что в суставе наблюдается последующая чрезмерному разгибанию и сгибанию регулярная синкинезия. Направление движения постоянное, но в отношении размера наблюдаются значительные индивидуальные отклонения. Движение повышается после пересечения симфиза и задних крестцово-подвздошных связок. На основании возможности движения и формы поверхностей сустава кажется доказанным, что в суставе могут произойти патологическое смещение и фиксация в патологическом положении. Разрыхление тазового кольца и патологическое смещение можно распознавать на рентгеновском снимке из неодинакового положения симфиза.

DONNÉES SUR L'ANATOMIE FONCTIONELLE DE L'ARTICULATION SACROILIAQUE

CS. BARABÁS, O. BARTA, L. Z. SZABÓ et T. VIZKELETY

Examinant le mouvement de l'articulation sacro-iliaque sur des cadavres et on l'enregistrant par le kymographe, les auteurs ont pu établir, que suivant à la hyperextension et flexion de l'articulation sacro-iliaque, il existe un mouvement régulièrement synchron dans l'articulation. La direction du mouvement est constante, mais il y a beaucoup de variations individuelles en ce qui concerne les grandeurs. Le mouvement s'accroît après le sectionnement de la symphyses et des ligaments sacro-iliaques postérieurs. Sur la base des connections existantes entre les mouvements de l'articulation s. i. et la forme des surfaces articulaires on peut présumer, qu'un mouvement pathologique survient dans l'articulation. Cette dernière peut se fixer dans une position pathologique. Le déplacement pathologique, ou l'augmentation du mouvement ne se traduisent par des anomalies appréciables ni sur la radiographie inspective du bassin, ni sur la radiographie à fente, mais on peut y conclure de la position inégale de la symphyse.

Dr. Csaba BARABÁS, Dr. Ottó BARTA, Budapest XI. Karolina út 27.
Dr. László Z. SZABÓ, Budapest IX. Tűzoltó u. 58.
Dr. Tibor VIZKELETY, Budapest XI. Karolina út 27. Ungarn

Department of Anatomy (Director: Prof. F. Kiss), University Medical School, Budapest

ANALYSIS OF THE STAINING PROPERTIES OF ACRIDINE ORANGE IN EPITHELIAL CELLS

T. Donáth and I. Lengyel

(Received November 6, 1959)

Classical histology has been enriched with new histotopochemical features by the introduction of fluorescence microscopy. The use of the fluorescence microscope covers a wide range, and a special field consists of the utilization of fluorescent dyes for the investigation of tissue structures. While a great number of fluorochromes is known, only a few of these dyes are being employed. This must be attributed to the fact that the staining and physico-chemical properties of many fluorescent dyes have not been properly elucidated and we are still ignorant of the possibilities concerning the differentiation of fluorochromes; nor do we know those biochemical structures which — forming physical connections or chemical reactions with the dye molecules — emit specific rays of light if exposed to ultraviolet irradiation.

Acridine orange is the most extensively used fluorochrome. Literature contains very controversial reports on its staining properties. Considering that contradictory interpretations of the mechanism of staining lead to different evaluations of the results obtained, we have designed experiments with a view to arriving at definite conclusions regarding the histochemical reactions of acridine orange. It was hoped that they would enable us to facilitate an unequivocal interpretation of the microscopic picture of preparations stained.

It is claimed by British and North American authors (Armstrong, Bertalanffy, De Bruyn, Hendley, Morthland, Steiner-Beers) that

(i) on account of its adequately located amino groups, acridine orange may be bound to any tissue structure of free acid character;

(ii) in a medium with an adequate pH, DNA and RNA emit different colours;

(iii) the binding of acridine orange to structures of an acid character is not merely due to the interaction between acid and basic radicals but also, and in the first place, to complex formation;

(iv) the reactivity of acridine dyes to nucleic acids is considerably diminished by the enzymatic degradation of the latter;

(v) it is the nature of the reaction which determines the colour of the dissolved dye.

German authors (KRIEG, KREBS-GIERLACH, SCHULER, SCHÜMMELFEDER, STRUGGER, ZEIGER) on the other hand declare that

(i) apart from nucleic acids, it is only to mucopolysaccharides that acridine orange displays affinity;

(ii) of the nucleic acids, DNA and RNA stain differently in a medium with an adequate pH;

(iii) the binding of the dye is partly electrostatic, chemical, and partly adsorptive, physical;

(iv) depolymerized and poorly polymerized nucleic acids are staining similarly to RNA;

(v) the colour of the dye solution is determined by its concentration and the degree of its dissociation.

We instituted the following experiments with the object to reconcile these differing opinions.

Method

Using the vaginal secretion of women between 20 and 30 years of age who were in the same hormonal cycle (follicular phase), we performed our experiments on morphologically uniform epithelial cells with non-pycnotic nuclei, from the second superficial layer.

1. The dye was dissolved in distilled water resp. 96 per cent ethyl alcohol, at pH 7. The light emitted by various concentrations (1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10,000, 1 : 100,000, 1 : 1,000,000) of the solution in ultraviolet resp. blue light was studied *in vitro*. Estimation was performed in 100 ml cuvettes with a Zeiss standard arc lamp as the source of light, 5 per cent acid copper-sulphate as the heat filtre and an 1.5 mm *UG*1 (Schott) filtre for ultraviolet rays resp. a 4 mm BG4 filtre for blue light. The colour of the emitted light was compared with the naked eye to a standard colour scale in incident light.

2. Unfixed cells of the vaginal epithelium as also cells fixed in ether-alcohol in a wet state were stained with each of the said solutions. Time of staining was 3 minutes in every case, followed by rinsing with distilled water or alcohol.

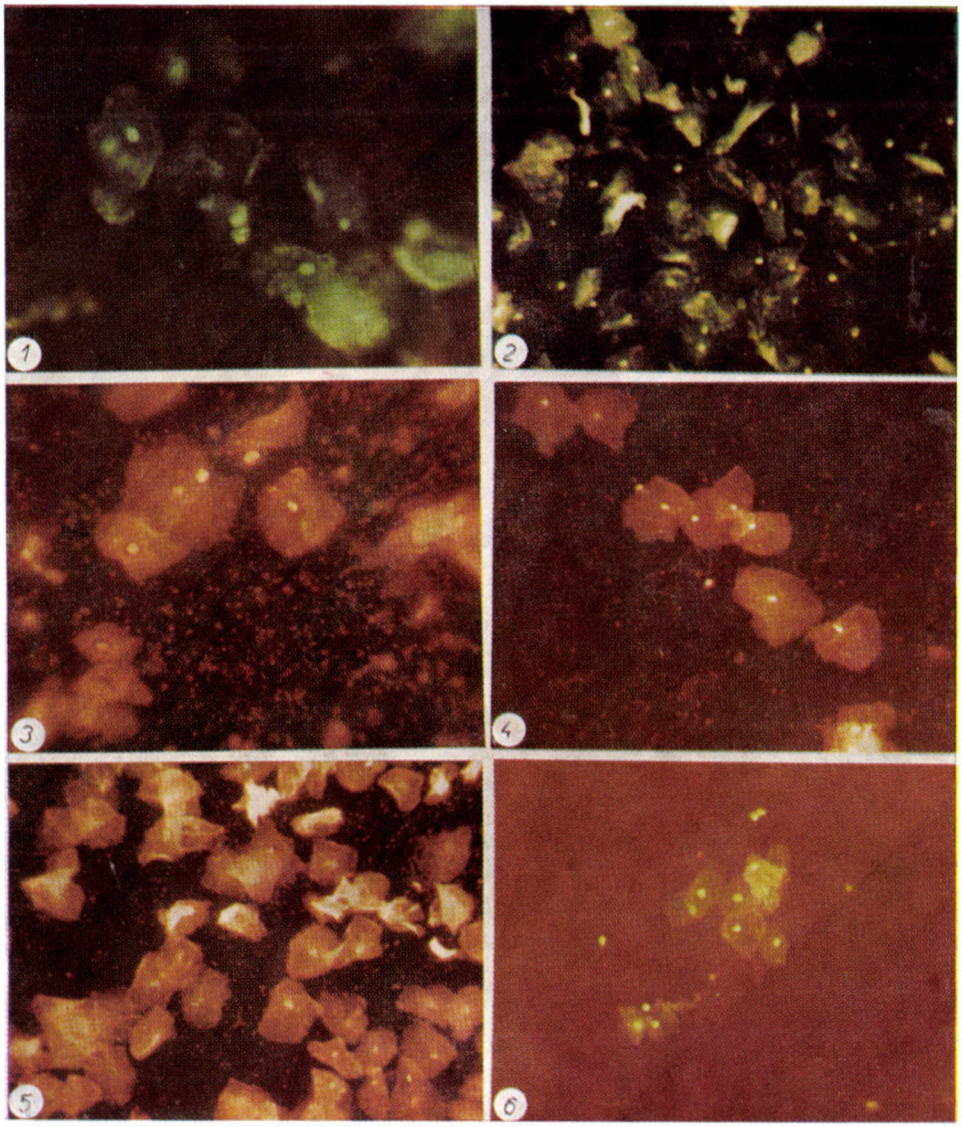
3. We studied the light emitted by the aqueous and alcoholic solution (concentration 1 : 10,000, pH from 2 to 9) of the dye under exposure to ultraviolet rays and blue light. Solutions of sodium tetraborate resp. oxalic acid and potassium hydrocarbonate, mixed in adequate proportions, served as buffer. The pH of the buffered dye solutions was determined by means of an electric apparatus adjusted to an accuracy of ± 0.05.

4. Unfixed vaginal epithelial cells and cells fixed in a wet state in ether-alcohol were stained simultaneously with each of the above solutions. Unfixed cells were examined in a wet chamber. A buffer solution, adjusted to the same pH as the dye solution, was used for covering the preparations. Fixed smears, after having been rinsed with a buffer solution of adequate pH, were left to dry at room temperature.

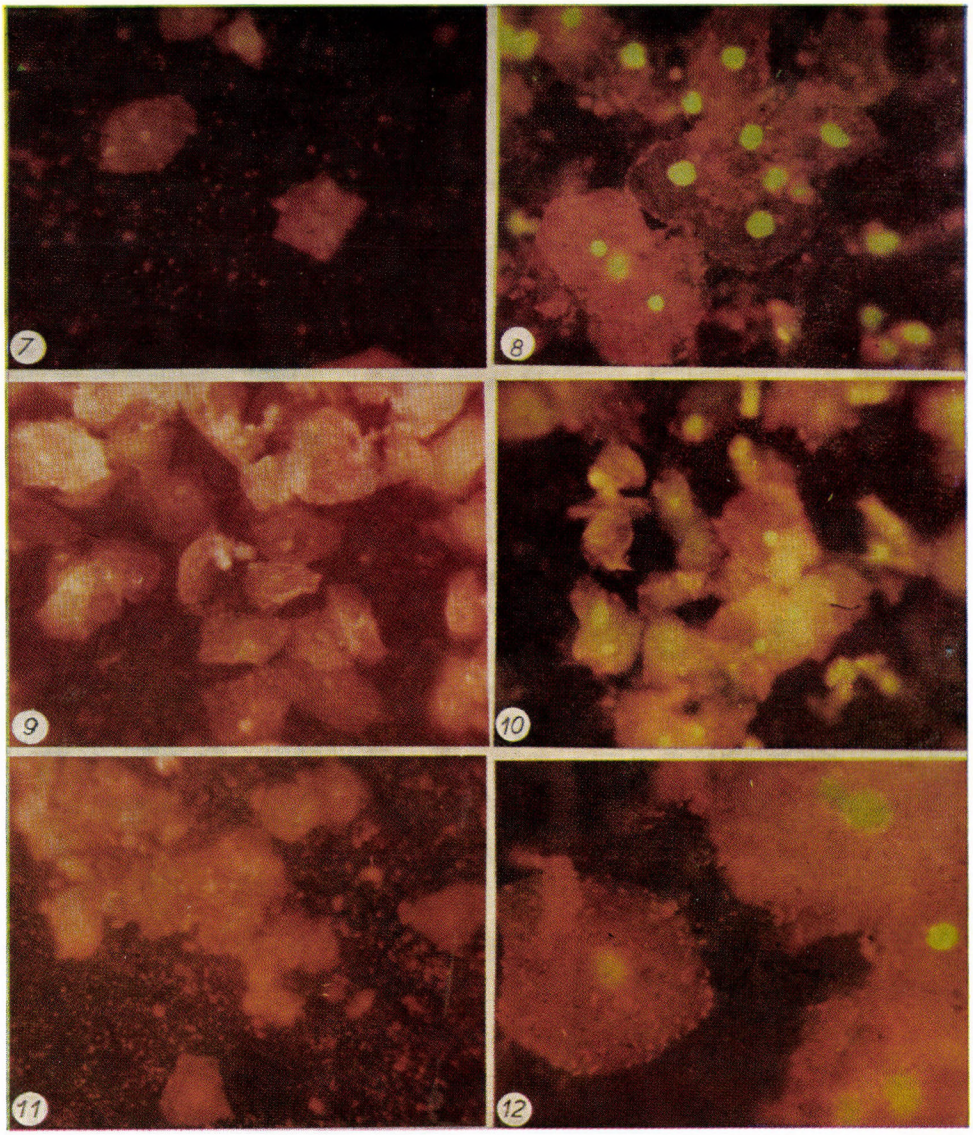
5. To ascertain the specificity of acridine orange for nucleic acids, we observed the staining of fixed and unfixed epithelial cells by an 1 : 10,000 aqueous dye solution

(a) after the digestion of DNA,
(b) ,, ,, ,, ,, RNA,
(c) ,, ,, ,, ,, both DNA and RNA,
(d) ,, resynthesis and repolymerization by means of active ATP, subsequent to enzymatic degradation.

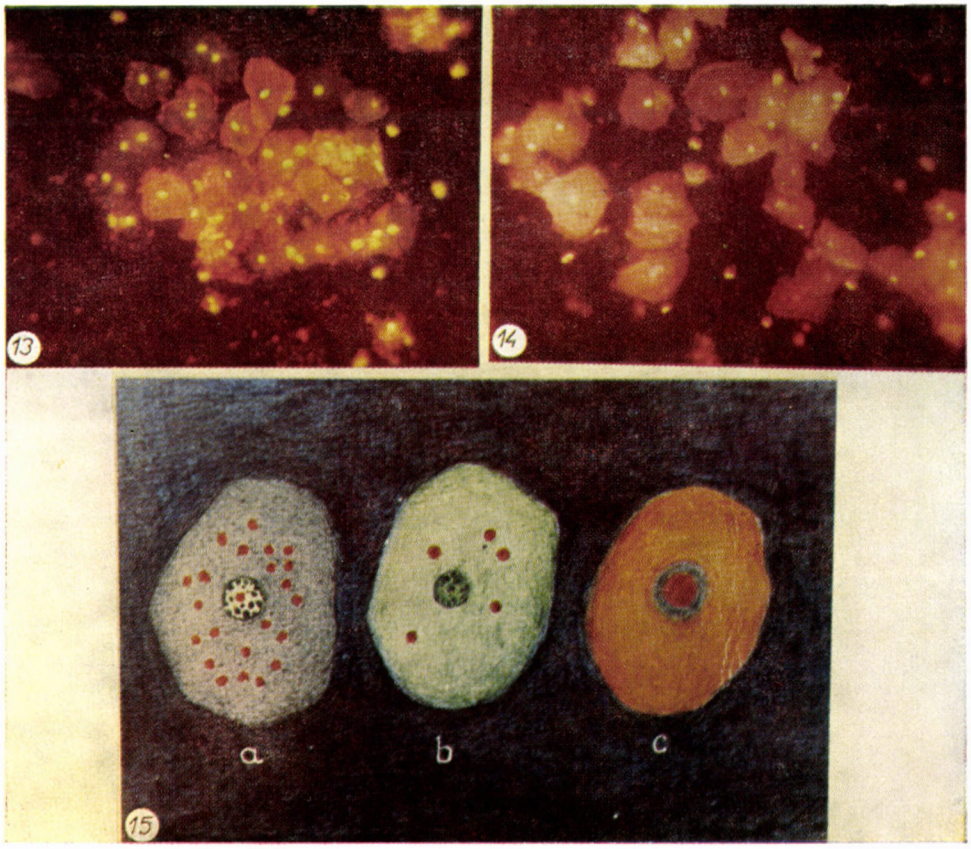
Enzymatic degradation of DNA was achieved by freshly dissolved crystalline desoxyribonuclease applied for an hour in a concentration of 0.005 per cent, at 37° C. The desoxyribonuclease was dissolved in a veronal-acetate buffer of pH 7.4, which contained 0.01 per cent gelatin and 0.003 molar magnesium sulphate. Following digestion, the preparations were stained with acridine orange 1 : 10,000, at pH 2, 6.7 and 9.



1—4. Fixed cells of vaginal epithelium stained with acridine orange solutions at pH 2, 5, 6 and 9
5. Fixed vaginal smear. Staining at pH 6
6. Fixed vaginal smear. Staining at pH 6 followed by alcoholic extraction



7. Fixed epithelial cells stained at pH 7
8. Unfixed wet-chamber preparation stained at pH 7
9. Preparation stained at pH 2 after digestion by desoxyribonuclease
10. Preparation stained at pH 9 after digestion by ribonuclease
11. Preparation stained at pH 6.7 after complete digestion by desoxyribonuclease
12. Preparation stained at pH 6.7 after partial digestion by desoxyribonuclease



13. Digestion with desoxyribonuclease and resynthesis with ATP. pH of dye solution, 6.7
14. Digestion with ribonuclease and treatment with ATP. pH of dye solution, 6.7
15. Staining of living, dying and dead epithelial cells
(a) Green fluorescence: chromatic substance; red fluorescence: nucleolus. No cytoplasmic fluorescence. The majority of red granules is dye stored by the living cell; some of the cytoplasmic red granules consist of RNA
(b) Green cytoplasmic fluorescence due to diffusely spread dye in low concentration. The few red granules in the cytoplasm represent RNA
(c) At high concentration, the dye is physically adsorbed to dead cells. Brilliant red cytoplasmic and nuclear fluorescence with a non-fluorescing plasmic zone around nucleus. RNA granules blotted by intensive plasmic fluorescence

A 0.02 per cent ribonuclease extract, prepared from homogenized small intestine applied in the above concentrations and under the said conditions, served for the enzymatic degradation of RNA.

Both enzyme solution — first the one and then the other — were applied for the combined splitting of DNA and RNA. The technique was as described above, and the preparations were placed into an enzyme-free stock solution (veronal acetate, pH 7.4) for 3 minutes between the two digestions.

Digestion of DNA or RNA or of both having been completed, the preparations were kept in an active ATP solution (20 mg of ATP per ml) for 3 hours at 37° C, and then stained.

Acridine orange NO Gurr (C. I. No. 788) was used in the experiments.

Results

Ad 1 and 3

In vitro, all aqueous solutions of acridine orange between the dilutions of 1:100 (limit of solubility) and 1:1000 give purple, or red and orange-red fluorescence in ultraviolet or blue light. At dilutions above 1:1000 fluorescence

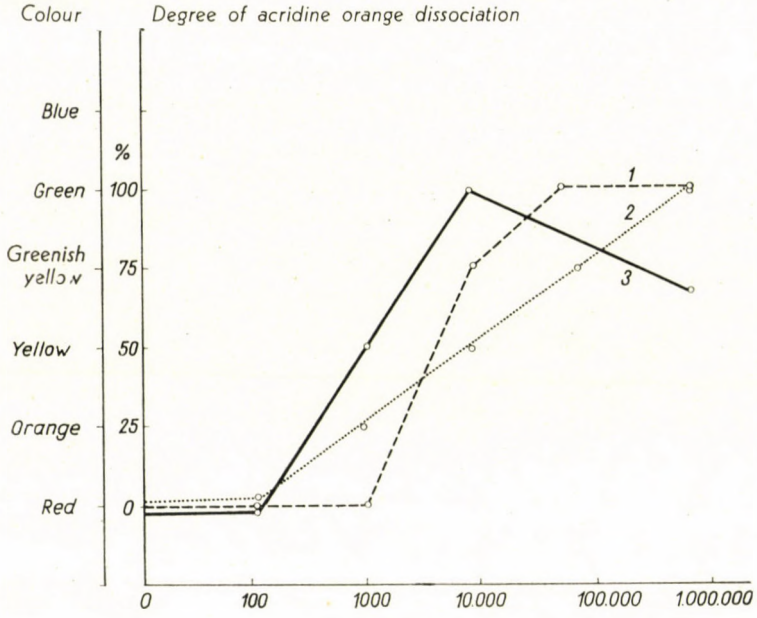


Diagramm. Curve 1 — — — —: fluorescence of dye in vitro
Curve 2 .....: dominant colours of the microscopic picture
Curve 3 ————: number of dissociated acridine orange molecules

turns into a yellowish green. Assuming various shades of green and greenish grey, the colour becomes paler and paler with increasing dilutions.

The dye dissolves considerably less readily in alcohol (limit, 1:10,000). Its fluorescence in ultraviolet and blue light is likewise yellowish green, green and greenish grey according to the degree of dilution.

The colour of the 1:10,000 aqueous and alcoholic solutions depends greatly on the pH of the solvent. It is pale green or yellowish green in the pH range of 2—3, greenish yellow in that of 4—7, and is shifted towards orange red in the range of 8—9.

Ad 2

Fixed and unfixed preparations give more or less the same fluorescence with different concentrations of the dye. Stained with a solution of 1:1000, the epithelial cells emit a homogeneous red colour. A differential pattern results on staining with acridine orange diluted at 1:10,000; nuclear fluorescence is yellowish green, cytoplasmic fluorescence is dark green with red granules (in unfixed preparations). At concentrations of 1:100,000 and 1:1,000,000 fluorescence is an uniform green.

Treatment with an alcoholic solution of 1:100 results in an uniform green fluorescence and only superficially situated Döderlein's bacilli and the nuclei of certain leucocytes give a red fluorescence. At 1:1000 even this red fluorescence disappears, while the hue of the green fluorescence becomes deeper. Only dark green and greenish grey fluorescence is observable beyond the dilution of 1:10,000.

Ad 4

It is up to pH 5 that 1:10 000 aqueous solutions of the dye yield differentiated and reliable pictures. The nucleus of the epithelial cells gives a moderate pale green fluorescence, the cytoplasm is dark green with red granulations, superficial Döderlein's bacilli show a brilliant red fluorescence. Red becomes dominant at pH 6: the nuclei emit a pale red, while the cytoplasm of the epithelial cells a greenish brown colour. In the pH range of 6.9 only red fluorescence, then a deepening of this colour and an increase in the intensity of fluorescence occur.

With alcoholic solutions, the sequence of the emitted colours is similar but shifted by two pH degrees towards alkalinity in favour of green. By using a 20 per cent alcoholic solution of pH 7 or an aqueous buffer of acid pH, it is possible to differentiate the excess dye from preparations stained at strongly alkaline pH. No such elimination is possible in the reverse case, i. e. in that of preparations stained at an acid pH.

Ad 5

On the digestion of desoxyribonuclease, the green fluorescence disappears almost completely even below pH 6: both nuclear and cytoplasmic fluorescence are pale red. Above pH 6 the intensity of red fluorescence increases. In case of

incomplete desoxyribonuclease digestion (*i. e.* one of 45 minutes) the cytoplasm is pale red at a time when the nucleus still gives green fluorescence. It does not become pale red until after complete digestion, *i. e.* in about 90 minutes. Treatment with ribonuclease gives uniformly green fluorescence at pH 6.7: the nucleus and Döderlein's bacilli stain light, the cytoplasm dark green, and it is only above the inversion zone, near the neutral point, that a red fluorescence appears. Combined digestion with desoxyribonuclease and ribonuclease reduces the intensity of fluorescence and the morphological pattern also becomes indistinct. A homogeneous red fluorescence comes to dominate the picture at values above pH 7.

Our attempts at resynthesis by means of ATP resulted in that both nuclear and cytoplasmic fluorescence became green again and brilliant red granules appeared in the cytoplasm after digestion with desoxyribonuclease, while after ribonuclease digestion a red fluorescence was observed. The reappearing colours were much more brilliant than before resynthesis, in other words, the intensity of fluorescence was increased.

Discussion

Ad 1

It follows from our first experiment that the spectrum emitted by acridine orange in ultraviolet or blue light varies according to the proportion of dissociated and non-dissociated dye molecules per units of the solvent. At low concentrations the number of dye molecules per unit is small and they are dissociated. Ionized, dissociated dye solutions give a green fluorescence.

Beyond a certain degree of concentration, dissociation is mutually inhibited by the molecules contained in the solution. In other words, there exists a limit concentration at which the number of dissociated molecules per unit reaches a peak.

Increasing the concentrations, the number of dissociated molecules becomes less and less not only in proportion to the number of non-dissociated molecules but absolutely as well. At the concentration of 1:1000 the dissolved acridine orange is in the normal molecular state. Molecular dye solutions show a red fluorescence.

Ad 3

We examined the connection between pH and fluorescence at a given dye concentration. One member of the buffered dye solution was the solvent, the other the dye. According to the law regarding the dissociation of buffer systems, acidly buffered solvents promote the dissociation of the acridine orange molecules, these being of an alkaline character and the fluorescence is

green in such cases. On the other hand, solvents treated with alkaline buffers inhibit dissociation of the likewise alkaline dye, and the fluorescence is red in such cases.

Thus, the colour of fluorescence of acridine orange *in vitro* depends on the dissociation of the molecules, since the degree of concentration and the changes in pH are both affecting dissociation.

Ad 2 and 4

Our further experiments had the object to examine the binding of acridine orange by living, necrotizing and necrosed cells, at various concentrations and different pH values. Considering that fixation stabilizes a given histochemical state, it is not unessential in which vital phase the cells have been fixed. Permeability being different in living, dying and dead cells, they take up different amounts of dye from solutions of identical concentration and pH.

Living cytoplasm does not stain and gives no fluorescence. Acridine orange, being alkaline, appears in the cytoplasm of the living cell in the form of masses and its red fluorescence is misleadingly similar to that of RNA granules.

Examined in a wet chamber, necrotizing epithelial cells show a green cytoplasmic fluorescence. We think that the dye which stains the cytoplasm of these cells a diffuse green is quantitatively equal to the aggregated dye observed in living cells.

The cytoplasm of necrosed cells displays a diffuse red fluorescence.

Its substance being DNA, the nucleus of living cells gives a green fluorescence in the pH range of 2—6, and a red one above pH 6. Since the selective permeability of the cell membrane disappears with the death of the cell, Strugger's concentration effect causes their nucleus to fluoresce red already at pH 6.

Ad 5

A mixture consisting principally of mononucleotides and, to a smaller extent, of oligonucleotides is formed from the ribonucleic acids under the prolonged action of ribonuclease which causes the decomposition of the 3′-phosphate bond of pyrimidine nucleotides. Prolonged action of desoxyribonuclease on the other hand induces the formation of oligonucleotides consisting of several members. Being of alkaline character, these products possess no affinity to acridine orange. The paucity in colour of the microscopic pictures observed after combined digestion with both enzymes may be due to this circumstance.

A partial disintegration of the polymeric structure of nucleic acids occurs if desoxyribonuclease is allowed to act for a short time only. A disruption of the sequence of linked long basic chains seems to affect the hydrogen bonds,

which stabilize the relative position of the chains, in such a manner as to promote their readiness for dissociation. This acidifies the entire system so that its affinity to acridine orange is increased, its staining properties become similar to those of RNA and its fluorescence becomes red. This would well explain why desoxyribonuclease was seen in our experiments to cause the disappearance of green and the intensification of red fluorescence. Apart from the existing RNA structures, depolymerized DNA molecules too, give a red fluorescence.

The first to lose its affinity to acridine orange is the RNA in the nucleoli while RNA in the cytoplasm is much more resistant to enzymatic action. This would confirm the correctness of observations that seem to point to a difference in the molecular structure of nucleolar and cytoplasmic RNA.

As regards our attempts at repolymerization, we refer to the statement of GRUNBERG and MANAGO who claim that polynucleotide phosphorylase performs the degradation and synthesis of nucleic acids in a reversible manner with the aid of the corresponding nucleotide diphosphate. Reaction tends towards the synthesis of nucleic acids when phosphate is split off and towards decomposition when phosphate is taken up. What occurs in the course of reaction is not merely a simple resynthesis, a reunion of split nucleic acids, but repolymerization as well. It is safe to suppose that — if the reaction is capable of producing from any nucleotide diphosphate the polymer of the corresponding nucleic acid — also high nucleic acid polymers or, possibly, even nucleic acids with a different basic chain sequence may be formed. This would explain that characteristic brightening of colours which occurred in all our resynthesis experiments.

When interpreting our results of resynthesis the possibility of a simple adsorption of ATP molecules to the split nucleic acids might arise. This was, however, disproved by the observation that the staining capacity of acridine orange was not intensified by raising the concentration of ATP.

*

Our experimental results allow to distinguish three components in the staining effect of acridine orange.

(I) The dye, if applied in an alkaline medium or in a molecular state in concentrated solutions is adsorbed to any morphological element. The bond so formed is of a physical nature, and the fluorescence is red in colour.

(II) The dye, if applied in an acid medium or in an ionized state in solutions of low concentration, can be linked with any morphological element of acid character. Green fluorescence results from this non-specific salt linkage. The red fluorescence seen in the preparations is due to a complex having been formed between dye and RNA.

(III) After the disruption of the said physical and salt linkages, or in strongly acid media, a complex is formed between the dissociated dye molecules and the DNA and RNA molecules. This process is influenced by the extent of nucleic acid depolymerization. No other chemical structures are stained any longer in this case, and the fluorescence given by DNA is green, that by RNA red.

Summary

The staining effect of acridine orange both *in vitro* and in exfoliated fixed and unfixed vaginal epithelial cells has been investigated with special regard to the histochemical reactions of the dye. The demonstrability of nucleic acid by means of acridine orange is claimed on the evidence of experiments with enzymatic degradation. Differences in the reaction of living, necrotizing and necrosed cells to acridine orange at different concentrations and pH values are discussed. The practically complete bibliography on acridine orange is presented.

REFERENCES

1. ALEXANDROV, W.: (1932—33) Über die Bedeutung der oxidoreductiven Bedingungen für die Vitalfärbung mit besonderer Berücksichtigung der Kernfärbung in lebendiger Zellen. Protoplasma *17*, 161. — 2. D'AMATO, F.: (1950) Fluorescence staining of nucleic acids. Caryologia *2*, 274. — 3. ANDERSON, E. S., ARMSTRONG J. A. and NIVEN Janet S. F.: (1959) Fluorescence microscopy: Observation of virus growth with aminoacridines. Symp. Soc. gen. Microbiol. *9*, 224. — 4. ANFINSEN, C. R. and REDFIELD, R. R.: Protein structure in relation to function and biosynthesis. Adv. Protein Chem. *11*, 1—93 (1956). — 5. ARMSTRONG, J. A.: (1956) Histochemical differentiation of nucleic acids by means of induced fluorescence, Exp. Cell Res. *11*, 640. — 6. ARMSTRONG, J. A.: (1957) Further comments on tissue fluorescence induced by acridine orange. R. J. Anat. *91*, 570. — 7. ARMSTRONG, J. A.: (1957) Fluorescence microscopy in the study of nucleic acids. Nature (Lond.) *180*, 1335. — 8. ARMSTRONG, J. A. and NIVEN Janet S. F.: (1957) Histochemical observations on cellular and virus nucleic acids. Nature (Lond.) *181*, 505. — 9. ARMSTRONG, J. A. and HOPPER, P. K.: (1959) Fluorescence and phase contrast microscopy of human cell cultures infected with adenovirus. (In the Press.) — 10. BARKER, G. R., MONTAGUE, M. D., MOSS, R. J. and PARSONS, Margaret A.: (1957) Biosynthesis of polynucleotides. Part I.: The mode of action of ribonuclease. J. chem. Soc. *57*, 3786. — 11. BEERS, R. F. Jr., HENDLEY, D. D. and STEINER, R. F.: (1958) Inhibition and activation of polynucleotide phosphorylase through the formation of complexes between acridine orange and polynucleotides. Nature (Lond.) *182*, 242. — 12. BERTALANFFY, L. von, and BICKIS, I.: (1956) Identification of cytoplasmic basophilia (ribonucleic acid) by fluorescence microscopy. J. Histochem. Cytochem. *4*, 481. — 13. BERTALANFFY L. von, MASIN, F. and MASIN, M.: (1956) Use of acridine orange fluorescence technique in exfoliative cytology. Science, *124*, 1024. — 14. BERTALANFFY L. von, MASIN, M., MASIN, F. and KÁPLÁN, L.: (1957) Detection of gynecological cancer by use of fluorescence microscopy to show nucleic acids in malignant growth. Calif. Med. *87*, 248. — 15. BETHE, A.: (1952) Allgem. Physiol. Springer, Berlin. — 16. BRACHET, J.: (1947) Nucleic acids in cell and embryo. Symp., Soc. exp. Biol. *1*, 207. — 17. BRACHET, J.: (1953) The use of basic dyes and ribonuclease for the cytochemical detection of ribonucleic acids. Quart. J. micr. Sci. *94*, 1. — 18. BRACHET, J.: (1957) Biochemical cytology. Academic Press, New York. — 19. BROWN, D. M., HEPPEL, L. A. and HIIMSE R. J.: (1954) Nucleotides. Part XXIV. The action of some nucleases on simple esters of mononucleotides. J. chem. Soc. *40*, 46. — 20. BOGEN, H. J., KESER, M.: (1954) Eiweiß-Abbau durch Akridinorange bei Hefezellen. Physiol. Plantarum (Kopenh.) 7, 446. — 21. BUKATCH, F., HAITINGER, M.: (1940) Beiträge für Fluoreszenzmikroskopischen Darstellung des Zellinhaltes, insbesondere des Cytoplasmas und des Zellkerns. Protoplasma *34*, 515. — 22. CASPERSSON, T.: (1934) Ultraviolett mikroskopien och dess anwendings omraden. Nord. Med. 7, 337. — 23. CASPERSSON, T.: (1937) Die Absorptionsmessung im mikroskopischen Präparat als mikrochemische Methode. Skand. Arch. Physiol. *77*, 23. — 24. CASPERSSON, T.: (1940) Methods for the determination of the absorptions spectra of cell structures. J. roy. micr. Soc. *60*, 8. — 25. CLARK, A. M.: (1953) The mutagenic activity of dyes in Drosophila melanogaster. Amer. Nat. *87*, 295. — 26. DAVIES, H. G.: (1954) The action of fixatives on the U. V. absorbing

components of chick fibroblasts. Quart. J. Micr. Sci. *95*, 433. — 27. De Bruyn, P. P. H., Robertson, R. C. and Farr, R. S.: (1950) In vivo affinity of diaminoacridines for nuclei. Anat. Rec. *108*, 279. — 28. De Bruyn, P. P. H., Farr, R. S., Banks, H. and Morthland, F. W.: (1953) In vivo and in vitro affinity of diaminoacridines for nucleoproteins. Exp. Cell Res. *4*, 174. — 29. De Bruyn, P. P. H. and Smith, N. H.: (1959) Comparison between the in vivo and in vitro interaction of aminoacridines with nucleic acids and other compounds. (In the Press.) — 30. Ehrlich, P.: (1885) Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus. Eine farbenanalytische Studie. Akademie Verlag, Berlin. — 31. Eickhoff, W. and Schümmelfeder, N.: (1956) Fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen an der lebenden Rattenschilddrüse. Virchows Arch. path. Anat. *328*, 18. — 32. Einarson, L.: (1951) On the theory of gallocyanin-chromalaun staining and its application for quantitative estimation of basophilia. A selective staining of exquisite progressivity. Acta path. microbiol. Scand. *28*, 82. — 33. Erikson, R. O., Sachs, K. W. and Ogur, M.: (1949) Perchloric acid in the cytochemistry of pentose nucleic acid. Science *110*, 472. — 34. Fonda, G. R. and Seitz, F.: (1948) Preparation and characteristics of solid luminescent materials. John Willey and Sons. New York. — 35. Förster, Th.: (1951) Fluoreszenzorganische Verbindungen. Springer, Berlin. — 36. Gössner, W.: (1950) Zur Histochemie des Strugger Effektes. Verh. dtsch. path. Ges. *33*, 102. — 37. Gulland, J. M.: (1947) The structure of nucleic acids. Cold Spring Harbour Symp. quant. Biol. *12*, 95. — 38. Gulland, J. M.: (1951) The structures of nucleic acids. Symp. Soc. exp. Biol. (New York) 1. — 39. Gulland, J. M. and Jordan, D. O.: (1951) The macromolecular behaviour of nucleic acids. Symp. Soc. exp. Biol. (New York) 56. — 40. Haitinger, M.: (1938) Fluoreszenzmikroskopie. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig. — 41. Hamperl, H.: (1955) Fluoreszenzmikroskopie, Münch. med. Wschr. *65*, 1121. — 42. Hakim, A. A.: (1957) Enzymic heterogenity of cristalline ribonuclease. Arch. Biochem. *70*, 591. — 43. Heppel, L. A., Markham, R. and Hilmoe, R. J.: (1953) Enzymatic splitting of internucleotide linkages. Nature (Lond.) *171*, 1152. — 44. Heppel, L. A., Whitfeld, P. R. and Markham, R.: (1955) Nucleotide exchange reactions catalysed by ribonuclease and spleen phosphodiesterase. II. Synthesis of polynucleotides. Biochem. J. *60*, 8. — 45. Irvin, J. L. and Irvin, E. N.: (1954) The interaction of a 9-aminoacridine derivate with nucleic acids and nucleoproteins. J. Biol. Chem. *206*, 39. — 46. Iverson, R. N., and Giese, A. C.: (1957) Nucleic acid content and ultraviolet susceptibility of Tetrahymena pyriformis. Exp. Cell Res. *13*, 213. — 47. Jansson, N. and Lagerstedt, S.: (1957) Demonstration of ribonuclease activity in sections from Carnoy fixed rat pancreas. Experientia (Basel) *13*, 321. — 48. Kamenyev, J. F.: (1934) Der Einfluß von hypo-hypertonischen Lösungen auf die Struktur und Vitalfärbung der Epithelzellen des Amphibiendarmes (Rana temporalia, Triton taeniatus). Protoplasma *21*, 169. — 49. Kelley, E. G.: (1939) Reactions of dyes of cell substances. IV. Quantitative comparison of tissue nuclei and extracted nucleoproteins. J. Biol. Chem. *125*, 55. — 50. Kölbel, H.: (1947) Quantitative Untersuchungen über die Farbstoffspeicherung von Akridinorange in lebenden und toten Hefezellen und ihre Beziehungen zu den elektrischen Verhältnissen der Zelle. Z. Naturforsch. *26*, 382. — 51. Koenig, H.: (1950) Differential extraction of nucleic acids from mammalian nerve cells with perchloric acid. J. nat. Cancer Inst. *10*, 1346. — 52. Kosenow, W.: (1956) Lebende Blutzellen im Fluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskop. Acta Haemat. *4*, 1. — 53. Krebs, A. T. and Gierlach, Z. S.: (1951) Vital staining with the fluorochrome acridine orange and its application to radiobiology. Amer. J. Roentgenol. *65*, 93. — 54. Krieg, A.: (1953) Fluoreszenzanalyse und Fluorochromie in Biologie und Medizin. Klin. Wschr. *31*, 350. — 55. Krieg, A.: (1953) Fluoreszenzmikroskopische Nachweis von Kernäquivalenten in Bakterien. Naturwissenschaften *40*, 414. — 56. Krieg, A.: (1954) Mikroskopische Studien in vitro zur Zytologie der Hefezelle. Experientia (Basel) *10*, 172. — 57. Kunitz, M.: (1940) Crystalline ribonuclease. J. gen. Physiol. *24*, 15. — 58. Kurnick, N. B.: (1950) The quantitative estimation of DNA based on methyl-green-staining. Exp. Cell Res. *1*, 151. — 59. Kurnick, N. B. and Forster, M.: (1950) Reaction with DNA. Stoichiometry and behaviour of the reaction product. J. gen. Physiol. *34*, 147. — 60. Lagerstedt, S.: (1947) Ultraviolet spectrum of the proteinaceous inclusions in normal rat liver cytoplasm. Acta anat. (Basel) *3*, 265. — 61. Land, E. H., Blouth, E. R., Grey, D. S., Flower, M. S., Husek, H., Jones, R. C., Matz, Ch. and Merrill, D. P.: (1949) Colour translating U. V. microscope. Science *109*, 371. — 62. Lasnitzky, I. and Wilkinson, J. H.: (1948) The effect of acridine derivates on growth and mitosis of cells in vivo. Brit. J. Cancer *2*, 369. — 63. Lawley, P. D.: (1956) Interaction studies with DNA. IV. The binding of 5-aminoacridine studied fluorometrically and its comparison with the binding of rosaniline. Biochim. biophys. Acta *22*, 451. — 64. Levaditi, J. C.: (1944) Étude comparée de la fluorescence provoquée chez les bactéries par la thioflavine ou par l'orange d'acridine. C. R. Soc. Biol. (Paris) *138*, 136. — 65. Levaditi, J. C., Lépine, P. and Augier, J.: (1948) Étude au moyen de la microscopie en fluorescence des inclusions intracellulaires acridophiles provo-

quées par les virus de la rage, de la vaccine, de la maladie de Borna. C. R. Acad. Sci. (Paris) *227*, 1061. — 66. LEVADITI, J. C. and PANTHIER, R.: (1945) La microscopie en fluorescence de Rickettsia prowazeki, C. R. Soc. Biol. (Paris) *139*, 890. — 67. LEUCHTENBERGER, C., LEUCHTENBERGER, R. and DAVIES, M.: (1954) A microspectrophotometric study of the DNA content in cells of normal and malignant human tissues. Amer. J. Pathol. *30*, 65. — 68. LOESER, CH.: (1955) Vital staining with aminoacridines. Fed. Proc. *14*, 245. — 69. MCDONALD, M. R.: (1955) Ribonucleases. In Methods in Enzymology Vol. 2. Academic Press, New York. — 70. MCDONALD, M. R. and KAUFMANN, B. P.: (1954) The degradation by ribonuclease of substances other than ribonucleic acid. J. Histochem. Cytochem. *2*, 387. — 71. MARSHALL, J.: (1934) A note on the preparation of pure acriflavine. Quart. J. Pharm. *7*, 514. — 72. MASSART, L. G., PEETERS, G. and LAGRAIN, A.: (1947) The uptake of acridine cell substances. Arch. int. Pharmacodyn. *75*, 141. — 73. MASSART, L. G., PEETERS, G. and HOUCKE, A. VAN: (1947) The uptake of acridines by yeast cells with considerations on the behaviour of acridines. Arch. int. Pharmacodyn. *75*, 210. — 74. MENT, DE J.: (1942) Fluorescence chemicals and their application. McGraw-Hill, New York. — 75. MICHAELIS, L.: (1947) The nature of the interaction of nucleic acids and nuclei with basic dyestuffs. Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol. *12*, 131. — 76. MORTHLAND, F. W., DE BRUYN, P. P. H. and SMITH, N. H.: (1954) Spectrophotometric studies on the interaction of nucleic acids with aminoacridine and other basic dyes. Exp. Cell Res. *7*, 201. — 77. PEACOCKE, A. R. and SCARLETT, J. N. H.: (1956) The interaction of aminoacridines with nucleic acids. Trans. Faraday Soc. *52*, 261. — 78. PIROZYNSKI, W. J. and BERTALANFFY, L. VON: (1952) Ribonucleic acid in cytoplasm of liver cells. Arch. Path. *54*, 450. — 79. PIROZYNSKI, W. J. and BERTALANFFY, L. VON: (1955) Changes of cytoplasmic basophilia during carcinogenesis induced by 2-acetylaminofluorene. Exp. Med. and Surg. *13*, 261. — 80. POLITZER, G. and STOCKINGER, L.: (1938) Grundriß der Histophysiologie. Thieme, Leipzig. — 81. POLITZER, G. and STOCKINGER, L.: (1954) Über die toxische und photodynamische Wirkung des Akridinorange. Z. Zellforschung. *41*, 186. — 82. RIES, E.: (1937) Untersuchungen über den Zelltod. I. Die Veränderung der Färbbarkeit beim Absterben der Zellen mit besonderer Berücksichtigung der vitalen und postvitalen Kernfärbung. Z. Zellforsch. *26*, 506. — 83. RUSTAD, R. C.: (1959) Identification of the nucleus of a fission yeast with fluorescent dyes. Exp. Cell Res. *15*, 444. — 84. SANDRITTER, W.: (1955) Die Nachweismethoden der Nukleinsäuren. Z. wiss. Mikr. *62*, 283. — 85. SCHEIBE, G. and ZANKER, V.: (1952) Das Frank-Condon-Prinzip in der Spektren von Farbstoffassoziaten. Z. Physik. *133*, 244. — 86. SCHULER, R.: (1952) Die vitale Darstellung der Chromatinstrukturen von Bacterium-coli mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes, Naturwissenschaften *39*, 90. — 87. SCHULER, R.: (1954) Die vitale Darstellung der Chromatinstrukturen von Bacterium-coli mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes. Arch. Protistenk. *99*, 227. — 88. SCHÜMMELFEDER, N.: (1948) Die Fluorochromierung tierischer Zellen mit Akridinorange. Naturwissenschaften *35*, 346. — 89. SCHÜMMELFEDER, N.: (1949) Über Beziehungen zwischen Stoffwechselaktivität und Akridinorangespeicherung von Zellen. Naturwissenschaften *36*, 58. — 90. SCHÜMMELFEDER, N.: (1950) Die Fluorochromierung des lebenden, überlebenden und toten Protoplasmas mit dem basischen Farbstoff Akridinorange. Virchow's Arch. path. Anat. *318*, 119. — 91. SCHÜMMELFEDER, N.: (1950) Zur Morphologie und Histochemie nervöser Elemente. I. Die Fluorochromierung markhaltiger Nervenfasern mit Akridinorange. Virchow's Arch. path. Anat. *319*, 294. — 92. SCHÜMMELFEDER, N. and STOCK, K. F.: (1955) Über die Bestimmung des Umladebereiches von Gewebselementen mit dem Fluorochrom Akridinorange. Naturwissenschaften *42*, 442. — 93. SCHÜMMELFEDER, N.: (1956) Die Bestimmung des Umladebereiches (Isoelektrischer Punkt) von Gewebselementen mit den Fluorochrom Akridinorange. Z. Zellforsch. *44*, 327. — 94. SCHÜMMELFEDER, N. and DARNSFELD, H.: (1958) Quantitative Untersuchungen über die physikochemischen Grundlagen der Fluorochromierung tierischer Zellen mit Akridinorange. Histochemie *1*, 27. — 95. SCHÜMMELFEDER, N., EBSCHNER, K. J. and KROGH, E.: (1957) Die Grundlage der differenten Fluorochromierung von Ribonukleinsäuren und Desoxyribonukleinsäuren mit Akridinorange. Naturwissenschaften *44*, 467. — 96. SCHÜMMELFEDER, N., KROGH, E. and EBSCHNER, K. J.: (1958) Färbungsanalysen zur Akridinorange Fluorochromierung. Histochemie *1*, 1. — 97. SCHARF, J. H. and OSTER, K.: (1957) Zur Fluoreszenzmikroskopischen Unterscheidbarkeit »heller« und »dunkler« pseudounipolarer Ganglienzellen im Ganglion semilunare des Rindes. Acta Histochem. *4*, 65. — 98. SINGER, M.: (1954) The staining of basophilic components. J. Histochem. Cytochem. *2*, 322. — 99. STEINER, R. F. and BEERS, R. F. JR.: (1958) Spectral changes accompanying binding of acridine orange by polyadenylic acid. Science *127*, 335. — 100. STOCKINGER, L.: (1949) Über fluoreszenzmikroskopische Untersuchung menschlicher Spermien nach Fluorochromierung mit Akridinorange. Mikroskopie *4*, 53. — 101. STOCKINGER, L.: (1952) Vitalfärbung von Gewebkulturen mit Akridinorange. Z. mikr. anat. Forsch. *59*, 304. — 102. STOCKINGER, L.: (1958) Fluoreszenzuntersuchungen an Gewebkulturen. I. Die metachromatische Vitalfluoreszenz mit Akridin-

orange. Z. Naturw. *13/b*, 407. — 103. STRAUB, F. B.: (1958) Biokémia, Medicina, Budapest. — 104. STRUGGER, S.: (1940) Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Aufnahme und Speicherung des Akridinorange durch lebende und tote Pflanzenzellen. Jena. Z. Med. Naturwiss. *73*, 97. — 105. STRUGGER, S.: (1941) Basische zweifarbige Indikatoren. Flora *135*, 101. — 106. STRUGGER, S.: (1947) Die Vitalfluorochromierung des Protoplasmas. Naturwissenschaften. *34*, 267. — 107. STRUGGER, S.: (1949) Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. Scharper, Hanover. — 108. SUGÁR, J. and VIG, É.: (1955) The effect of nitrogen mustard in the acridine orange uptake of Ehrlich ascites tumour cells. Acta Morph. Hung. *6*, 15. — 109. TENEBAUM, E.: (1957) Changes in cellular nucleic acids during infection of polyomyelitis virus as studied by fluorescence microscopy. Nature (Lond.) *180*, 1044. — 110. TENER, G. M. and KHORANA, H. G.: (1955) Cyclic phosphates. II. Further studies of ribonucleoside 2 : 3-cyclic phosphates. J. Amer. chem. Soc. *76*, 5349. — 111. VERCAUTEREN, R.: (1950) The structure of desoxyribonucleic acids in relation to the cytochemical significance of the methyl-green-pyronine staining. Enzymologia (Amst.) *14*, 134. — 112. WEISSMAN, CH.: (1953) Die Vitalfärbung mit Akridinorange an Amphibienlarven. Z. Zellforsch. *38*, 374. — 113. WITTEKIND, D.: (1959) Über die derzeitige Bedeutung der Vitalfärbung, speziell der Vitalfluorochromierung in der Cytologie und über Möglichkeiten ihrer weiteren Anwendung, insbesondere in Kombination mit anderen Methoden. Mikroskopie *14*, 9. — 114. WITTEKIND, D. and VÖLCHER, A.: (1955) Untersuchungen zur Sekundärfluoreszenz der Erythrocyten mit Akridinorange. Z. Zellforsch. *45*, 620. — 115. WOLMAN, M.: (1955) Problems of fixation in cytology, histology and histochemistry. Int. Rev. Cytol. *4*, 79. — 116. ZANKER, V.: (1952) Über den Nachweis definierter reversibler Assoziate (reversible Polymerisate) des Akridinorange durch Absorptions- und Fluoreszenzmessungen in wässeriger Lösung. Hoppe-Seyl. Z. physiol. Chem. *199*, 225. — 117. ZANKER, V.: (1952) Quantitative Absorptions- und Emissionsmessungen an Akridinorange Kation bei Normal- und Tieftemperatur im organischen Lösungsmittel und ihr Beitrag zur Deutung des metachromatischen Fluoreszenzproblems. Hoppe-Seyl. Z. Physiol. Chem. *200*, 250. — 118. ZEIGER, K., HARDERS, H. and MÜLLER, W.: (1951) Der Strugger-Effekt an der Nervenzelle. Protoplasma *40*, 76. — 119. ZEIGER, K. and WIEDE, M.: (1954) Die Speicherung von Akridinorange in der Froschleber und ihr Einfluß auf das Ausscheidungsvermögen der Leberzelle. Z. Zellforsch. *40*, 401. — 120. ZEIGER, K.: (1958) Reinheitsgrad und Toxizität von Akridinorange. Z. mikr. anat. Forsch. *64*, 168.

АНАЛИЗ АКРИДИН-ОРАНЖЕВОГО ОКРАШИВАНИЯ НА ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

Т. ДОНАТ и И. ЛЕНДЬЕЛ

Авторы исследовали эффект окрашивания акридин-оранжевым в опытах in vitro и на отслоенных фиксированных и нефиксированных эпителиальных клетках влагалища, и высказывают свое мнение в связи с гистохимическими реакциями данного красителя.

На основе экспериментов энзиматическим перевариванием демонстрируется выявляемость нуклеиновых кислот при помощи акридин-оранжевой краски. Обсуждаются резко отклоняющиеся друг от друга реакции связывания краски живых, отмирающих и омертвелых эпителиальных клеток, при изменении химической реакции и концентрации. Приводится полная доступная литература относительно акридин-оранжевого красителя.

ANALYSE DER AKRIDINORANGEFÄRBUNG VON EPITHELZELLEN

T. DONÁTH und I. LENGYEL

Es wurde an exfoliierten unfixierten und fixierten vaginalen Epithelzellen der Färbungseffekt von Akridinorange untersucht.

Auf Grund der Enzymverdauung wird die Nachweisbarkeit von Nukleinsäuren mit Hilfe von Akridinorange demonstriert. Die verschiedenen Farbstoffbindungs-Reaktionen von lebenden, absterbenden und abgestorbenen Epithelzellen bei verschiedenen Reaktionen und Konzentrationsänderung werden demonstriert und die gesamte zugängliche Literatur über Akridinorange angeführt.

Dr. Tibor DONÁTH
Dr. Imre LENGYEL
Budapest IX. Tűzoltó u. 58. Hungary

Hôpital István, Budapest (Médecin-directeur: I. KATONA)

PROCÉDÉS DE CONSERVATION DES PRÉPARATIONS ANATOMIQUES A L'AIDE DE L'AIR RARÉFIÉ

I. KATONA

(Reçu le 18 novembre 1959)

Chaque époque possède sa technique propre et la technique des préparations anatomiques, le niveau et les qualités de cette technique ne constituent pas une exception. Les conquêtes du domaine de l'industrie, de la chimie et les progrès accomplis dans d'autres domaines ont également touché ce territoire et les corrélations existantes ont toujours pu être facilement démontrées. Les possibilités de la technique des préparations anatomiques dépendaient toujours des moyens qui étaient à nôtre disposition, des substances chimiques, des colorants, des possibilités d'agrandissement, etc.

A ce point de vue le progrès a été particulièrement rapide au cours des deux dernières décades, et cela s'est fait ressentir aussi quant à la technique des préparations anatomiques. Des publications concernant de nouvelles techniques deviennent de plus en plus nombreuses dans la littérature (2, 3, 4, 6). Le travail de PRIVESS ayant pour titre »Procédés de conservation des préparations anatomiques« paraît en 1956 [11]. Ce travail démontre que la technique des préparations anatomiques est arrivée dans une nouvelle phase de son évolution. Les nouveaux procédés auront une importance de plus en plus grande à notre époque où nos connaissances en sciences naturelles s'élargissent et où la conception biologique gagne de plus en plus de terrain. De nos jours ce ne sont pas seulement les spécialistes qui ne se contentent plus de modèles en papier maché, en argile ou en plâtre ou bien de préparations grisâtres enfermées dans des bocaux. On veut se rapprocher de la réalité. On veut voir les organes non pas dans des bocaux impénétrables mais on veut les avoir entre ses mains pour pouvoir, grâce à de nouvelles méthodes, regarder à l'intérieur et comprendre les corrélations de leurs structures compliquées. On s'intéresse aujourd'hui, plus que jamais, aux préparations modernes, et cet intéret ne se manifeste pas seulement de la part des instituts spécialisés, mais aussi de la part du grand public. Nous pouvons dire que les possibilités dans ce domaine sont imprévisibles.

Dans ce qui suit je voudrais faire connaître un certain nombre de nouveaux procédés. L'expérience de la période des dix dernières années a confirmé que ces procédés complètent heureusement les procédés anciens et ouvrent des voies nouvelles dans l'étude des différents organes.

A côté de leurs avantages, les différents procédés de conservation possèdent différents inconvénients. Les préparations placées dans des bocaux et liquides fixateurs sont difficilement abordables, leur utilisation est compliquée, et elles ne présentent guère — dans la majorité des cas — qu'un intéret historique. On ne peut regarder à l'intérieur de la pièce, on ne peut étudier que sa superficie. On peut énumérer presque les mêmes inconvénients en ce qui concerne les préparations englobées dans de la matière plastique transparente, quoique leur emploi et leur démonstration soient plus simples et plus commodes [1, 9, 10].

Les préparations désséchées ou impregnées par une substance quelconque, par exemple par de la paraffine sont surtout destinées aux démonstrations des plans superficiels. Les préparations par corrosion [5, 6] à côté de leurs précieux avantages, ne nous donnent que des moulages d'un système de cavité que nous examinons indépendemment de l'organe, détaché de ses rapports et de ses fonctions. Nous pouvons dire la même chose des préparations injectées et transparentes qui sont en plus très coûteuses [12]. Les procédés énumérés ne peuvent donc nous donner aujourd'hui qu'une satisfaction partielle.

*

Ma technique de conservation à l'aide de l'air raréfié supprime les inconvénients mentionnés et offre de nouvelles possibilités à l'étude des organes. Grâce à ce procédé les préparations acquièrent des propriétés très avantageuses. Grâce à ce procédé nous pouvons nous passer et des bocaux et des liquides fixateurs. Les organes gardent parfaitement la forme qu'ils avaient dans l'organisme et leur consistence reste souple. Leurs dessins de surface sont parfaits, les organes peuvent subir des préparations dans des buts particuliers et offrent ainsi des possibilités inexistantes avec les méthodes utilisées auparavant. L'examen de la structure interne des organes est indispensable pour l'étude de l'anatomie topographique. L'organe traité par ce procédé peut être étudié aussi bien macroscopiquement que microscopiquement. Les différents constituants de l'organe peuvent être colorés à volonté.

L'essentiel du procédé consiste dans le fait que le lavage des organes, leur fixation, coloration dessiccation, etc., se pratiquent dans une armoire à air raréfié. L'air est véhiculé dans le sens de la circulation à travers les vaisseaux. La conservation des organes se fait donc toujours de telle façon que les tissus se trouvent sous une certaine pression, c'est à dire que j'assure lors de la conservation des organes les conditions de pression existantes dans l'organisme où tout au moins des conditions de pression se rapprochant de celles qui existent dans l'organisme. L'armoire à air raréfié est pourvue de soupapes à l'aide desquelles on peut réaliser des pressions variables correspondant aux différents organes (Fig. 1). Ainsi à l'aide de la quantité d'air affluent, et en contrôlant la pression, nous pouvons obtenir que l'organe prenne la forme

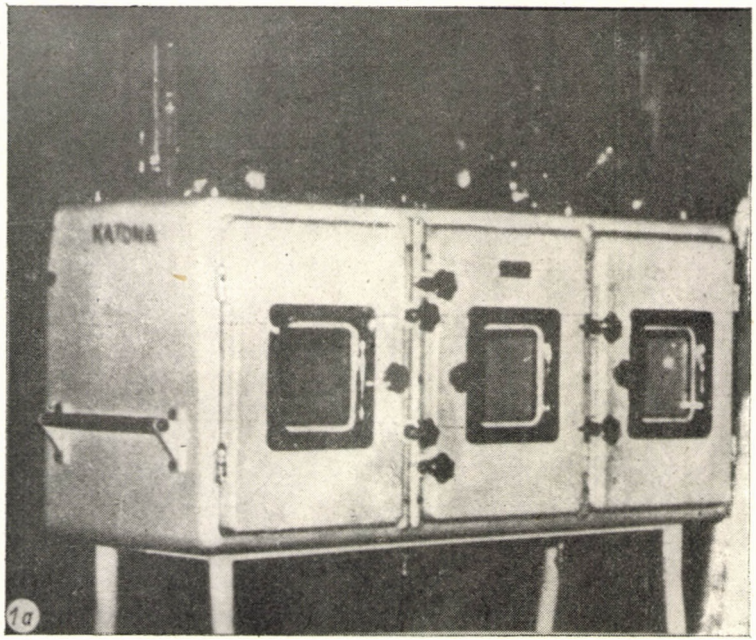


Fig. 1. a) Armoire pourvue de trois compartiments, où l'on peut pratiquer la conservation de plusieurs organes en même temps

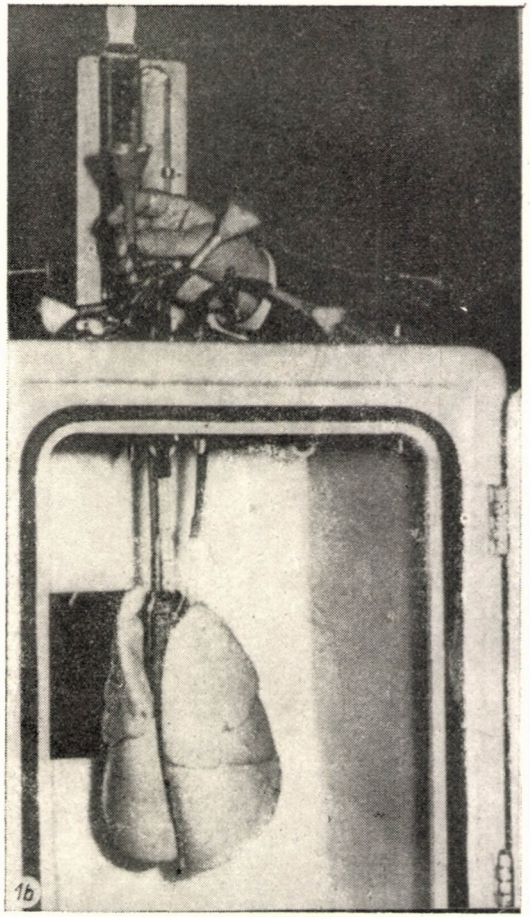


Fig. 1. b) Une armoire ouverte. On voit bien comment est placé l'organe. Sur l'armoire on voit le manomètre et les tuyaux pourvus d'entonnoirs à l'aide desquels nous faisons parvenir les différentes substances dans les organes

qu'il possédait dans le corps. Si nous asséchons l'organe dans cette position il se fixe, conserve toujours sa forme et il la reprend comme les substances souples même après avoir subi des déformations.

Le procédé de conservation

Nous lavons le sang du système vasculaire de l'organe humain ou animal à l'aide de sérum physiologique. Nous continuons le lavage jusqu'à ce que le liquide devient tout à fait incolore. C'est après le lavage que nous fixons l'organe en nous servant de solutions de fixation agissant d'une façon réversible ou irréversible (chlorure de sodium, aldehyde formique, alcool, acétone). La fixation de l'organe peut être effectuée de différentes manières. Nous injectons la solution fixatrice dans les vaisseaux de l'organe à l'aide d'une seringue, puis nous lions les vaisseaux pour que la fixation s'opère sous une pression donnée. La fixation peut être faite aussi dans les appareils à air raréfié et dans ce cas nous faisons parvenir dans le système vasculaire de l'organe l'agent fixateur sous forme de liquide ou sous forme de vapeur. Après fixation, nous lavons l'organe avec une solution de glycérine à 30%. Dans l'appareil, la durée de la déssiccation est de 1 à 5 jours.

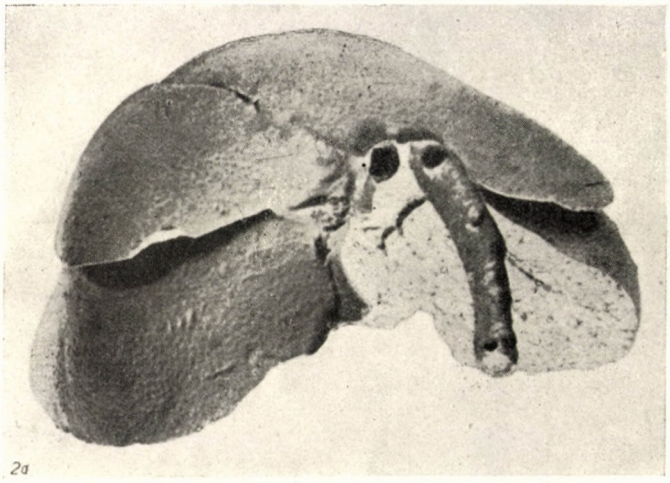
Nous pouvons accélérer le traitement, si nous pratiquons la déssiccation en présence d'une matière quelconque qui absorbe l'humidité. Le chlorure de calcium ou le silicagel actif remplissent fort bien ce rôle si on diminue l'humidité de l'air affluent et on en augmente la température.

Nous pouvons imbiber l'organe avec des substances les plus diverses (caoutchouc, gélatine, gomme lacque) ou avec des matières plastiques modernes. Les préparations imbibées d'huile de lin sont particulièrement belles, après l'assèchement de l'huile de lin il persiste une fine couche de film transparent de linoxil qui protège l'organe contre les endommagements éventuels venant de l'extérieur. Ces substances ne déterminent aucune modification dans la structure de l'organe mais le rendent plus résistant et plus durable. Lorsque nous nous servons d'une matière plastique ou d' une autre substance rendant la préparation plus rigide, nous imbibons l'organe au préalable d'un solvant qui rend soluble la substance dont nous nous servirons ultérieurement. Pour des buts particuliers, par exemple pour des examens radiologiques, nous pouvons injecter dans certains territoires de l'organe des substances de contraste ou bien nous pouvons les mélanger aux solutions fixatrices (baryium, composés iodés organiques, colorants argentés, auriques, etc [8].

*

Un certain nombre de préparation d'organe démontreront les multiples possibilités d'utilisation du procédé que nous venons de faire connaître. Il n'est pas indifférent, ni du point de vue de l'enseignement morphologique, ni

du point de vue de la conception biologique si l'objet que l'on présente est une imitation ou un organe véritable. L'un des avantages de ce procédé est de conserver des organes originales et se rapprocher ainsi le plus possible de la réalité (Figs. 2 et 3).



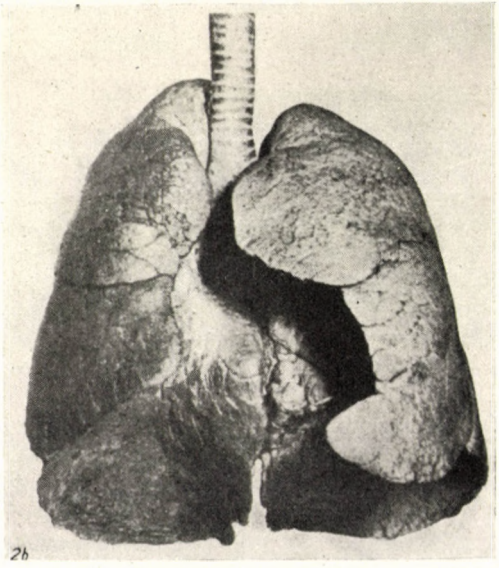
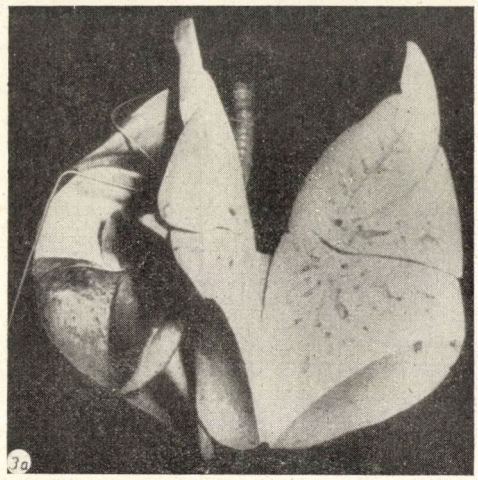


Fig. 2. a) Foie de chat
b) Poumons d'homme adulte



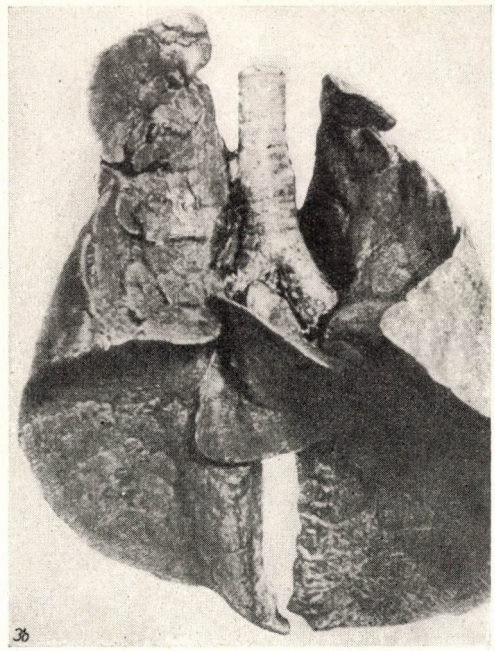


Fig. 3. a) Poumons de chien
b) Poumons de porc

Les organes ainsi préparés gardent avec précision leurs formes correspondant à leur situation dans l'organisme, les impressions des organes avoisinants, les contours anatomiques superficiels, ainsi que la topographie des formations hilaires. Avec aucune autre méthode utilisée jusqu'à maintenant on n'a pu

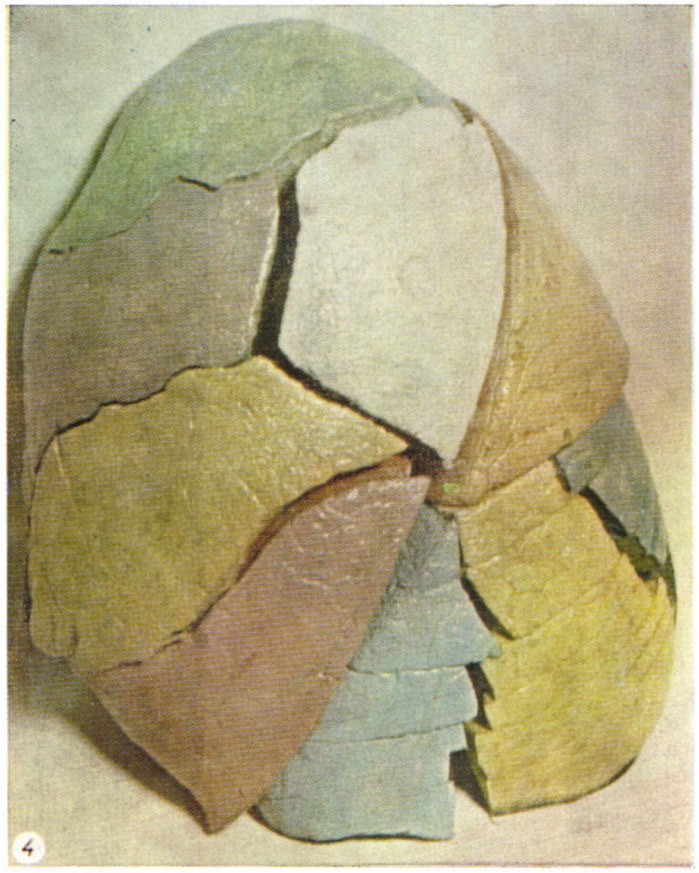


Fig. 4. Segments du poumon gauche d'homme adulte

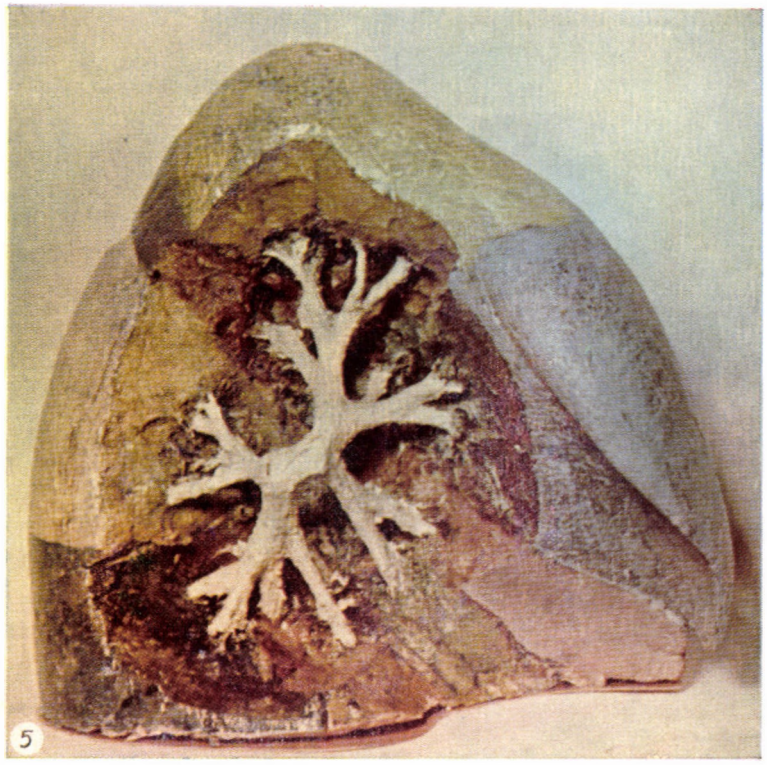


Fig. 5. Bronches de segments (côté gauche, homme adulte)

étudier aussi parfaitement les rapports anatomiques des vaisseaux lymphatiques, des formations hilaires des reins, des poumons, du foie, etc. La méthode peut être utilisée avec profit pour des préparations en série pour l'étude des organes du point de vue ontogénétique et phylogénétique et pour l'observation détaillée de leur évolution.

Nous pouvons soumettre l'organe à un grand nombre de préparations et d'examens différents. Nous pouvons étudier la topographie précise des lobes ou de détails d'organe; ainsi lors de l'étude des poumons nous pouvons isoler les segments et étudier leurs rapports anatomiques (Fig. 4).

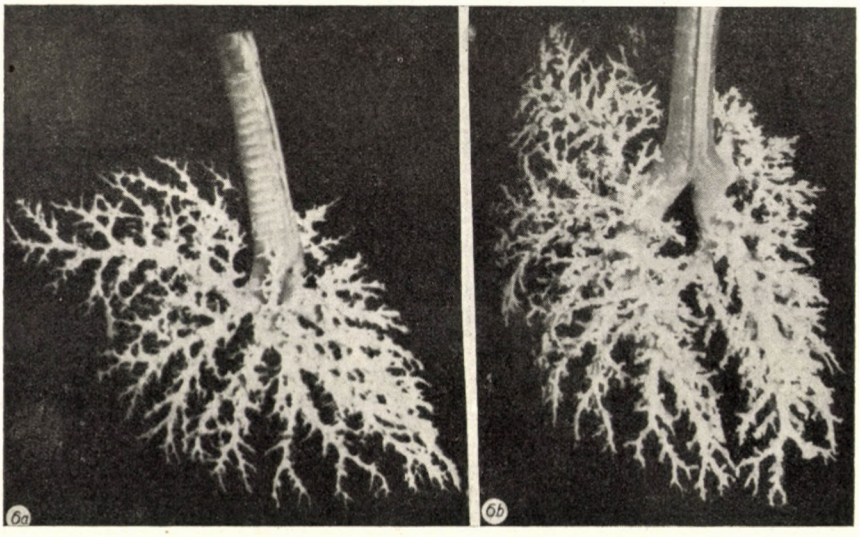


Fig. 6. Système bronchique de chien (préparation originale)

On voit bien sur la Fig. 5 la topographie des bronches des segments, préparées à l'état où elles se trouvent au moment de l'inspiration. On voit bien comment elles se situent dans l'axe des segments. Sur cette même préparation on voit également très distinctement les limites des segments. On peut particulièrement bien étudier les petites unités pulmonaires chez le veau, où les petites unités sont mieux isolées et mieux délimitées que chez l'homme. Par contre chez le chien, les limites de ces petites unités sont complètement effacées.

En général, les organes conservés de cette manière peuvent être très bien préparés. Nous pouvons par exemple préparer tout le système bronchique. Sur la Fig. 6, on peut bien voir un système bronchique original. Il s'agit non pas d'une de ces préparations par corrosion comme on en faisait jusqu'à maintenant, et qui sont indiscutablement belles et utiles, mais qui ne sont que des moulages d'un système de cavité et en les examinant nous n'étudions

jamais un organe original. Un des résultats importants de ce procédé est de nous rendre possible d'examiner un système bronchique original aussi bien quant à sa surface externe que son intérieur.

Nous pouvons pratiquer des examens bronchoscopiques sur cette préparation, étudier l'abouchement des bronches, les rapports anatomiques des images bronchoscopiques. Nous pouvons même nous exercer aux différentes manipulations bronchoscopiques, à la recherche des corps étrangers, à leurs extractions, etc.

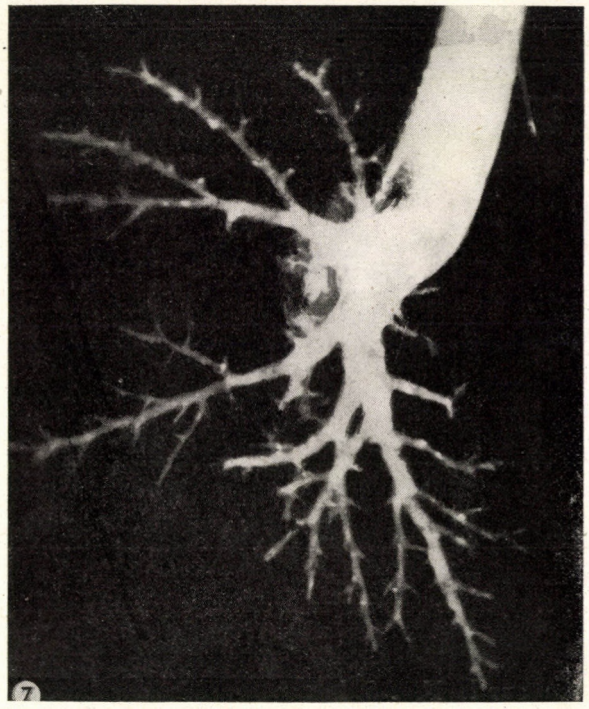


Fig. 7. Bronchographie du poumon d'un chien

Nous pouvons étudier le diamètre, la longueur et les variations des différentes bronches. Nous pouvons étudier l'évolution du système bronchique aussi bien du point de vue phylogénétique et ontogénétique. Nous pouvons faire des constatations intéressantes dans les ectasies bronchiques, ainsi que dans d'autres altérations pathologiques des bronches. Les différents secteurs du système bronchique peuvent être colorés aisément, ce qui est particulièrement utile lors de l'étude des malformations.

Grâce à ce procédé nous pouvons rendre non seulement le système bronchique, mais aussi le système vasculaire du poumon tels qu'ils peuvent être

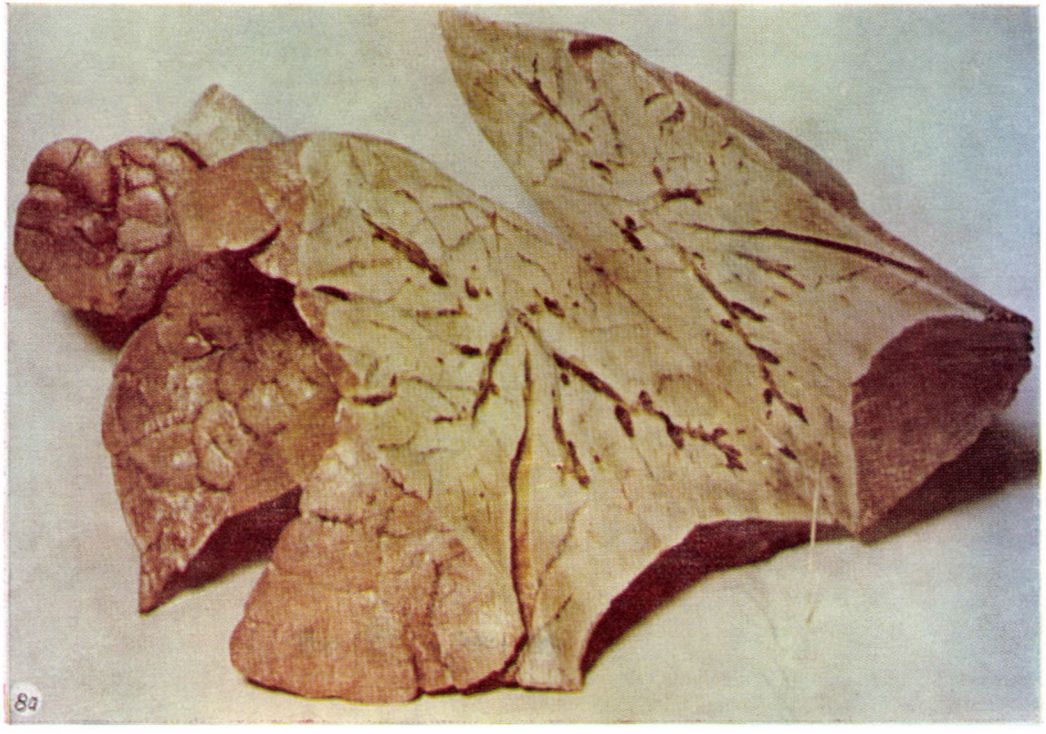


Fig. 8a. Coupes pulmonaires

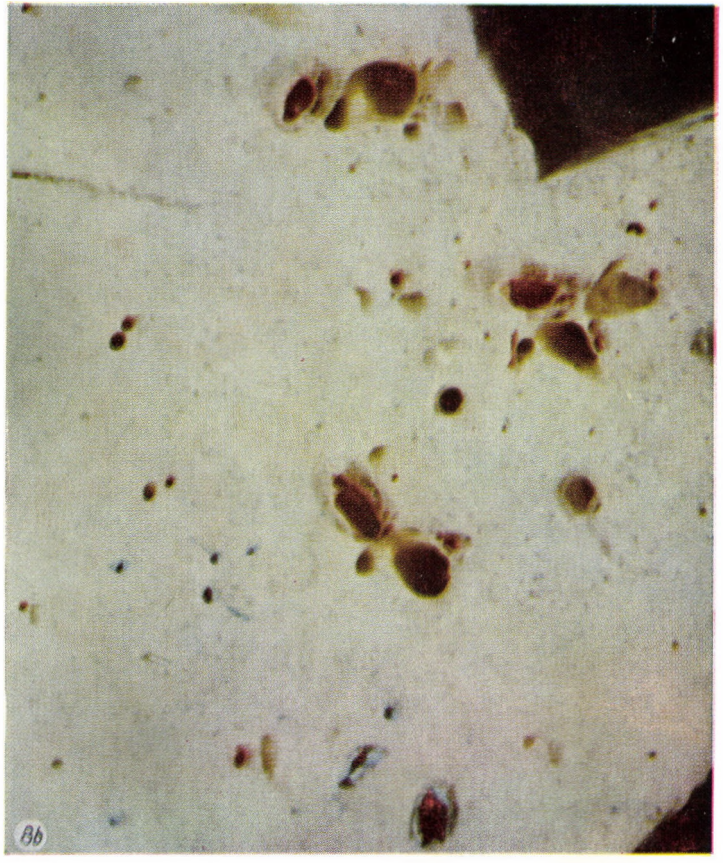


Fig. 8b. Coupes pulmonaires

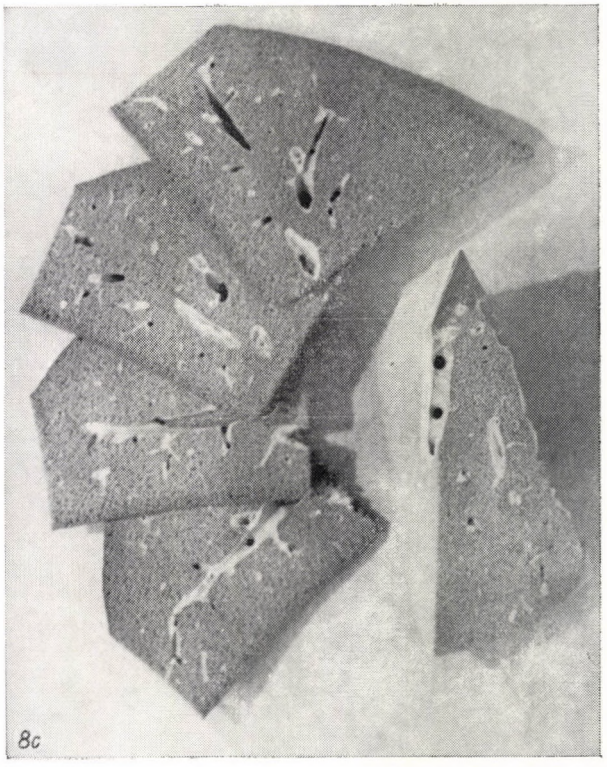


Fig. 8c. Coupes pulmonaires

étudiés d'une manière durable, si nous enduisons la surface interne de ces systèmes sous l'écran radiologique avec une substance de contraste qui persiste sous la forme d'une couche mince de film. Nous pouvons aussi examiner ces organes et leurs constituants de tous les côtés, en les tournant et les soumettre à un examen radiologique approfondi (Fig. 7). Nous pouvons même pratiquer des graphies pulmonaires dans le sens crânio-caudal. On utilise dans ce but, entre autres, un mélange de composés iodés organiques et d'une résine artificielle — le vinitex. Ces mélanges sont faciles à colorer, on peut donc s'en servir non seulement pour des examens radiologiques, mais pour des examens microscopiques. On peut faire imbiber par ces substances, soit la totalité du tissu pulmonaire, soit seulement un certain nombre de segments. Les contours deviennent ainsi plus soulignés. Nous pouvons procéder de la même façon en ce qui concerne les organes les plus divers. Nous pouvons préparer pour les radiologistes de précieux modèles originales de divers organes.

On peut facilement faire des coupes des préparations conservées grâce au procédé de l'air raréfié. Nous pouvons pratiquer des coupes en série d'épaisseurs (d'un demi-millimètre jusqu'à plusieurs centimètres), la taille de ces coupes peut être aussi des plus variées. Nous pouvons examiner soit l'ensemble de la surface de section du poumon, soit seulement celui d'un lobe pulmonaire, ce qui est loin d'être indifférent lors de l'étude des fonctions pulmonaires. Nous pouvons pratiquer des examens non pas seulement sur l'échelle microscopique, mais dans l'ordre de grandeur que nous désirons.

Il nous est possible de faire des coupes de tout un segment ou de tout un lobule ou d'un acinus, nous pouvons les étudier dans leur continuité et faire des modèles originales par reconstruction. Nous pouvons examiner les différents plans pulmonaires non seulement à l'aide des rayons X, mais à l'oeil nu en les feuilletant comme les pages d'un livre (Fig. 8).

Nous pouvons également étudier à l'oeil nu les bases anatomiques des tomographies. Les modèles de reconstruction sont très utiles pour préciser par exemple des circonstances pathologiques, pour éclaircir les rapports des bronches et des cavernes, pour étudier la progression de certains processus pathologiques (tuberculose) etc.

Mais ces préparations ne gardent pas seulement leurs formes extérieures, et elles ne nous sont pas utiles seulement pour étudier et démontrer les corrélations externes, mais à l'aide de la loupe ou du microscope, on peut aussi étudier leurs structures internes. En effet, l'une des propriétés importantes de ces préparations est de nous rendre possible l'étude de la structure-même des organes, non seulement au microscope à l'échelle des microns, non pas seulement dans un plan unique, mais dans plusieurs dimensions, dans l'espace. Ce qui est important pour la structure d'un organe et pour les fonctions qui sont en corrélation étroite avec cette structure, ce n' est pas seulement les dimensions et les rapports microscopiques, mais aussi les rapports des unités plus grandes.

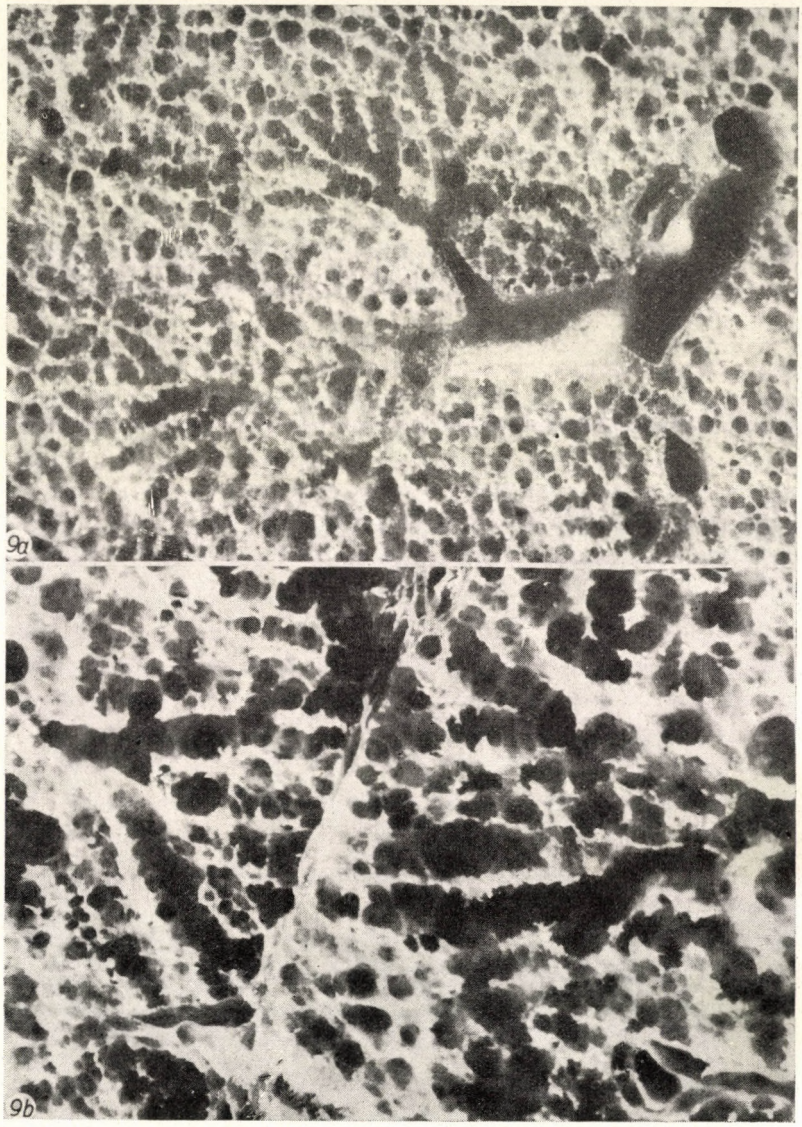


Fig. 9. Coupe pulmonaire (*a* gross. : 40; *b* la même, gross.: 63)

Ainsi par exemple lors de l'étude du poumon, les rapports des acinis, des lobules et des segments sont importants à connaître en même temps que les rapports de l'organe dans son ensemble.

En effet comment avions nous tenté d'expliquer jusqu'à maintenant à l'aide de la technique par corrosion, les rapports anatomiques des vaisseaux pulmonaires? Dans les vaisseaux d'un poumon collabé, extirpé du cadavre,

nous injections sous une certaine pression à l'aide d'une seringue à vis des substances devenant rigides ensuite et des préparations par corrosion ainsi obtenues, nous avons voulu éclaircir leurs rapports anatomiques. Combien c'est loin de la réalité, ou pour mieux dire, combien ce n'est qu'une petite partie de la réalité, ceux qui ont jamais regardé sous microscope l'intérieur des organes conservés grâce à nôtre procédé le savent bien!

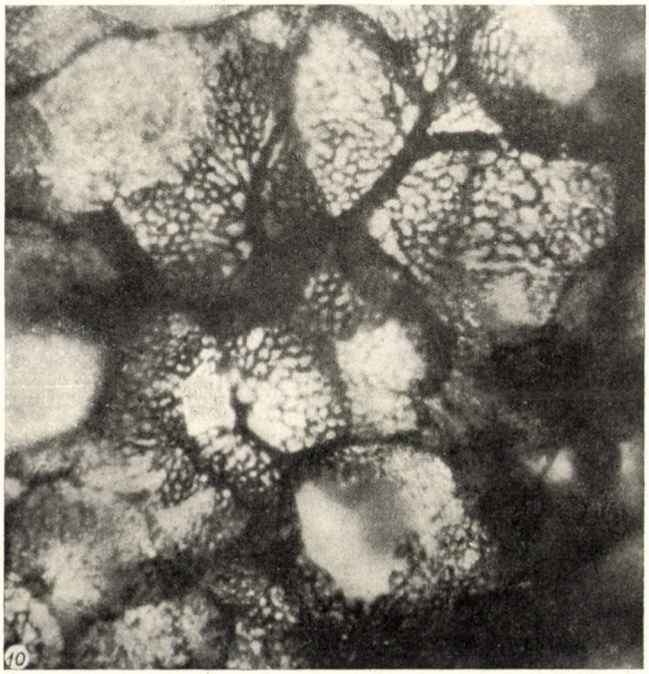


Fig. 10. Réseaux capillaires d'alvéoles pulmonaires injectés à l'encre de Chine (gross.: 100)

Si nous continuons à étudier les poumons, nous voyons que les différents constituants de l'organe, les bronches, les artères, les veines et les vaisseaux lymphatiques, etc. forment du point de vue fonctionnel un ensemble cohérent et nous pouvons constater avec quelle régularité est constituée l'ensemble de l'organe partant des unités les plus petites acinis, lobules, segments. Ces constituants sont loin d'être indépendants les uns des autres, bien au contraire, il y a entre eux une interaction étroite, à chaque étape du fonctionnement correspondent des rapports anatomiques adéquates.

Il n'est nullement indifférent de décider quelles soient les préparations préliminaires que nous éxécutons pour examiner la structure de l'organe, dans quelles conditions nous pratiquons sa fixation et sa conservation. C'est pour

cette raison que l'armoire à air raréfié présente une telle importance, car elle permet de placer l'organe dans des conditions de pression où il se trouve dans l'organisme — ou tout au moins dans des conditions se rapprochant de celles qui se trouvent dans l'organisme — et c'est dans ces conditions que nous pouvons le fixer et le colorer.

Cette armoire n'est pas seulement un instrument de conservation, mais nous donne aussi la possibilité de faire des observations scientifiques.

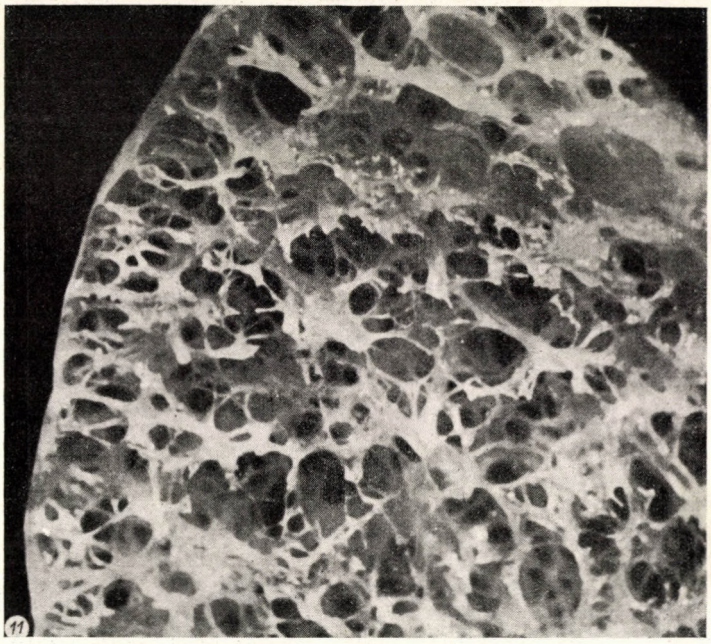


Fig. 11. Coupe de rate humaine lavée (gross.: 40)

Nous pouvons ainsi observer sur les poumons n'ayant pas encore respirés, comment se fait — approximativement — la première respiration, dans quelle mesure et sur quelle étendue le système bronchique se remplit d'air, quelles sont les données anatomiques vasculaires de la circulation pulmonaire. Il est évident que dans ce cas nous ne pouvons compter avec l'action régulatrice du système nerveux.

Nous avons obtenu des données précises concernant le degré de maturité des alvéoles ainsi que des renseignements sur le développement de leurs réseaux capillaires.

On peut présenter et expliquer clairement le synchronisme du fonctionnement du système bronchique et de l'artère pulmonaire ainsi que la topographie correspondante. Ils se dilatent ensemble lors de l'inspiration.

Fig. 12. Photographie microscopique d'une coupe de foie de chat (gross.: 40)

On peut aussi étudier les rapports anatomiques des alvéoles au cours de la «respiration externe», non pas sous forme d'hypothèses, mais sur la base de données anatomiques originales. On peut tirer des déductions quant aux circonstances accompagnant le remplissage des capillaires alvéolaires.

Le fonctionnement de la circulation pulmonaire explique la topographie des veines pulmonaires, leur situation entre les unités pulmonaires, les lobules et les segments, leur trajet indépendant du système bronchique et des artères et surtout leurs formes que nous n'avons connu jusqu'à maintenant, que grâce aux préparations par corrosion et cette forme ainsi connue ne correspondait pas à la réalité.

Les troubles de la circulation pulmonaire s'expliquent à bien d'égards par les données anatomiques d'un poumon dilaté au maximum. Dans cet état en

effet les veines postcapillaires sont totalement comprimées par les petites unités pulmonaires. C'est la base anatomique du trouble de la circulation pulmonaire. Dans cet état, les veines sont fortement applaties et non pas cylindriques comme celà se voit sur les préparations par corrosion.

Dans ce que je viens d'exposer je voulais seulement fournir quelques données que j'ai constaté lors de l'étude des préparations pulmonaires mises au point grâce à ma méthode. On peut étudier la structure des organes sous des

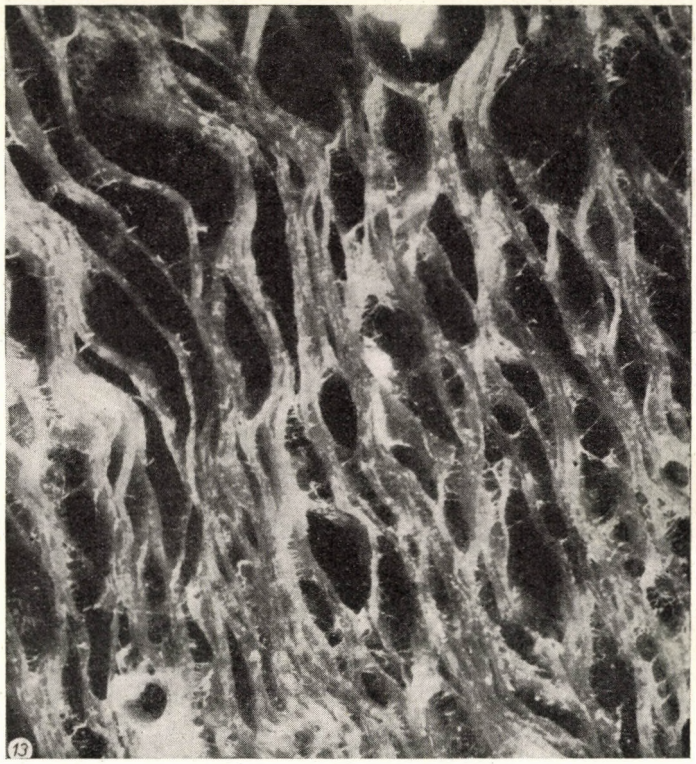


Fig. 13. Fibres myocardiques (gross.: 40)

angles nouveaux et différents et l'on peut et on doit examiner les rapports anatomiques des organes sous des dimensions plus nombreuses et en corrélation avec leurs fonctions.

Une autre propriété précieuse de ces préparations est de pouvoir pratiquer et puis étudier au microscope des coupes d'épaisseurs différents, même des coupes de plusieurs millimètres. On peut particulièrement étudier les coupes colorées par des injections préalables. On peut en effet examiner ces coupes non

seulement avec un éclairage superficiel mais aussi par transillumination et même par les deux modes d'éclairage à la fois.

La Fig. 9 nous montre des coupes de poumons éclairées superficiellement avec un grossissement faible et ensuite avec un grossissement plus fort. Ce ne sont pas des photos en stéréoscopie mais seulement des images rendues plus plastiques par l'éclairage, on peut néanmoins bien distinguer le rapports superficiels dans l'espace et même jusqu'à une certaine profondeur.

Sur l'image supérieure on voit les ramifications des bronches, le ductus alvéolaris et les limites des acinis. — Sur l'image inférieure — avec un grossissement plus fort — on voit encore plus distinctement le ductus alvéolaris, les alvéoles qui font hernies et les limites des acinis. Les acinis so trouvent dans un état correspondant à l'inspiration, se blottissent les uns contre les autres et exercent une pression sur les veines qui cheminent entre eux.

Sur la Fig. 10 on voit dans les parois des alvéoles en inspiration des réseaux de capillaires injectés à l'encre de Chine. Sous le microscope ces réseaux apparaissent d'une manière très plastique. On peut même voir et étudier deux à trois couches en profondeur, on voit en plus les rapports anatomiques des alvéoles, les réseaux capillaires et les veines collectrices postcapillaires. Malheureusement la photographie ne rend pas ces détails avec la même netteré.

Sur la Fig. 11 on voit la structure d'une rate humaine lavée.

Sur la Fig. 12 on voit la coupe d'un foie de chat conservé selon le procédé décrit. La photographie faite à travers la lentille du microscope représente la surface de la coupe. On voit bien les coupes longitudinales et transversales des lobules hépatiques avec les veines centrales. La structure hépatique peut être bien examinée grâce au microscope.

Résumé

La fixation et la conservation des organes en milieu à air raréfié est un procédé qui nous dispense du bocal en verre et du liquide fixateur. C'est grâce à ce procédé que l'on assure le plus fidèlement possible les rapports anatomiques de l'organe dans l'espace et qu'on peut examiner non seulement la superficie de l'organe mais aussi sa structure en plusieurs dimensions. La méthode est indispensable pour l'étude de l'anatomie topographique de la structure même de l'organe. Grâce à elle on peut étudier par des moyens nouveaux les rapports anatomiques des différents constituants de l'organe. Les préparations peuvent être examinées aussi bien à la loupe, qu'au microscope et aux rayons X. Grâce à elles les recherches ontogénétiques et phylogénétiques sont rendues plus faciles. Le procédé décrit ouvre des voies nouvelles dans la préparation macroscopique des organes, leurs études et la technique de leur remplissage.

BIBLIOGRAPHIE

1. Ethel Lieb, B. A.: (1959) The plastic (Mylar) Sack as an Aid in the Teaching of Pathology. Amer. J. clin. Path. *32*, 385. — 2. Faller, A.: (1948) Die Entwicklung der makroskopisch-anatomischen Präparierkunst von Galen bis zur Neuzeit. Acta Anat. *4*, Suppl. 7. — 3. *Цуренко, Г. И.:* (1957) Основные методы бальзамирования. Арх. патол. *2*, 79. — 4. *Гермер, Э.* и *Дубинин, В.:* (1954) Новый метод изготовления препаратов из внутренних

органов, эмбрионов и целых животных в сухом виде с сохранением их естественной окраски. Зоолог. Журн. *33/3*, 701. — 5. *Иоффе, И.:* (1949) Опыт применения органического стекла для изготовления коррозионных препаратов. Врач. дело *8*, 747. — **Kaiserling, C.: (1922) Rückblicke auf Theorie und Praxis der farbigen Conservierung. Virchows Arch. gen. Path.** *237*, 467. — 7. *Калашникова, Н. Н.:* (1952) Применение полиметилметакрилата для изготовления коррозионных препаратов. Арх. патол. *4*, 91. — 8. *Крылова, Н. В.:* (1952) Новый метод приготовления рентгено-коррозионных препаратов. Бюлл. Экспер. биол. и мед. *5*, 80. — **9. Kurucz, J., Kara, K.: (1958) Methylmetacrylat alkalmazása a tüdőpathológiában. Tuberkulózis.** *11*, 134. — 10. *Наумов, В. А.:* (1948) Приготовление патолого-анатомических препаратов в плексигласе. Ветеринария, *10*, 28. — 11. *Привес, Н. Т.:* (1956) Методы консервирования анатомических препаратов. — Медгиз. Ленинград. — **12. Spalteholz, W.: (1914) Über das Durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen Präparaten und seine theoretischen Bedingungen, Leipzig.**

МЕТОДЫ КОНСЕРВИРОВАНИЯ АНАТОМИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ РАЗРЕЖЕНИЕМ ВОЗДУХА

И. КАТОНА

Автор описывает метод консервирования человеческих и животных органов путем разрежения воздуха и аппаратуру, в которой при соответствующих условиях давления происходят фиксирование, окрашивание и сушка органов. Автор показывает на препаратах легких, сердца, печени и селезенки многостороние преимущества данного метода. Органы консервируются без фиксирующего средства и посуды, легко препарируются, из них удобно изготовить срезы и окрашивать их. Структуру органов можно пространственно исследовать под стереомикроскопом, и изучать также при помощи рентгеновского аппарата. При помощи этого метода легко и быстро можно изготовить эволюционные, онтогенетические и филогенетические серийные препараты. Изложенным методом автор старается расширить возможности исследования органов в области между микроскопическими и макроскопическими размерами.

METHODE ZUR KONSERVIERUNG VON ANATOMISCHEN PRÄPARATEN DURCH LUFTVERDÜNNUNG

I. KATONA

Verfasser beschreibt ein Konservierungsverfahren von menschlichen und tierischen Organen durch Luftverdünnung, ferner den Apparat, in welchem das Fixieren, die Färbung und das Trocknen der Organe bei entsprechenden Druckverhältnissen erfolgt. An Lungen-, Herz-, Leber- und Milzpräparaten werden die vielseitigen Anwendungsmöglichkeiten und Vorteile dieser Methode demonstriert. Die Organe können ohne Fixierungsmittel und Geschirr konserviert, leicht präpariert, Schnitte verfertigt und gefärbt werden. Die Struktur der Organe kann im Stereomikroskop untersucht und auch mit Hilfe des Röntgenapparates studiert werden. Die Methode ermöglicht die leichte und rasche Herstellung von Evolutions-, onto- und phylogenetischen Serienpräparaten. Mit der beschriebenen Methode ist Verfasser bestrebt die Untersuchungsmöglichkeiten der Organe auf dem Gebiet zwischen den mikro- und makroskopischen Aüsmaßen zu erweitern.

Dr. István Katona, Budapest IX. Nagyvárad tér 1. Hongrie

Department of Histology and Embryology, University Medical School, Budapest
(Director: Prof. I. Törő)

SUCCINIC DEHYDROGENASE ACTIVITY IN THE THYMUS OF LABORATORY RODENTS

Angéla Gyévai and Eszter Kapa

(Received November 25, 1959)

Morphological structure and function of the thymus are still matters of controversy. It is by means of normal histological procedures that its fundamental structure and by those of experiments *in vivo* and *in vitro* that the origin of thymic tissue and its reactions to various influences are revealed [7, 8, 9]. Investigations of this kind have thrown more and more light upon the role played and the function fulfilled by the thymus. Research in this field has been in progress for a number of years in our Institute, and it seemed necessary to supplement our results by histochemical and biochemical investigations. Enzymatic reactions may yield interesting histochemical data allowing conclusions as to the biology of thymus cells.

The most convenient way for collecting information about thymic metabolism is to study the catalysing enzymes. There are so many such enzymes and their activity depends on so many factors that a comprehensive study dealing with all of them would be a matter handicapped by considerable difficulties. If, on the other hand, it is through the activity of a single enzyme that we wish to study metabolism, we have to select one that participates in the oxidation of the principal food groups and is, besides, fairly well known as regards structure and action mechanism. These requirements seem to be satisfied by a member of the citrate group, namely the enzyme known as succinic dehydrogenase. It is a prominently stable enzyme which has long been known and repeatedly studied [5]. That it is — like the entire citrate group — mitochondrially bound appears to be generally accepted. While other enzymes may be encountered in other parts of the cytoplasm, succinic dehydrogenase is invariably in the mitochondria. Studying the activity of this enzyme in the thymus, Seligman, Rutenburg [6], further Smith, Wharton and Gerhardt [7] found that — though demonstrable in the thymus — the activity of the succinic dehydrogenase system was generally weak and variable. They were unable to demonstrate intracellular formazan crystals and observed a number of negative thymocytes.

Material and method

The thymus of laboratory-bred young and sexually immature, sexually mature and aged rabbits, rats, mice and guinea pigs were used in the experiments. The animals were kept under normal laboratory conditions and care was taken to give them identical diet at identical intervals during the experiments. They were sacrificed at the same hour of the day. Only males were chosen as test animals although preliminary experiments between the two sexes in respect of enzymatic activity did not show any difference. We conducted our investigations in three directions.

1. The first group of experiments was made to obtain some general information about enzymatic activity in the thymus. Freezed sections 10 to 20 μ thick were prepared from freshly removed thymus and immediately transferred into a freshly prepared incubation mixture of the following composition:

0.1 ml of 0.1 M NaH_2PO_4
0.4 ml of 0.1 M Na_2HPO_4
2.5 ml of 1.69 % NaCl
0.1 ml of 1.15 % KCl
0.05 ml of 1.22 % CaCl
1.0 ml of 1 % NTC (neotetrazolium)
1.4 ml of 1 M sodium succinate (3).

Having ascertained in the course of preliminary experiments that one hour is the optimum length of time for the development of the reaction, we incubated the sections at 37.5° C during an hour then we rinsed them with distilled water and fixed them for 30 minutes in a 4 per cent solution of formol. After fixation, the sections were rinsed with distilled water once more and then mounted in glycerinated gelatin.

2. In the next series we explanted the thymus in Maximow's double cover-slip cultures. After 48, 72, 96, 120 and 144 hours, one group of the tissue cultures was immersed into an incubation medium whose composition was the same as under 1, the other group of the cultures (controls) was fixed in Carnoy fluid. Controls were stained with Giemsa's stain or toluidine blue. In connection with the enzymatic reaction two kinds of controls were applied (I). Using the same method, we studied succinic dehydrogenase activity in chick embryo heart cultures of the same age. (II) We transferred part of the thymus cultures into an incubating solution that contained no sodium succinate. The reaction in these cases was invariably negative. We prepared 60 cultures for each species and examined a total of 300 cultures.

3. The third series of experiments had the purpose to establish whether there was enzymatic activity in thymocytes. Sections give no answer to this question, neither are cultures useful in this respect because — in spite of intensive thymocyte emigration during the first 24 hours — formazan crystals are not well observable. We had, therefore, to resort to another method: we shook the thymocytes from the freshly removed thymuses into an incubating solution of the afore-described composition. After an hour of incubation, a drop of the solution was placed upon a slide and the cells were inspected under the microscope. Subjective appreciation showed the size of the intracellular formazan crystals to vary from species to species. It seemed therefore necessary to perform a quantitative determination of dehydrogenase. The procedure was as follows.

After having shaken the thymocytes from the thymus of a particular animal into 1 ml of the above-described incubation mixture, we aspirated the substance up to the 1st mark of a WBC pipette and made it up with Türck's solution to the 11th mark. A drop of this dilution was then transferred to a Bürker chamber where cell count was performed in the usual manner. Ascertaining in this way the number of thymocytes per cu. mm of the fluid, it was easy to determine the number of cells per ml. We stopped the reaction after an hour of incubation by adding 1 ml of 30 per cent trichloracetic acid. After centrifugation, the formazan crystals were dissolved in acetone and the colour intensity of the solution was determined by a Biró—Fedorcsák type photometer at a wave length of 546 mμ, at the range of maximum absorption. The standard curve shown in Table III (1) was constructed by reducing known amounts of NTC solution by means of ascorbic acid, between pH 9 and pH 10.

Results

We describe our observations with reference to the three principal tissue elements composing the thymus, namely the epithelial reticulum, Hassall's bodies and the thymocytes.

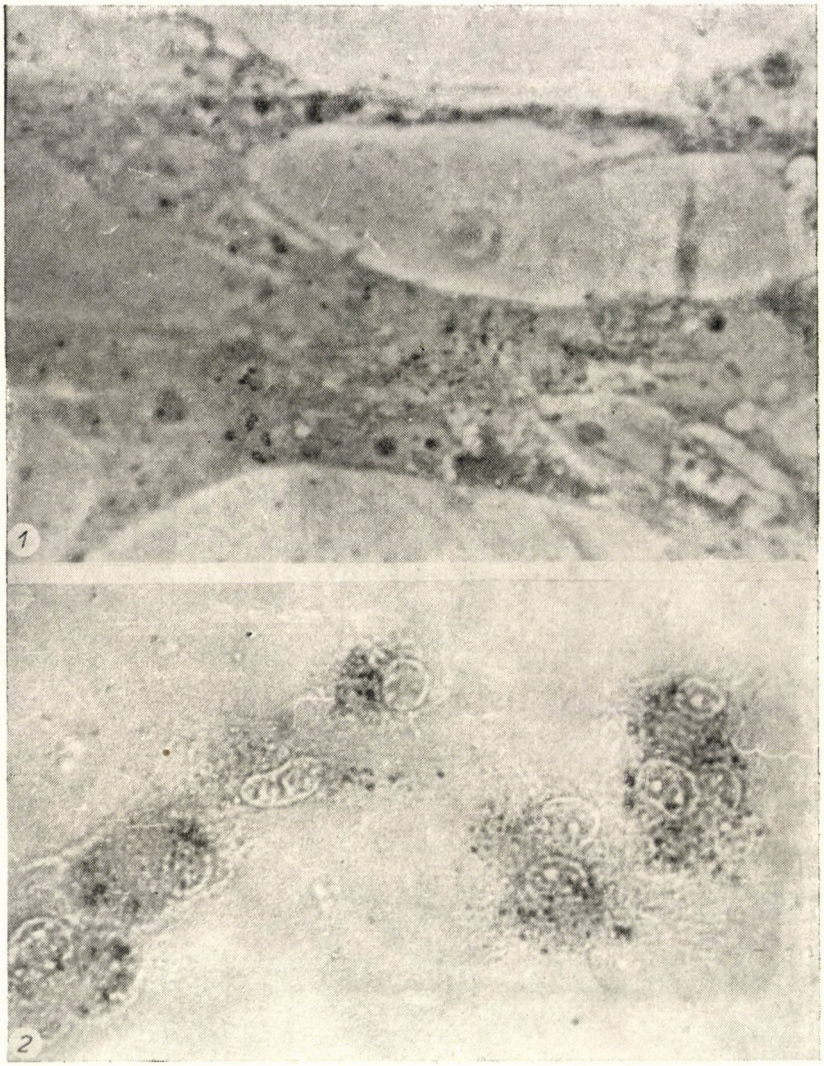


Fig. 1. Five-day-old Maximow culture of thymus from a sexually mature mouse. Note epithelial reticular cells containing formazan crystals in the form of black granules. ×500

Fig. 2. Five-day-old Maximow culture of thymus from a sexually mature mouse. Note epithelial reticular cells at a distance from the explanted piece. Great number of formazan crystals — indicative of enzymatic activity — visible in the cytoplasm. ×500

(I) The colour reaction obtained in frozen sections was well visible with the naked eye, although it was never so marked in the thymus as in the kidney of the same animal. The preparations displayed a uniform red or bluish violet colour. No structure was observable even in thin sections. Formazan cristals, scattered or in groups, were seen under high power, but it was impossible to

trace them to the cells. It was in any case evident that the enzymatic activity in the thymus varies according to species and, within the species, according to age (Table I). Differences exist even between animals of the same species and age but these differences are insignificant and easily distinguishable from those due to species or age. Of the examined sexually mature animals (rabbit, guinea pig, rat, mouse) it was only the thymus of the mouse which displayed a marked activity. The reaction was weak in the thymus of the rat and the rabbit, and the weakest in that of the guinea pig. There was a significant difference within the same species between young, sexually mature and aged animals. In young animals the reaction was marked and manifested itself distinctly with bluish violet formazan crystals, as in the sexually mature mice. It was not possible to distinguish between epithelial reticular cells and thymocytes in the preparations, but Hassall's bodies were clearly seen as negative areas. Such bodies were especially well distinguishable in the thymus of mature guinea pigs.

Table I

Succinic dehydrogenase activity in the thymus of various laboratory-bred rodents of different age

Species	Sexually immature	Sexually mature	Old
Rabbit	+++	++	++
Rat	+++	++	++
Guinea pig	+++	++	+*
Mouse	+++	+++	++

The crosses indicate the strength of reaction.

II. Determination of enzymatic activity in the cultures was made 48, 72, 96, 120 and 144 hours after explantation; in 48-hour-old cultures growth could not yet be seen and a pronounced emigration of thymocytes was observable. The explanted piece gave a marked reaction similar to that observed in frozen sections. In cultures prepared from the thymus of young rabbits, rats and mature mice the reaction was intense, mature rats and rabbits yielded a less pronounced reaction. While this was generally weak in cultures of guinea-pig thymus whatever the age of the animal. No formazan crystals were present in the released thymocytes except in about 20 per cent of those present in cultures from sexually mature mice. Growth was well visible at 72 and 96 hours and its rate especially pronounced at 120 and 144 hours. The activity of the mother piece was unchanged throughout this process.

Enzymatic activity in the epithelial reticular cells varied from spezies to species. There were many coarse formazan granules in the epithelial cells in 120-hour-old cultures of thymic tissue obtained from mature mice (Fig. 1).

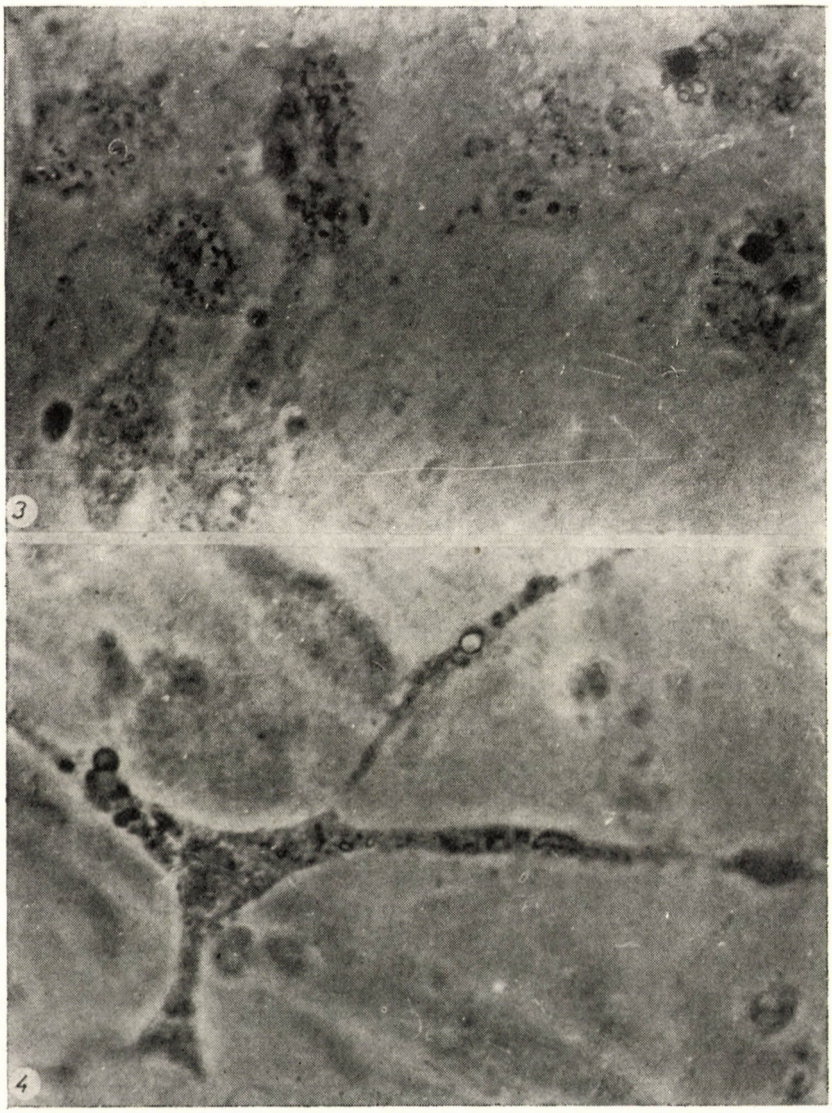


Fig. 3. Four-day-old Maximow culture of thymus from a sexually mature mouse. Note crystals of formazan appearing as black granules in the cytoplasm of epithelial reticular cells. ×500

Fig. 4. Four-day-old Maximow culture of thymus from a sexually mature mouse. Macrophage near explanted piece. Formazan crystals — part of them dissolved by fatty degeneration — well visible in the cell. ×500

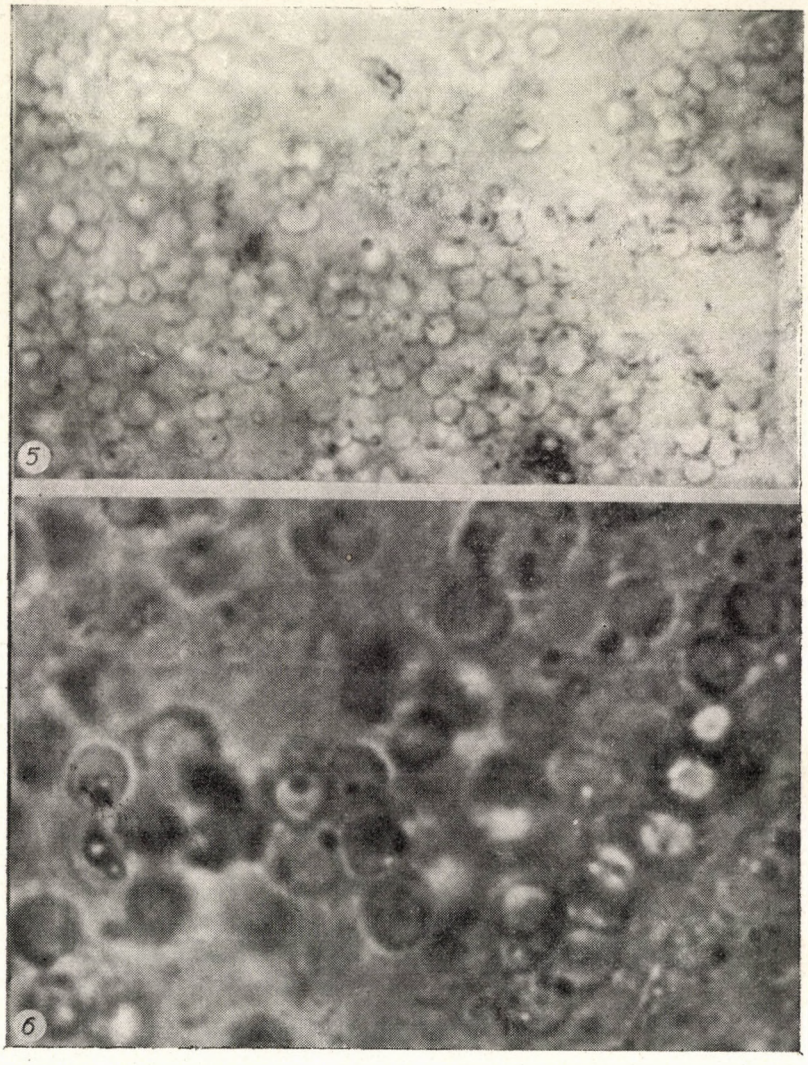


Fig. 5. Thymocytes shaken from thymus of sexually mature mouse into incubating solution. Incubation, one hour. Reaction indicated by black granules in the cells. ×200

Fig. 6. High power view of part of Fig. 5. ×500

The pale violet contours of the zone of growth were apparent even under low power. Likewise pronounced was the activity in the epithelial cells of young rabbits and rats (Figs. 2, 3, 4). The number of formazan granules per epithelial cell was approximately the same as in the case of mature mice but the granules were considerably finer. A phenomenon worthy of note was that, although certain cultures from mature rats and especially from mature guinea pigs

showed very marked growth, there were few formazan crystals in the newly formed cells of the epithelial reticulum, some cells were even negative. Epithelial cells from old guinea pigs contained few and small formazan granules. They were hardly perceptible immediately after incubation, but after a day or two they appeared in the cytoplasm as pink spots containing violet crystals.

As to the Hassall's bodies, they invariably appeared in the cultures as negative areas. We never succeeded in observing formazan crystals in these bodies, only a pale pink coloration was to be seen in some cases. In cultures of the thymus of young rats and young rabbits there were some mast cells; they contained many granules, a fact indicative of high activity.

(III) The reaction was very marked in thymocytes shaken into the incubation mixture (v. paragraph 3 under Material and Method). Nearly every cell contained formazan crystals arranged on the periphery of the cytoplasm (Figs. 5, 6). The size of the granules seemed to vary according to species and, within the species, according to age. Therefore, a determination of succinic dehydrogenase activity in different species and different age groups seemed to be reasonable. We used immature, mature and old guinea pigs, further mature and old mice in these experiments. Each age group consisted of five mice and five guinea pigs. The results are assembled in Table II.

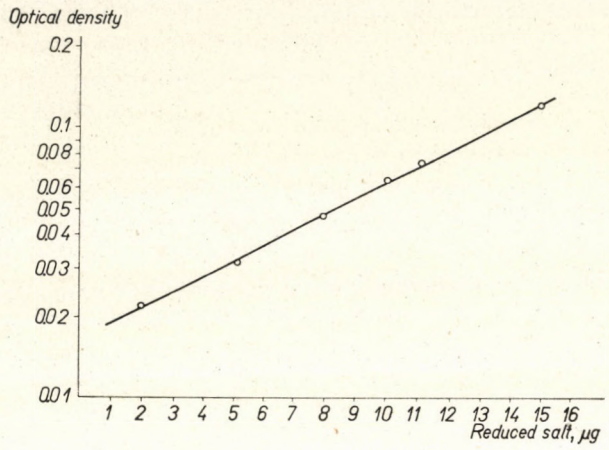
Table II

Succinic dehydrogenase activity of thymocytes shaken out from the thymus of different animals of different ages (5 individuals per age group)

	Mouse	Guinea pig
	Values expressed in mg/1.000.000 cells	
Sexually immature		4.33 5.51 4.20 1.85 1.63
Sexually mature	3.33 2.37 4.82 2.31 3.00	2.31 2.40 1.55 0.58
Old	0.51 0.05 0.16 0.15 0.21	1.41 1.50 0.97 0.83 0.62

The figures were obtained by means of the standard curve shown in Table III.

Table III



Discussion

The purpose of our experiments was to study succinic dehydrogenase activity in the principal constituents of thymic tissue taken from laboratory-bred rodents of different species and different ages. While the findings yielded by freshly frozen sections were cytologically almost useless, we obtained very satisfactory reactions in tissue cultures. The results justify the following conclusions.

(I) *Epithelial reticular cells*

These give a positive reaction the intensity of which depends on species and age. Their strong enzymatic activity points to a vigorous metabolism. This seems to be in agreement with literary data according to which the cells in question fulfil many important functions. Epithelial reticular cells are supposed to detach themselves and to turn into epithelial macrophages; thymocytes, too, are assumed to derive (partly at least) from these cells; and it must be in the cells of the epithelial reticulum that those processes take place in the course of which DNA is synthesized and supplied to the organism. Such functions require a degree of enzymatic activity which exceeds that of any other component of the thymus. It was remarkable that some well-growing cultures showed no or hardly any enzymatic reaction. This means that, while appearing fully alive in the cultures, these cells were not intact as regards their metabolism. This is especially clear if we remember that succinic dehydrogenase is bound to the mitochondria, one of the most sensitive organelles of the cell. If follows that — contrary to appearances — tissue cultures are not always the most favourable milieu for cells and their organelles.

As mentioned above, in cultures prepared from the thymus of old guinea pigs after one or two days there appear pink spots with small formazan granules that are to be found in cellular zones that at first seemed to be negative. We suggest the explanation that the epithelial reticulum of such cultures contains lipid granules which subsequently lead to the complete degeneration of the cells. The newly formed formazan crystals are soluble in lipids, and are thus dissolved by the cytoplasm's lipid phase. The presence of formazan granules therefore indicates intracellular enzymatic activity and the dissolution of the granules in the lipid phase indicates at the same time the degree of fatty degeneration.

(II) *Hassall's corpuscles*

These gave negative reactions throughout our experiments. The question arises whether Hassall's bodies should be regarded as products formed in the course of thymic degeneration or, on the contrary, as signs of vitality. The appearance of Hassall's corpuscles indicates the liberation of a considerable amount of a PAS positive substance, at the same time the epithelial cells are forming conglomerates but are capable of regeneration [4]. The role played by succinic dehydrogenase has been described in the introductory part of this paper: as a member of the citrate group, it is involved in processes directly concerned with energy supply. If an enzyme of such significance is absent from a tissue it is justified to regard the latter as having no full functional value. We think therefore that the functional significance of Hassall's corpuscles is less than that of epithelial reticular cells.

(III) *Thymocytes*

These, too, were found to have enzymatic activity which — as is evident from Table II — obeys certain rules. Enzymatic activity is demonstrable only in thymocytes shaken from freshly removed thymuses. Such activity cannot be observed in cultures, for it disappears very soon after the explantation of thymic tissue. This is in full agreement with our view that mature thymocytes are incapable of further development and differentiation.

Summary

Succinic dehydrogenase activity in thymuses obtained from laboratory-bred rodents of different species and different age groups has been studied. Enzymatic activity has been found to vary according to both species and age. There was beyond differences due to these factors, also a difference between the enzymatic activity of the various tissue elements which constitute the thymus, namely the reticular cells, Hassall's corpuscules and the thymocytes.

REFERENCES

1. DEFENDI, V., PEARSON, B.: (1955) Quantitative Estimation of Succinic Dehydrogenase Activity in a Single Microscopic Tissue Section. J. Histochem. Cytochem. *3*, 61—69. — 2. BARKA, T., DALLNER, G.: (1957) The Reduction of Tetrazolium Salts by Ascites-Tumor Cells in the Presence of Glucose. J. Histochem. Cytochem. *6*, 174—180. — 3. KISZELY, GY., BARKA, T.: (1958) Gyakorlati mikrotechnika és histochemia. Medicina, Budapest. — 4. PADYKULA, H. A.: (1952) The Localization of Succinic Dehydrogenase in Tissue Sections of the Rat. Amer. J. Anat. *91*, 107—145. — 5. PÁLYI, I., KAPA, E.: (1959) In vitro Behaviour of Thymus Irradiated with X-rays. Acta biol. hung. Suppl. *3*, 47. — 6. SELIGMAN, A. M., RUTENBURG, A. M.: (1951) The Histochemical Demonstration of Succinic Dehydrogenase. Science *113*, 317—320. — 7. SMITH, T., WHARTON, J., GERHARDT, A. M.: (1958) XI. Histochemical studies of thymus, spleen and lymph node in normal and irradiated mice. Anat. Rec. *131*, 369—383. — 8. TÖRŐ, I.: (1955) A csecsemőmirigy histophysiologiája. Debreceni Orvostudományi Egyetem tudományos üléseinek évkönyve 1954—55. 1—4. — 9. TÖRŐ, I.: (1958) A csecsemőmirigy szöveti szerkezete. MTA Biol. Csop. Közl. (Budapest) *1*, 47—64. — 10. TÖRŐ, I.—AROS, B.: (1958) A thymus szöveti reakciója különböző behatásokra. MTA Biol. Csop. Közl. (Budapest) 431—449.

АКТИВНОСТЬ ДЕГИДРАЗЫ ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ ЗОБНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЛАБОРАТОРНЫХ ГРЫЗУНОВ

А. Т. ДЬЕВАИ, Э. КАПА

Авторы исследовали активность дегидразы янтарной кислоты зобной железы лабораторных грызунов различных видов и различного возраста. Было установлено, что активность энзима меняется в зависимости от возраста и от вида животных. Ферментативная активность строющих зобную железу тканевых клеток, в том числе ретикулярных клеток, гассалевских телец и тимоцитов различна и изменяется также в зависимости от возраста и вида животных.

SUCCINODEHYDROGENASEAKTIVITÄT DES THYMUS VON LABORATORIUMSNAGETIEREN

A. T. GYÉVAI und E. KAPA

Die Succinodehydrogenaseaktivität des Thymus von Laboratoriumsnagetieren verschiedenen Alters und verschiedener Arten wurde untersucht. Es wurde festgestellt, daß sich die Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Art und vom Alter der Tiere verändert. Die Enzymaktivität der den Thymus aufbauenden Gewebezellen, so z. B. der Retikulumzellen, der Hassallschen Körperchen und der Thymozythen ist verschieden und ändert sich gleichfalls in Abhängigkeit von der Art und vom Alter der Tiere.

Angéla T. GYÉVAI
Eszter KAPA
Budapest IX. Tűzoltó u. 58. Hungary

Abteilung für gerichtliche Stomatologie der Zahn-, Mund- und Kieferchirurgischen Klinik der Medizinischen Universität, Budapest (Vorstand: Prof. K. Balogh)

DIE QUANTITATIVEN VERÄNDERUNGEN EINZELNER BESTANDTEILE DES HUMERUS UND DER MANDIBULA WÄHREND DES SENIUMS

D. Schranz

(Eingegangen am 24. März 1960)

In der Literatur findet man mehrere widersprechende Angaben über die biochemischen Wandlungen der Zusammensetzung der Knochen während des Alterns (Recklinghausen 1858, Triepel 1908, Radasch 1921, Wetzl 1932, Deakins 1944, Hansen 1954, Rudinu 1957). Zur Klärung dieses Problems habe ich an Oberarmknochen und Unterkiefern makroskopische, röntgenologische und biochemische Untersuchungen durchgeführt.

Die Untersuchungen hinsichtlich der makroskopischen Knochenstruktur haben ergeben, daß beim Vorgang des Alterns die Spongiosastruktur sowohl des Humerus als auch der Mandibula sich lockert. Dies hängt eng mit der Funktionsverminderung zusammen. Als Beweis möchte ich anführen, daß z. B. an Zahnverluststellen oder unter Zähnen, deren Antagonist verloren ging, bald ein Umbau der Trajektorien des Unterkiefers stattfindet (Gámán 1928), die Trabekeln verdünnen sich, ja es tritt sogar Schwund derselben auf, so daß der Knochen an solchen Stellen oft keine charakteristische Strukturzeichnung aufweist.

In den Knochen findet während des ganzen Lebens ein fortwährender Abbau und Anbau statt. Die Erweiterung der Markräume im höheren Alter ist Folge der Osteoporose, welche auch an den proximalen Enden des Humerus älterer Personen wahrgenommen werden kann. Die Altersosteoporose ist eine rein physiologische Involutionserscheinung und beruht im wesentlichen auf einer normal verlaufenden Knochenresorption, aber auf einer durch hormonell bedingten Osteoblasteninsuffizienz gestörten mangelhaften Apposition, d. h., der Ablauf der Resorption ist auch im Alter unverändert, die Bildung von Knochentrabekeln ist aber verlangsamt (Becker 1958 u. a.). Dadurch erfährt die feste Substanz der Knochen eine Verminderung.

Bekanntlich weist der Knochen eines gealterten Menschen bei unter sonst gleichen Umständen angefertigten Röntgenaufnahmen eine vermehrte Strahlendurchlässigkeit, als derselbe von jüngeren Personen auf. Noch ausdrücklicher ist dies der Fall bei älteren weiblichen Knochen. Diese Eigenart kann man auch an frischen Knochen wahrnehmen, sie kommt aber an Aufnahmen von mazerierten bzw. trockenen Knochen noch deutlicher zum Ausdruck. Man kann aus dieser Erscheinung darauf schließen, daß der Knochen von Bejahrten kalkarmer ist, als der von Jugendlichen. Es scheint daher beim Knochen ein wichtiges Kennzeichen des allgemeinen Alterns: die Schlackenstoffanreiche-

rung zu fehlen, ja sogar eine Verminderung des Gehaltes an Kalkstoffen zu erfolgen wegen Verfallen der festen Stützstruktur.

Die weiteren Untersuchungen hinsichtlich der Oberarmknochen ergaben, daß man aus dem Gewicht des aus frischen Leichen entnommenen Humerus auf den Vorgang des Alterns überhaupt keine Schlüsse ziehen kann, da die Oberarmknochen gleich schwerer und großer jüngeren und älteren Menschen im allgemeinen das gleiche Gewicht zeigten. Nimmt man dagegen bei der Untersuchung von mazeriertem oder trockenem Knochen einen von einem älteren Menschen stammenden Humerus in die Hand, so wird man denselben oft viel leichter finden, als den Knochen eines jüngeren Menschen.

Zur Klärung dieses auffallenden Unterschiedes habe ich das Gewicht von 674 Oberarmknochen — welche aus frischen Leichen entnommen wurden — zuerst in frischem Zustande, dann nach der Mazeration bestimmt. Danach wurden mehrere Knochen verascht. Dies erfolgt in einem elektrischen Ofen bei 1100° C Temperatur 3—4 Stunden lang und der Aschenrückstand wurde ebenfalls abgewogen. Von den 674 Oberarmknochen wurden 35 männliche und 38 weibliche, insgesamt also 73 Humeri verascht. In Tabelle I werden die Aschenverhältnisse von insgesamt 49 Oberarmknochen veranschaulicht. Es sind die männlichen und weiblichen Humeri gesondert behandelt, unterhalb des 50sten Lebensjahres sind die Verhältnisse nur in zehnjährigen, oberhalb dieses Alters aber in zweijährigen Abständen aufgezeichnet. Aus der Tabelle geht hervor, daß sich in extremen Fällen — vor allem in solchen über 70 Jahren, wenn die Osteoporose aus biologischen Gründen schon ziemlich vorgerückt ist — der Aschenrückstand bei Männern um $^1/_3$, bei Frauen sogar um $^2/_3$ vermindern kann, aber auch ganz im allgemeinen ist die Verminderung der Aschenrückstände über 70 Jahre bei den Humeri der Frauen ausdrücklicher als bei den der Männer.

Diese Untersuchungsergebnisse liefern zweifellos einen Beweis dafür, daß es sich im Greisenalter, über 70 um eine vom Grad der Osteoporose abhängige Verminderung des Aschenrückstandes bzw. der Kalkstoffe handelt. Das ist mit der quantitativen Verminderung der festen Substanz zu erklären. Daraus kann man auch folgern, daß bei alten Menschen aller Wahrscheinlichkeit nach mehr der beiden übrigen Bestandteile des Knochens: nämlich des Gewebswassers und der organischen Substanzen (z. B. Knochenmark) vorhanden ist als bei Jugendlichen, sonst könnte ja das Gewicht der frischen Knochen nicht übereinstimmen. PONSOLD (1940) behauptet ebenfalls: »die feste Substanz der Knochen wird mit dem Alter geringer und der Flüssigkeitsgehalt nimmt zu«. In bezug auf das Knochensystem kann man also die Schrumpfung und die Austrocknung nicht als charakteristische Zeichen des Alterns ansehen.

Was wir hinsichtlich des Oberarmknochens festgestellt haben, hat sich auch betreffs des Unterkiefers und anderer Knochen als richtig erwiesen

Tabelle I

Die Aschenverhältnisse des Oberarmknochens während des Alterns (Knochenasche: frischer Knochen in %)

Alter	Männer	Frauen
20	31,62	32,70
30	29,44	29,03
40	23,53	32,95
50	24,59	28,05
52	32,38	27,11
54	31,14	29,97
56	31,10	28,52
58	26,98	25,10
60	33,09	26,15
62	26,02	27,68
64	25,21	23,13
66	29,45	17,94
68	32,56	21,53
70	32,91	16,66
72	24,44	24,75
74	*20,22*	21,71
76	27,83	20,14
78	22,10	16,38
80	28,41	20,51
82	23,22	21,19
84	21,96	13,34
86	21,38	17,42
88	24,78	*12,54*
90		14,88
92		17,38
96		20,03

(HEINRICH 1941); es erfolgt nämlich im hohen Alter eine vermehrte, durch die Progredienz der Osteoporose bestimmte Strahlendurchlässigkeit, eine Verschmälerung der Kortikalis und eine dünne, lockere Struktur der Spongiosa. Aus alldem wird auch die erhöhte Brüchigkeit der Knochen während des Alterns verständlich.

Die oben angeführten Untersuchungsergebnisse, da sie sich auf ein relativ kleines Material stützen, dürfen nur als wegweisend betrachtet werden. Nachdem zwischen dem chronologischen und biologischen Lebensalter gerade

im Senium die größten Abweichungen vorkommen, läßt sich die Osteoporose aus diesem Grunde auch bei Gleichaltrigen in sehr wechselndem Grad vorfinden. Ist der alte Mensch in gutem biologischen Zustand erhalten. d. h. ist die Osteoporose bei ihm kaum vorgeschritten, so kann man trotz dem hohen Lebensalter nicht erwarten, daß die Menge der anorganischen Knochenbestandteile von der der jugendlichen Knochen wesentlich abweicht. Dies ist auch aus Tabelle I ersichtlich. Es wäre von Interesse, diese Frage an größerem Material eingehend zu untersuchen, wobei die aus zahlreichen Knochen verschiedener Altersklassen gewonnenen Mittelwerte bindende Schlüsse zulassen würden, was für eine biologische Streuung den einzelnen Altersgruppen entspricht.

Zusammenfassung

Die allgemeinen Regel der Schlackensubstanzanreicherung, der Schrumpfung und der Austrocknung mit dem Alter besitzen für den Knochen kaum eine Gültigkeit. Bei alten Menschen, und besonders bei Greisen vermindert sich wegen der Osteoporose der Trockensubstanz, bzw. der Kalkstoffgehalt in den Knochen und aller Wahrscheinlichkeit nach vermehren sich das Gewebswasser und auch die organischen Substanzen. Laut unseren Untersuchungen sind diese Änderungen ausgesprochener bei Frauen über 70 Jahren als bei Männern desselben Alters.

LITERATUR

Becker, R.: (1958) Die Differentialdiagnose und Therapie der Altersosteoporose. Z. Alternsforsch. *2*, 273. — Berndt, H.: (1947) Entwicklung einer röntgenologischen Altersbestimmung am proximalen Humerusende aus den bisherigen Methoden. Z. ges. Inn. Med. *2*, 122. — Deakins, M. L.: (1944) Changes in the Composition of Bone with Age. J. biol. Chem. *156*, 77. — Gámán, F.: (1928) Adatok az állkapocs csontrendszerének ismeretéhez normális és némely kóros viszony között. Fogorv. Szle (Budapest) *21*, 456. — Hansen, G.: (1954) Die Altersbestimmung am proximalen Humerus- und Femurende im Rahmen der Identifizierung menschlicher Skelettreste. Wiss. Z. Humboldt Univ. Berlin. 1953/54. — Heinrich, A.: (1941) Alternsvorgänge im Röntgenbild. Thieme. Leipzig. — Ponsold, A.: (1940) Knochen. In Neureiter—Pietrusky—Schütt: Handwörterbuch der gerichtlichen Medizin. Springer. Berlin. — Radasch, H. E.: (1921) Determination of the Percentage of the Organic Content of Compact Bone. Anat. Rec. 21. 153. — Recklinghausen, F.: (1858) Arbeiten aus dem chemischen Laboratorium des Pathologischen Instituts in Berlin. Virchows Arch. path. Anat. *14*, 466. — Triepel, H.: (1908) Einführung in die physiologische Anatomie. 3. Teil: Die trajektoriellen Strukture. Wiesbaden. — Wetzel, G.: (1932) Altersanatomie. Verhandl. Anat. Ges. in Lund.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ИЗМЕНЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ПЛЕЧЕВОЙ КОСТИ И НИЖНЕЙ ЧЕЛЮСТИ В СТАРЧЕСКОМ ВОЗРАСТЕ

Д. ШРАНЦ

Результаты проведенных автором исследований показывают, что общее правило, согласно которому с процессом старения органы сморщиваются, высыхают и увеличивается в них содержание шлаковых-золистых веществ нельзя отнести к костям. В костях пожилых людей и особенно лиц старческого возраста в результате остеопороза понижается количество плотного веществ, точнее солей кальция и по всей вероятности в них увеличивается количество воды и органических веществ. Исследования показывают, что эти изменения более выражены среди женщин старше 70 лет, чем среди мужчин такого возраста.

QUANTITATIVE CHANGES IN CERTAIN CONSTITUENTS OF THE HUMERUS AND MANDIBULA DURING THE SENESCENCE

D. SCHRANZ

The bones seem to make an exception to the general rule according to which organs gradually exsiccate and shrink with age, while anorganic material accumulates in them. As a result of osteoporosis, the quantity of the solid osseous substance, resp. the calcium salts decreases in old age, and the amount of water and of organic material probably increases. In the examined material this change was more marked in women over 70 years of age than in men of the same age.

Dr. Dénes SCHRANZ, Budapest IX. Üllői út 19. Ungarn

Institut für Anatomie und Chirurgische Operationslehre (Leiter: Prof. Dr. T. Maros), Hochschule für Medizin und Pharmakologie, Tîrgu-Mureş, (Rumänische Volksrepublik)

ÜBER DIE NACH CHLORPROMAZINBEHANDLUNG EINGETRETENE MODIFIKATION DER MIKROGLIA-REAKTION AN DER STELLE EXPERIMENTELLER GEHIRNLÄSIONEN

T. Maros, M. Csiky und L. Seres-Sturm

(Eingegangen am 17. September 1959)

Es ist in den letzten Jahren von mehreren Autoren versucht worden, die Wundheilung nach Gehirnläsionen medikamentös zu beeinflussen. Man hat in dieser Hinsicht hauptsächlich die Wirkung derjenigen Medikamente untersucht, welche durch ihren Effekt auf die mesenchymalen Gewebselemente die Entzündung vermindern und die Fasernbildung verzögern. Zu dieser Gruppe zählen die Glykokortikoide mit ihrer wohlbekannten entzündungs- und fibrosehemmenden Wirkung (Ragan und Spain, Hadock und Blunt, Coste, Astapenko, Smirnow).

Angesichts dieser Wirkung der Glykokortikoide haben einige Autoren (Markovici, Ionescu und Markovici) experimentell untersucht, welchen Einfluß die Cortisonverabreichung auf den Wundheilungsprozeß nach der Gehirnläsion ausübt. Aus ihren Ergebnissen darf geschlossen werden, daß Cortison die an der Stelle der Gehirnläsion zustande kommende Bindegewebs- und Gliareaktion unterdrückt; es entstand feines, linienartiges Narbengewebe, die Adhäsionen beschränkten sich auf einen kleineren Bereich und waren weniger ausgeprägt als bei den Kontrolltieren.

Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen sind andere Autoren (Glees) der Meinung, auf die Gliosis nach der traumatischen Gehirnläsion sei Cortison ohne Einfluß.

Mit Rücksicht darauf, daß die Kontinuitätsdefekte des Gehirns vom Neuroglia und Bindegewebe ersetzt werden, was zu ausgedehnten Adhäsionen, mitunter zur Bildung massiver Narben führt, sind wir der Ansicht, daß es im Interesse einer eventuellen Beeinflussung der Spätfolgen von Gehirnläsionen angezeigt ist, die Wirkung von Medikamenten zu untersuchen, welche auf diese Prozesse möglicherweise einen Effekt ausüben. So gelangten wir zu der Annahme, daß die medikamentöse Hibernation, welche die allgemeine Reaktionsbereitschaft des Organismus weitgehend beeinflußt, sicherlich auch die an der Lokalisation der traumatischen Gehirnläsionen vor sich gehende Gliareaktion modifizieren wird. Diese Hypothese schien auf Grund der in unserem Institut seit Jahren durchgeführten Versuche berechtigt, welche den Effekt der medikamentösen Hibernation auf die Organisationsprozesse in den Wun-

den der Haut und einzelner Organe (Leber, Muskel) bestätigten (NÉBEL, MESTER, KAPITÁNY).

Material und Methoden

Die Versuche wurden an 18 jungen Albinoratten beiderlei Geschlechts vorgenommen die wir in 2 Gruppen teilten.

Bei den Tieren der I. (Versuchs-) Gruppe wurde in Äthernarkose längs der Pfeilnaht ein Längsschnitt angelegt und an einer vorher bestimmten Stelle des entblößten Schädels die Spitze eines schmalen Skalpells etwa 2—3 mm tief durch den Knochen in die Gehirnsubstanz eingeführt. Die Läsion erfolgte symmetrisch an beiden Seiten.

Bei den Ratten dieser Gruppe wurde Chlorpromazinverabreichung (i. m. 20 mg/kg Körpergewicht) 3 Tage vor der Operation eingeleitet und diese Behandlung bis zur Tötung fortgesetzt.

Bei den Tieren der II. (Kontroll-) Gruppe, die nicht mit Chlorpromazin behandelt wurden, erfolgten die Gehirnläsionen in derselben Weise wie bei den Tieren der I. Gruppe. Die Tiere beider Gruppen töteten wir im gleichen Zeitpunkt durch intrakardiale Einspritzung von Brom-Formol 48 Stunden bzw. 6, 14, 21, 30 und 49 Tage nach der Gehirnläsion. Laut HORTEGA und PENFIELD nimmt nämlich die Narbenbildung nach linienförmigen Gehirnläsionen bei Tieren durchschnittlich 50 Tage in Anspruch.

Eine Hälfte des Gehirns wurde im CAJALschen Brom-Formolgemisch, die andere Hälfte in 1:4 verdünntem 10%igen Formalin fixiert. Das Material wurde in beiden Fällen so geschnitten, daß sich die Schnittebene quer und senkrecht zur Läsionslinie befinde. Dadurch ergab sich die Möglichkeit, auch die der Läsion benachbarte graue und weiße Substanz zu untersuchen. Die 5 μ dicken Paraffinschnitte des in Formalin fixierten Materials färbten wir nach VAN GIESON und nach dem von KELEMEN modifizierten Tigroidfärbungsverfahren. Die 10 μ dicken Gefrierschnitte des in Brom-Formol fixierten Materials wurden nach dem modifizierten CAJALschen Goldsublimatverfahren imprägniert, das als die geeignetste Methode zur Darstellung der Astrozyten gilt (KISZELY, BARKA), darüber hinaus aber je nach der Fixierungsdauer auch andere Gliaelemente aufzeigt.

Ergebnisse

Nach 48 Stunden war sowohl bei dem Kontrolltier wie bei der mit Chlorpromazin behandelten Ratte umschriebene Einblutung und eine breite Detrituszone an der Läsionsstelle zu sehen, die sich scharf gegen die intakte Gehirnsubstanz abgrenzte.

Bei dem Kontrolltier waren in diesem Bereich außer Blutzellelementen reichlich abgerundete Gliazellen anzutreffen, deren Zytoplasma bräunlichrote Klümpchen in großer Menge enthielt. Die Läsionsstelle war von dicht nebeneinander liegenden hypertrophisierten Astrozyten umsäumt, unter denen hier und da einzelne degenerierte Formen vorkamen.

In der Läsionszone des mit Chlorpromazin behandelten Tieres waren weniger Klümpchen enthaltende abgerundete Gliazellen zu sehen. Die Menge der in ihnen enthaltenen Granula war geringer als bei den Kontrolltieren.

Im Umkreis der traumatischen Zone sieht man etwas vermehrte, größtenteils normal aussehende Astrozyten, die sich von der entfernteren Makroglia kaum unterscheiden.

Nach 6 Tagen sehen wir bei dem Kontrolltier eine stärker umrissene traumatische Zone als bei dem behandelten (Abb. 1). Von der regionären

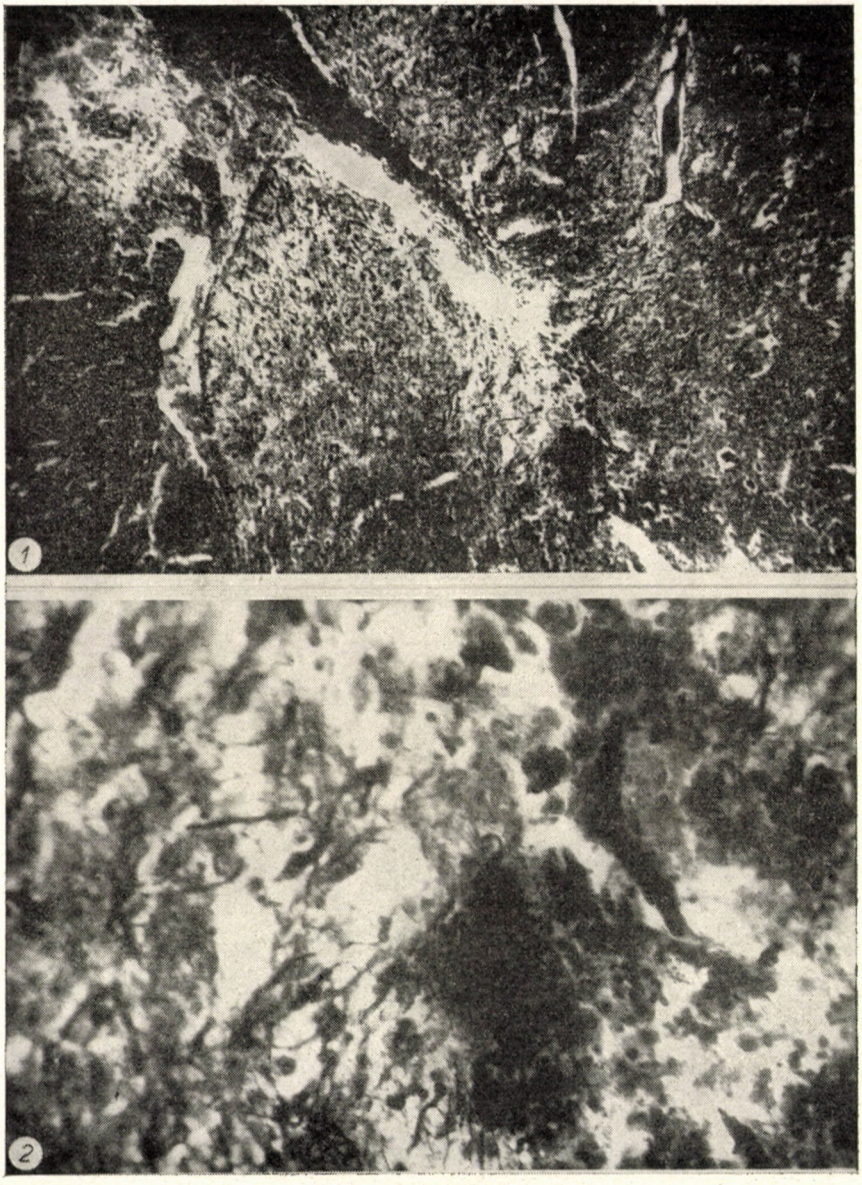


Abb. 1—2. Die Wundstelle und ihr Rand 6 Tage nach der Läsion (weiße Substanz). Kontrolltiere. CAJALsche Goldsublimatimprägnation. Vergrößerung: Abb. 1 Obj. 6/0,16, Abb. 2: Obj. 24/0,42

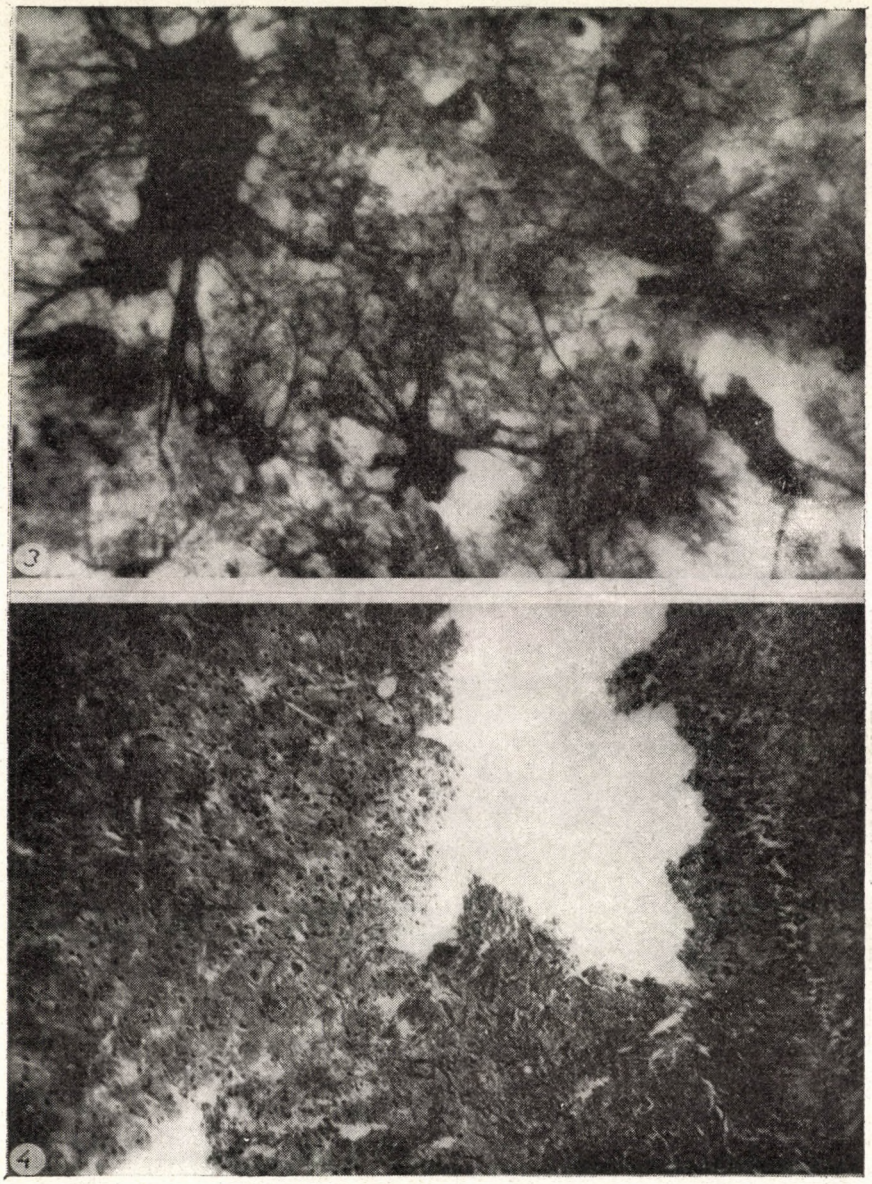


Abb. 3—4. Die Wundstelle und ihr Rand 6 Tage nach der Läsion (weiße Substanz). Abb. 3: Kontrolltier; Abb. 4: mit Chlorpromazin behandeltes Tier. CAJALsche Goldsublimatimprägnation. Vergrößerung: Abb. 3 Obj. 45/0,65, Abb. 4 Obj. 6/0,16

Gehirnsubstanz kriechen grob imprägnierte Astrozytenfortsätze in die Umgebung der Detrituszone (Abb. 2). Perifokal befindet sich eine Gliazellzone, die reich mit Fasern durchwoben ist und viele hypertrophisierte Astrozyten enthält (Abb. 3).

In der traumatischen Zone des mit Chlorpromazin behandelten Tieres (Abb. 4) finden wir mit starker Vergrößerung weniger detritushaltige abgerundete Gliazellen als bei dem Kontrolltier. Die Mehrzahl der Astrozyten, welche die Läsionslinie umgeben, hat ein normales Aussehen (Abb. 5 u. 6). Die traumatische Zone ist von weniger Astrozytenfortsätzen durchwoben als bei den Kontrollratten (Abb. 6).

Nach 14 *Tagen* sieht man bei den Kontrolltieren ausgeprägte Gliaproliferation an der Läsionsstelle und in ihrer Nachbarschaft (Abb. 7). Im Umkreis der traumatischen Zone sind zahlreiche, dunkel gefärbte Klümpchen enthaltende abgerundete Gliazellen und Anzeichen kräftiger Randgliosis wahrnehmbar (Abb. 8 u. 9). Die perifokale Gliazone besteht vorwiegend aus hypertrophischen Astrozyten, die über massive Fortsätze verfügen (Abb. 9).

Beim behandelten Tier ist die Gliaproliferation bei weitem nicht so ausgeprägt wie bei den Kontrollratten (Abb. 10). Die abgerundeten Gliazellen enthalten weniger Granula (Abb. 11), und die Randgliosis ist weniger deutlich als bei den Kontrollen (Abb. 11 u. 12).

Was die Herkunft der oben beschriebenen detritushaltigen abgerundeten Gliazellen anlangt, so scheinen diese auf Grund der Tigroidfärbung den in der Literatur oft erwähnten »körnigen« Zellen zu entsprechen (Abb. 13 u. 16).

Nach 21 Tagen ist die Läsionszone beim Kontrolltier mit hypertrophischen Astrozyten und ihren Fortsätzen durchwoben (Abb. 14 u. 15). Das mikroskopische Bild entspricht faseriger Gliosis.

Beim behandelten Tier sehen wir an der Läsionsstelle zahlreiche hypertrophische Astrozyten, unter denen einzelne degenerierte Formen auffallen (Abb. 17 u. 18). Die Fibrose ist von geringerem Ausmaß, Gliazellen mit Granula sind nirgends zu sehen. Die perifokale Gliosis zeigt eher zellulären Charakter.

Am 30. Tage finden wir an der Läsionsstelle und in ihrer Umgebung dieselben Veränderungen wie beim vorigen Kontrolltier. Beim behandelten Tier sind am Läsionsort viele hypertrophische und degenerative Formen anzutreffen. Die perifokale Gliareaktion tritt schwächer in Erscheinung.

Nach 49 Tagen sehen wir beim Kontrolltier eine von normal aussehenden Astrozyten durchwobene massive Glianarbe, die von der umgebenden Gehirnsubstanz scharf abgegrenzt ist.

Beim behandelten Tier sind im Narbenbereich, hauptsächlich an den Randteilen, viele hypertrophische Astrozyten mit abgebrochenem Fortsatz wahrnehmbar. Im ganzen genommen ist die Narbe lückenhaft, von lockerer Struktur.

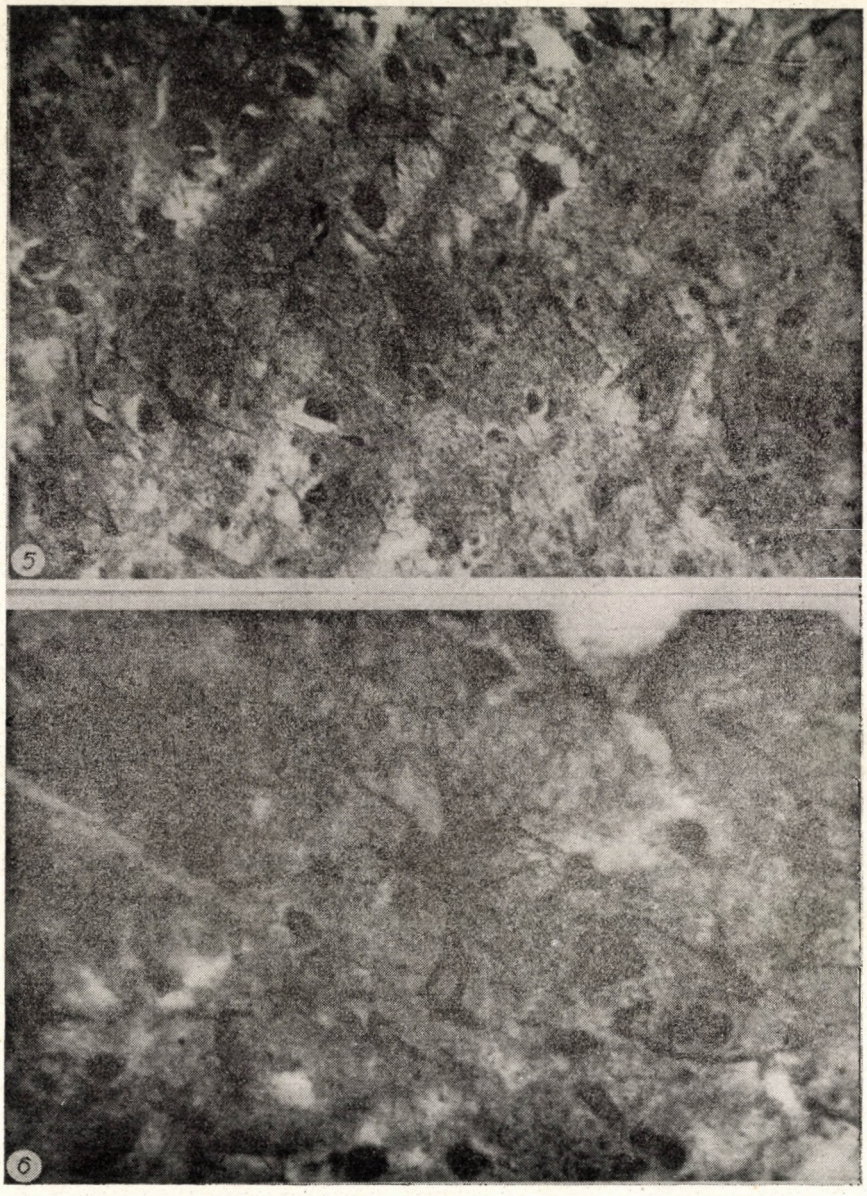


Abb. 5—6. Die Wundstelle und ihr Rand 6 Tage nach der Läsion (weiße Substanz). Mit Chlorpromazin behandelte Tiere. CAJALsche Goldsublimatimprägnation. Vergrößerung: Abb. 5 Obj. 24/0,42, Abb. 6 Obj. 45/0,65

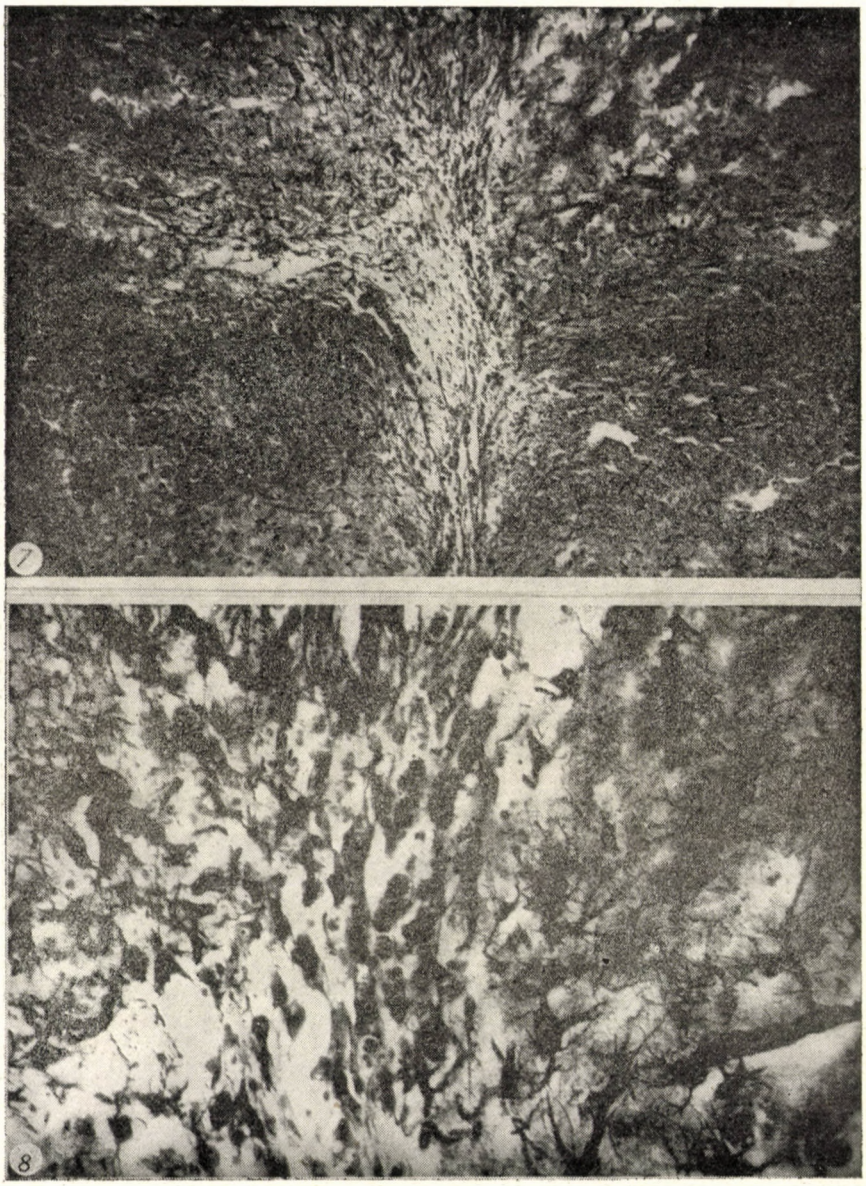


Abb. 7—8. Die Wundstelle und ihr Rand 14 Tage nach der Läsion (weiße Substanz). Kontrolltiere. CAJALsche Goldsublimatimprägnierung. Vergrößerung: Abb. 7 Obj. 6/0,16, Abb. 8 Obj. 24/0,42

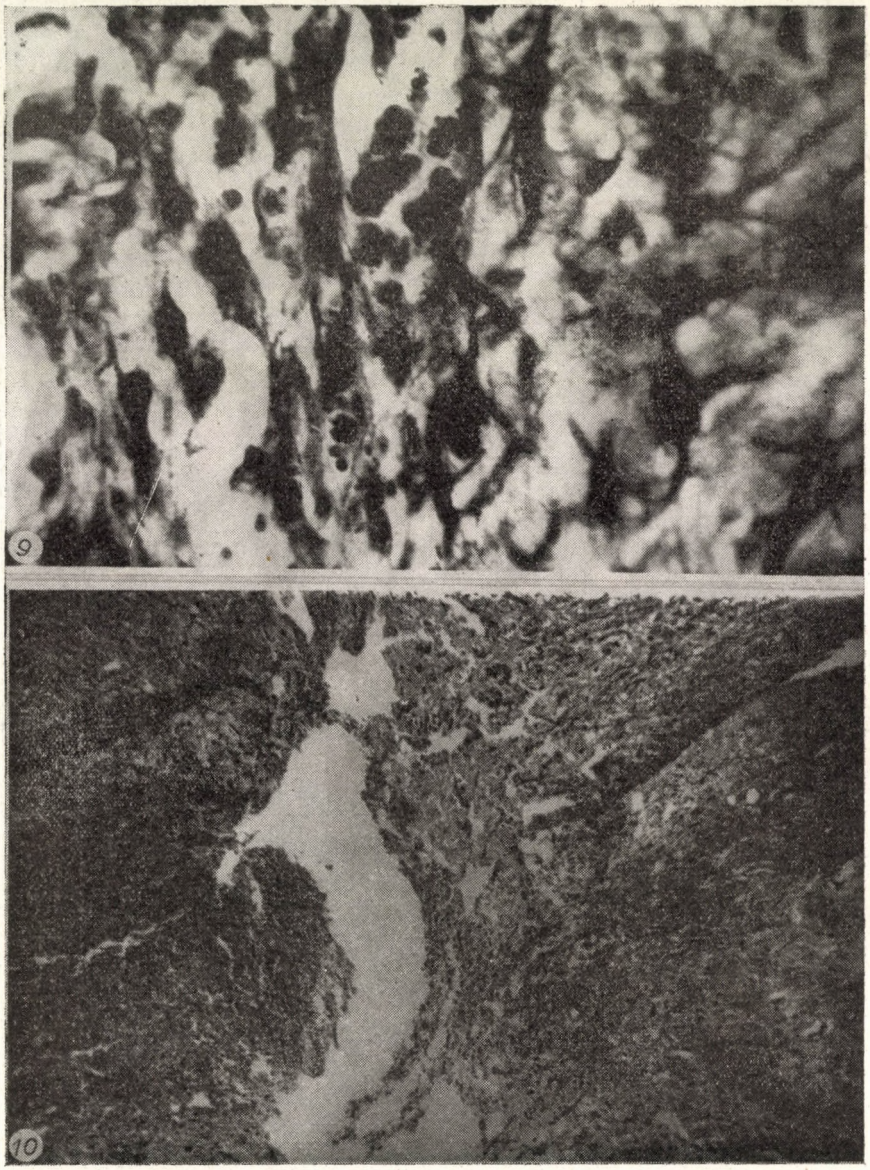


Abb. 9—10. Die Wundstelle und ihr Rand 14 Tage nach der Läsion (weiße Substanz). Abb. 9: Kontrolltier; Abb. 10: mit Chlorpromazin behandeltes Tier. CAJALsche Goldsublimatimprägnation. Vergrößerung: Abb. 9 Obj. 45/0,65, Abb. 10 Obj. 6/0,16

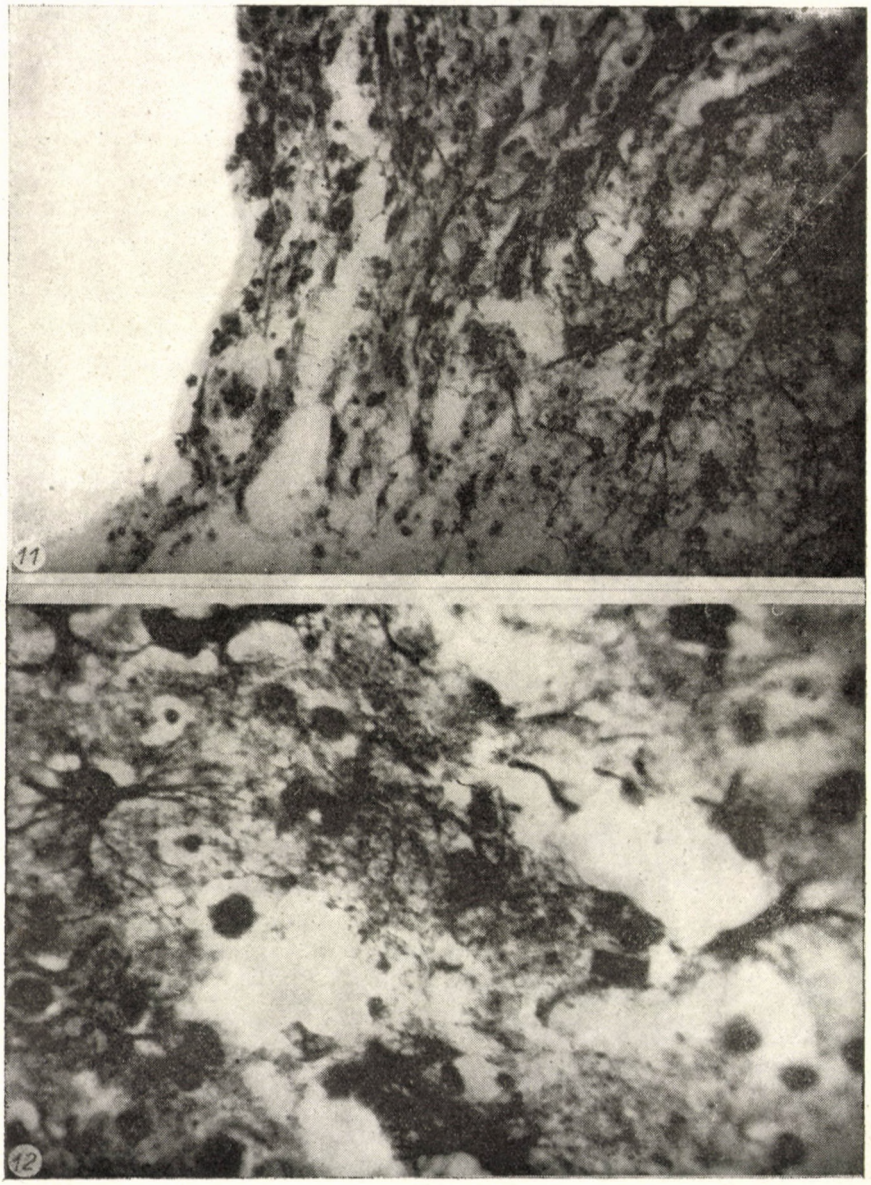


Abb. 11—12. Die Wundstelle und ihr Rand 14 Tage nach der Läsion (weiße Substanz). Mit Chlorpromazin behandelte Tiere. CAJALsche Goldsublimatimprägnation. Vergrößerung: Abb. 11 Obj. 24/0,42, Abb. 12 Obj. 45/0,65

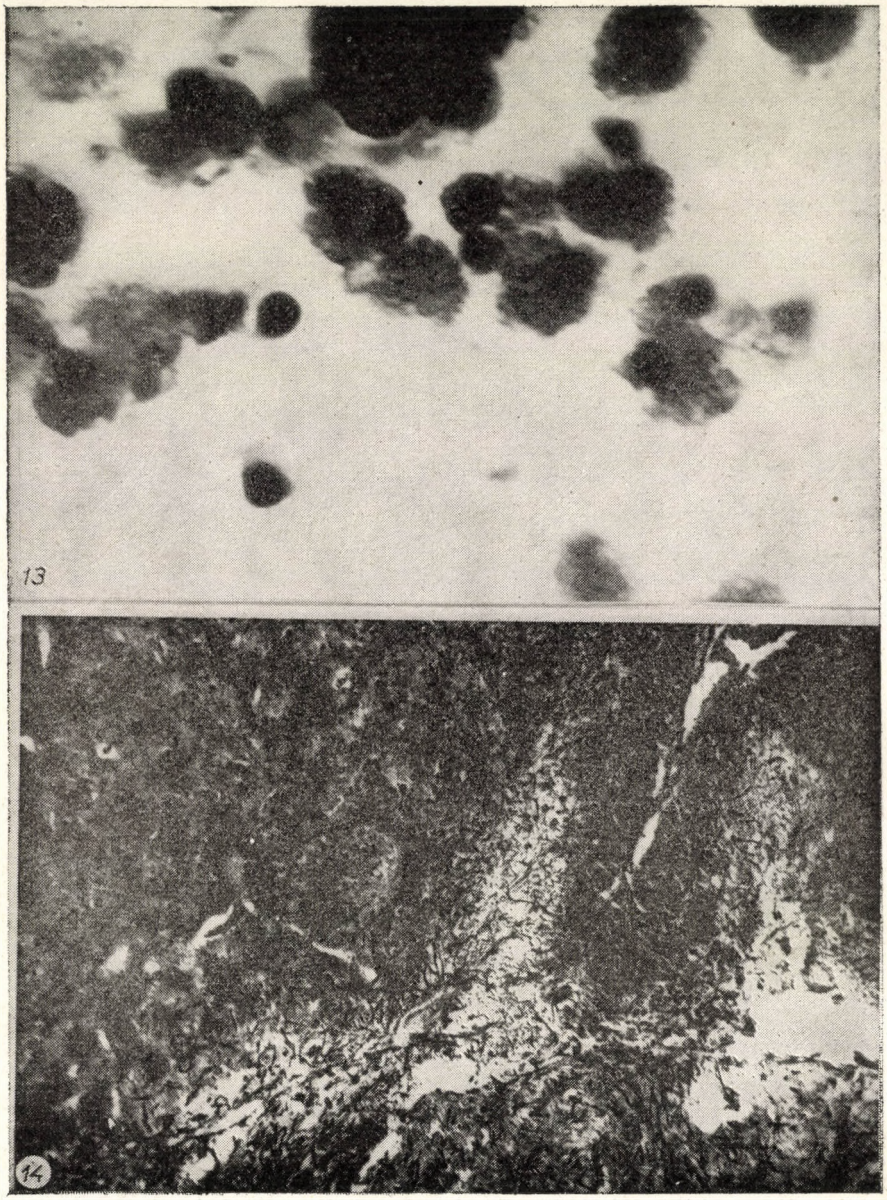


Abb. 13—14. Die Wundstelle und ihr Rand 14 Tage (Abb. 13) bzw. 21 Tage (Abb. 14) nach der Läsion (weiße Substanz). Kontrolltiere. Abb. 13: modifizierte NISSL-Färbung; Abb. 14: CAJALsche Goldsublimatimprägnation. Vergrößerung: Abb. 13 Obj. 100/1,30, Abb. 14 Obj. 6,0/16

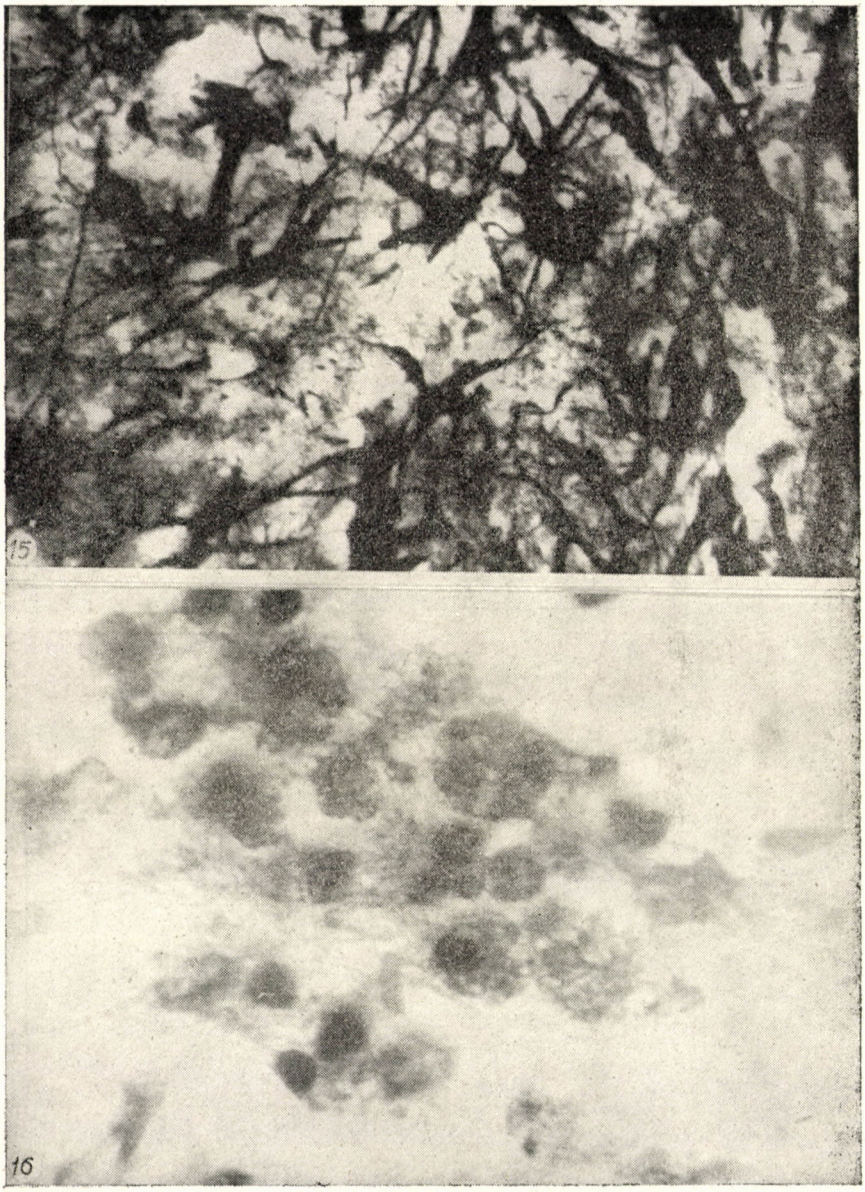


Abb. 15—16. Die Wundstelle und ihr Rand 14 Tage (Abb. 16) bzw. 21 Tage (Abb. 15) nach der Läsion (weiße Substanz). Abb. 15: Kontrolltier. CAJALsche Goldsublimatimprägnation; Abb. 16: mit Chlorpromazin behandeltes Tier, modifizierte NISSL-Färbung. Vergrößerung: Abb. 15 Obj. 45/0,65, Abb. 16 Obj. 100/1,30

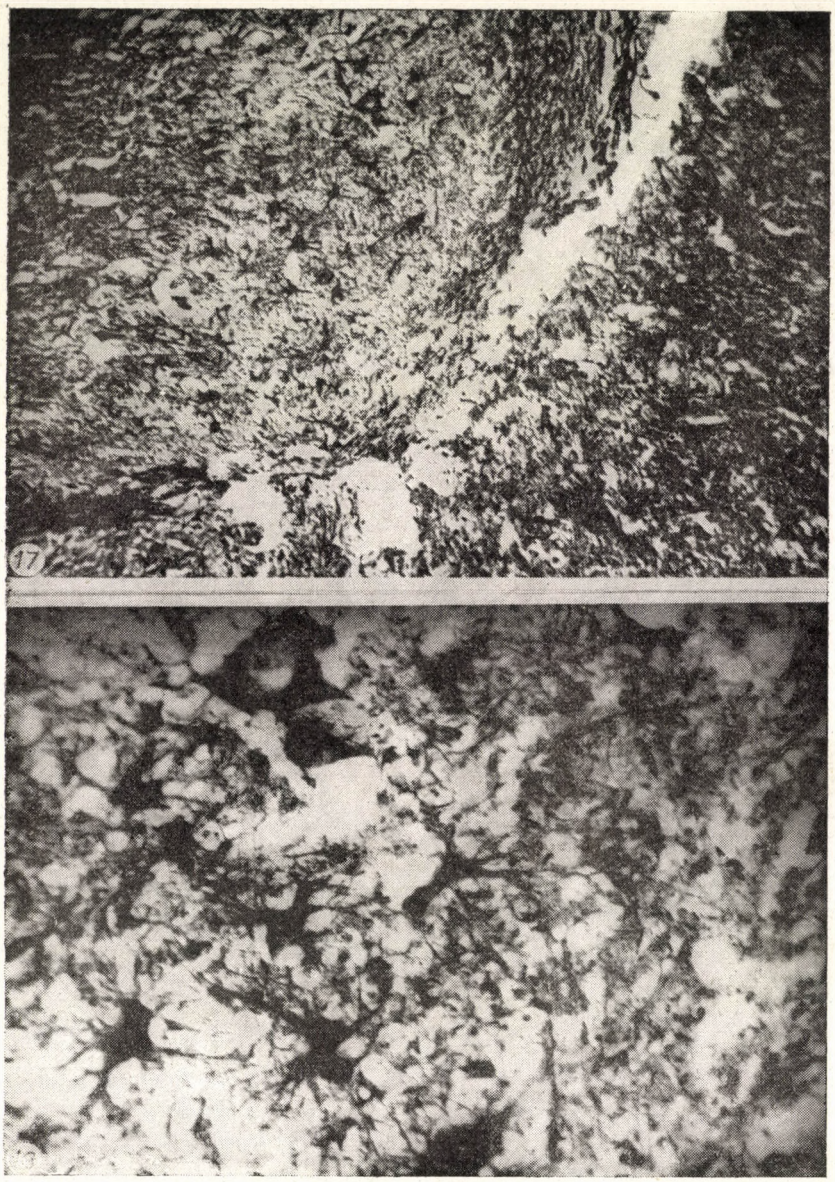


Abb. 17—18. Die Wundstelle und ihr Rand 21 Tage nach der Läsion (weiße Substanz). Mit Chlorpromazin behandelte Tiere. CAJALsche Goldsublimatimprägnation. Vergrößerung: Abb. 17 Obj. 6/0,16, Abb. 18 Obj. 24/0,42

Besprechung

Unsere Untersuchungen erstrebten die Klärung der Frage, ob Chlorpromazin einen Einfluß auf die am Orte der Gehirnläsionen vor sich gehende Makrogliareaktion ausübt.

Aus den Ergebnissen geht hervor, daß sich die Läsionsstelle und ihre unmittelbare Umgebung bei den mit Chlorpromazin behandelten Tieren in struktureller Beziehung von den Verhältnissen der im gleichen Zeitpunkt getöteten Kontrolltiere wesentlich unterscheidet.

Die Differenzen manifestieren sich bereits 48 Stunden nach der Läsion und noch auffallender bei den zu späteren Zeitpunkten getöteten Versuchstieren. Bei den Kontrolltieren ist der Wundheilungsprozeß von progressiven Gliaveränderungen (Hyperplasie, Hypertrophie, Mißbildungen, Fortsatzhyperplasie) begleitet, denen sich Anzeichen lebhafter Phagozytose von seiten einzelner Gliazellen zugesellen.

Die am Rand der traumatischen Zone sichtbaren, mit Klümpchen beladenen zahlreichen Gliazellen sowie die sich schon frühzeitig entwickelnde kräftige perifokale Gliosis stellen Zeichen der guten Reaktionsbereitschaft des Organismus dar, die nach jedem akuten Gehirntrauma als übliche reaktive Veränderungen anwesend sind. Dieser Prozeß führt zur Entwicklung einer faserigen Glianarbe, was bei unseren Kontrolltieren auch zu sehen war.

Bei den chlorpromazinbehandelten Ratten treten die progressiven Gliaveränderungen im Bereich der Gehirnläsion weniger ausgeprägt in Erscheinung, die Fortsatzhyperplasie und -hypertrophie ist gehemmt, und die in der Umgebung der Läsion wahrnehmbare geringe Astrozytenvermehrung kann mit der bei den Kontrolltieren beobachteten starken Gliareaktionen kaum verglichen werden.

Aus dem Detrituscharakter des lädierten Gebietes, den abgerundeten Gliazellen, die in geringerer Zahl anwesend sind und feiner verteilte Klümpchen enthalten, sowie aus der unvergleichlich schwächeren Fortsatzhyperplasie und -hypertrophie darf geschlossen werden, daß die am Orte der akuten Gehirnverletzungen ablaufende Makrogliareaktion von Chlorpromazin gehemmt wird. Es scheint, daß dieser Effekt mit der allgemeinen Wirkung des Chlorpromazins auf die Gewebe zusammenhängt, denn Chlorpromazin übt — wie wir bereits einleitend betonten — Einfluß auf den Wundheilungsprozeß aus. Diese Auffassung stimmt allerdings nicht mit den Feststellungen von LABORIT und HUGUENARD, ZÜRN sowie VÉGHELYI überein, die die Ansicht vertreten, daß Chlorpromazin die Wundheilung nicht beeinflußt.

Aus unseren Versuchen ergeben sich keine Schlußfolgerungen auf den Wirkungsmechanismus. Wir nehmen an, daß die Hemmung der progressiven Gliareaktion und Einverleibungstätigkeit eine Teilerscheinung der den Stoffwechsel beeinflussenden zentralen und peripheren Chlorpromazinwirkungen bildet.

Schlußfolgerungen

1. Chlorpromazin modifiziert die Makrogliareaktion nach Gehirnläsionen bei Albinoratten.

2. Der Effekt äußert sich in der Hemmung der progressiven Gliaveränderungen und der Phagozytose und bewirkt, daß sich die Gliareaktion verzögert und einen von der Reaktion der Kontrolltiere abweichenden Charakter aufweist.

3. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um eine Teilerscheinung der auch an mesenchymalen Geweben zur Geltung kommenden allgemeinen, den Stoffwechsel beeinflussenden zentralen und peripheren Wirkung des Chlorpromazins.

Zusammenfassung

Es wurde an Ratten untersucht, welchen Einfluß längere Verabreichung von täglich 20 mg/kg Chlorpromazin auf die Makrogliareaktion an der Stelle experimentell herbeigeführter Gehirnläsionen ausübt. Die Versuchs- und Kontrolltiere wurden 48 Stunden, 6, 14, 21,30 und 49 Tage nach der Gehirnläsion getötet, die histologischen Schnitte nach VAN GIESON, nach der KELEMENschen Tigroid- und CAJALschen Goldsublimatmethode gefärbt bzw. imprägniert.

Aus den Ergebnissen darf geschlossen werden, daß die nach der Gehirnläsion auftretende Makrogliareaktion von Chlorpromazin beeinflußt wird. Die Wirkung äußert sich in einer Hemmung der progressiven Gliaveränderungen, der Phagozytose und der Fortsatzhyperplasie bzw. -hypertrophie.

LITERATUR

1. Астапенко, М. Г.: (1954) Теп. арх. *4*, 23—32. — 2. GLEES, P.: (1955) Neurologia Morphology and Function. Thomas. Springfield, Illinois, U. S. A. — 3. KELEMEN, J.: (1958) Módosított festési eljárás az idegsejtek tigroid rögeinek kimutatására. Orv. Szle. (Tîrgu Mureş) 336. — 4. KISZELY, GY., BARKA, T.: (1958) Gyakorlati mikrotechnika és hisztokémia. Medicina, Budapest. — 5. LABORIT, H., HUGUENARD, P.: (1954) Pratique de l'hibernothérapie en (chirurgie et en médicine. Masson, Paris. — 6. Марковић, Н., Јонеску, Ш., Марковић, Г.: 1958)... Вопр. Нервохир. *2*. 15—20. — 7. MARCOVICI, N.: (1959) Cicatricea cerebrală. Editura Academiei, Bucureşti. — 8. MESTER, T., KAPITÁNY, A., NÉBEL, L.: (1958) A hibernatio hatása kísérletes ártalmak okozta szöveti folyamatokra. II. Kísérletes májsértés regenerációja largactil hatása alatt (előzetes közlemény). Orv. Szle (Tîrgu Mureş) 40. — 9. NÉBEL, L., KAPITÁNY, A., MESTER, T.: (1957) A hibernatio hatása kísérletes ártalmak okozta szöveti folyamatokra. I. Kísérletesen sértett bélszakasz szerkezeti módosulása largactil hatása alatt. Orv. Szle. (Tîrgu Mureş) 16. — 10. HORTEGA P. DEL RIO, PENFIELD, W.: (1927) Cerebral Cicatrix. Reaction of Neuroglia and Microglia to Brain Wounds. Johns Hopk. Bull. *4* , 278. — 11. VÉGHELYI, P.: (1960) Die künstliche Hibernation. Akademie Verlag, Budapest. — 12. ZÜRN, L.: (1953) Potenzierte Narkose und künstlicher Winterschlaf. Verh. dtsch. Ges. inn. Med. *60*, 1940.

МОДИФИКАЦИЯ РЕАКЦИИ МАКРОГЛИИ НА ДЕЙСТВИЕ ОБРАБОТКИ ХЛОРПРОМАЗИНОМ НА МЕСТЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ВЫЗВАННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Т. МАРОШ, М. ЧИКИ и Л. ШЕРЕШ—ШТУРМ

Авторы наблюдали каким образом длительное введение хлорпромазина влияет на реакцию макроглии на месте экспериментально вызванных повреждений головного мозга. Опыты проводились на 18 белых крысах, у которых были сделаны разрезы на определенном месте поверхности головного мозга. Подопытных и контрольных животных

убивали через 48 часов, как и на 6-ой, 14-ый, 21-ый, 30-ый и 49-ый день после повреждения головного мозга. Гистологические срезы были импрегнированы или окрашены методом Ван—Гизона, окраской тигроида по Келемену и методом хлористого золота и суммы по Кахалю.

Результаты опытов указывают на то, что хлорпромазин влияет на реакцию макроглии после повреждения головного мозга. Действие проявлялось в торможении прогрессирующих изменений глии, фагоцитоза и гиперплазии или же гипертрофии гипофиза.

MODIFICATION DE LA RÉACTION DES MACROGLIES SUR L'EFFET DU TRAITEMENT A LA CHLORPROMAZINE A L'ENDROIT DES LÉSIONS CÉRÉBRALES EXPERIMENTALES

T. MAROS, M. CSIKY et L. SERES-STURM

Les auteurs ont observés de quelle manière de l'administration prolongée de la chlorpromazine influence la réaction des macroglies à l'endroit des lésions cérébrales experimentales. Les expériences ont été pratiquées sur 18 rats blancs, sur lesquels des incisions ont été faites à un endroit déterminé de la surface cérébrale. Les animaux d'expérience, ainsi que les animaux de contrôle ont été sacrifiés 48 heures, resp. 6, 14, 21, 30 et 49 jours après la lésion cérébrale. Les coupes histologiques ont été colorées, resp. imprégnées par la coloration de van Gieson, la coloration tigroïde de Kelemen et par la méthode d'impregnation de Cajal.

Ces examens démontrent, que la chlorpromazine influence la réaction des macroglies qui suit la lésion experimentelle du cerveau. Son effet se manifeste par des changements progressifs des glias, dans la phagocytose et dans l'inhibition de l'hyperplasie, resp. de l'hypertrophie des processus.

Prof. Tibor MAROS
Dr. Miklós CSIKY
Dr. Lajos SERES-STURM
Tîrgu-Mureș, Str. Univerzitătii 38. Romînia

Geburtshilfliche Abteilung (Leiter: Gy. Tarján) und Prosektur (Leiter: F. Kneiszl), Schöpf—Merei-Krankenhaus (Direktor: K. Gergely), Budapest

ANGABEN ZU DEN ENTWICKLUNGSANOMALIEN VON FRÜHGEBORENEN

F. Kneiszl und A. Bonivárt

(Eingegangen am 3. Mai 1960)

Menschliche und tierische Mißbildungen waren schon in den Urzeiten bekannt. Sie wurden für Wundergeschöpfe gehalten (Teras = Wunder, Wunderzeichen; das Wort Teratologie wurde aus diesem Stammwort gebildet). Einige von ihnen galten als Verkörperung von Göttern, Halbgöttern, Dämonen. Mehrere Mißbildungen werden auch heute mit dem Namen bezeichnet, die sie damals als mythische Personen erhielten (Janus, Sirene, Cyclops, usw.). Später wurden einige Tiermißbildungen (zweiköpfiger Adler, zweischwanziger Löwe, usw. s. bei Hamperl [4]) in Wappen verewigt.

Trotz dieser alten Kenntnisse sind die Begriffe und die Diagnostik der Mißbildungen unsicher. Es ist ja unmöglich, die Mißbildungen genau zu definieren und sie vom Normalen scharf zu trennen, da es auch in der Natur keine solche scharfe Grenze gibt, die der Trennung zugrunde gelegt werden könnte. Oft ist die Beurteilung, was als Normal und was als eine Mißbildung anzusehen ist, sehr subjektiv. Geringfügige Entwicklungsanomalien können bei den Sektionen in 30—50% der Fälle makroskopisch entdeckt werden (Schwalbe [11]). Mikroskopisch findet man noch mehr, wie z. B. Magenschleimhautinseln in der Speiseröhre, die bei Menschen ungefähr mit 70% Häufigkeit vorkommen (Aschoff [1]). Wenn man überlegt, daß nur ein Bruchteil der Verstorbenen seziert und histologisch nur ein Bruchteil der sezierten Organe verarbeitet wird, weiterhin, daß gewisse Organe (Bewegungsorgane, periphere Nerven und Gefäße) außerordentlich selten untersucht werden, ist die Annahme berechtigt, daß wenigstens geringere Entwicklungsanomalien in jedem Organismus vorhanden sind. Es sollte genügen, auf die Muttermale hinzuweisen, die sozusagen an jedem Menschen zu finden sind.

Die Bestrebung, die Erfahrungen zu ordnen und in Systeme einzureihen, führte zur Schaffung von zwei künstlichen, in der Natur voneinander nicht trennbaren Gruppen: Normale Individuen und solche, die mit Entwicklungsfehlern behaftet sind. Die letztere Gruppe wurde in weitere Untergruppen geteilt, auf Grund des Schweregrades der Entwicklungsanomalie, also auf einer recht subjektiven Grundlage. Folgende Untergruppen wurden gebildet:

1. Entwicklungsanomalien bzw. Mißbildungen eines Organs oder mehrerer Organe, eines Organsystems oder mehrerer Organsysteme, oder des ganzen Körpers, die als Formveränderungen im Laufe der Entwicklung entstanden sind und schwerer sind, als die bei der betreffenden Rasse vorkommenden Variationen (SCHWALBE [11]). Wegen der Variationsmöglichkeiten können aber diese Mißbildungen gegen die nächste Gruppe nicht scharf abgegrenzt werden.

2. Anomalien (Abnormitäten), die wegen obiger Gründe auch von der 3. Gruppe nicht scharf getrennt werden können.

3. Variationen, mit Übergängen zu

4. der Gruppe der Normalen.

Dennoch werden als Mißbildungen nur die bedeutenden und auffallenden Abweichungen bezeichnet. Die sog. Anomalien (Abnormitäten) sind weniger auffallend. Variationen werden die kleinen Entwicklungsfehler genannt. Diese Aufteilung ist künstlich, ohne jedweden wissenschaftlichen Wert, wir müssen uns aber daran halten, um das Material ordnen zu können. Der Einfachheit halber wollen wir aber nur zwei Gruppen unterscheiden: die Gruppe der normalen Individuen und die andere, der alle Mißbildungen, Abnormitäten und Variationen (im weiteren: Entwicklungsanomalien) zugeordnet werden sollen.

Obiger Aufteilung wurden die rein morphologischen Abweichungen zugrunde gelegt. Es gibt auch solche Abweichungen, deren morphologisches Substrat noch unbekannt ist. Diese fußen auf den Anomalien der chemischen Zusammensetzung und der immunbiologischen Verhältnisse und sie können pathologische Zustände (Hämophilie, Stoffwechselanomalien, Folgen der Rh-Inkompatibilität, usv.) zur Folge haben. Diese biologischen Entwicklungsanomalien sollen hier nicht erörtert werden.

In der von SURÁNYI [8] herausgegebenen Monographie »Das Frühgeborene« schreibt MARGITAY—BECHT [8] folgendes: »Als man nach der Ursache der Frühgeburt sucht, werden die Ursachen, die in der Frucht selbst bzw. in dem wachsenden Ei liegen mögen, meistens nicht berücksichtigt. Verschiedene Mißbildungen, Entwicklungsanomalien, um die tumoröse Umwandlung des Eies (Mola) nicht zu erwähnen, können die vorzeitige Unterbrechung der Schwangerschaft bzw. den Fruchttod zur Folge haben. Es ist anzunehmen, daß die vorzeitige Ausstoßung des Embryos in vielen, nicht oder oberflächlich untersuchten Fällen vom Embryo selbst herbeigeführt wird.« Es ist also unbedingt begründet, diese Umstände sorgfältig zu untersuchen. Wir wollen sonach das Frühgeburten-Material des Schöpf—Merei-Krankenhauses von diesem Gesichtspunkt prüfen und die Ergebnisse mitteilen.

*

Unser Krankengut stammt aus der Periode Dez. 1954—Mai 1958. Nur die in der geburtshilflichen Abteilung unseres Krankenhauses zur Welt gebrachten Frühgeborenen werden besprochen. Das Material des Krankenhauses ist

zur vergleichenden Untersuchung der frühgeborenen und reifen Mißgeburten besonders geeignet, da hier die Zahl der Frühgeburten (wegen der speziellen Aufgaben des Institutes) die der ausgetragenen wesentlich übersteigt, wobei die Zahl der normalen Geburten zu Vergleichungszwecken nicht zu niedrig ist.

In der erwähnten 3½ jährigen Periode war die Gesamtzahl der Entbindungen 2846, die der geborenen Kinder 2972. Bei 132 Kindern (d. h. 4,6% der Entbindungen oder bei 4,4% der geborenen Kinder) war ein Entwicklungsfehler vorhanden (Tab. I).

Tabelle I

Zahl der Geburten	Zahl der Kinder		Mißbildungen	
	ingesamt	mit Mißbildungen	% der Geburten	% der Kinder
2846	2972	132	4,6	4,4

1912 von den 2972 Kindern waren Frühgeburten (unter 2500 g), 1060 waren reif. Die Zahl der Frühgeborenen mit Entwicklungsanomalien war 126, die der reifen 6, also bei 6,6% der Frühgeburten und bei 0,6% der ausgetragenen Kinder lag eine Mißbildung vor. Sonach kamen die Mißbildungen bei den Frühgeburten zehnmal so oft vor, wie bei den reifen Kindern. Diese Zahlen enthalten sowohl die lebend geborenen Kinder als auch die Stillgeburten (Tab. II, A). Betrachtet man die Lebenden und die Stillgeburten separat, so ergibt sich folgendes. Von 2972 wurden 2772 lebend geboren, 200 waren tot (6,72%). Die Zahl der Mißbildungen war in der lebenden Gruppe 92, in der toten 40, demnach waren 3,3% der Lebenden und 20% der Toten mit Entwicklungsanomalien geboren (Tab. II, B). Von den 1912 Frühgeburten kamen 1729 lebend, 183 tot zur Welt. Von den 1060 reifen Kindern lebten 1043, 17 waren tot. Mit anderen Worten: 183 von 200 Stillgeborenen waren Frühgeborene (91,5%), 17 waren reif (8,5%). 9,6% der Frühgeborenen und

Tabelle II

	A		B		C			
	Frühgeb.	Reif	Lebend geboren	Tot geboren	Frühgeboren Lebend	Frühgeboren Tot	Reif geboren Lebend	Reif geboren Tot
Zahl der Kinder	1912	1.060	2772	200	1729	183	1043	17
Zahl der Kinder mit Mißbildungen	126	6	92	40	88	38	4	2
%	6,6	0,6	3,3	20	5	21	0,4	12

1,6% der Reifen waren tot geboren. In der Gruppe der 1729 lebenden Frühgeborenen kamen 88 (5%), in der Gruppe der 1043 lebenden reifen Säuglinge 4 (0,4%) Mißbildungen vor. Sonach war die Zahl der Mißbildungen in der Frühgeburtengruppe ungefähr 15mal häufiger als in der reifen Gruppe. Von 183 stillgeborenen Frühgeborenen lag eine Mißbildung bei 38, von 17 reifen Stillgeburten bei 2 vor, dies entspricht 21% auf die toten Frühgeburten und 12% auf die reifen Stillgeburten bezogen (Tab. II, C).

Nachstende Schlüsse können aus den Daten gezogen werden:

1. Die niedrigste Zahl der Entwicklungsanomalien war bei den reifen lebenden Neugeborenen zu finden: 0,4%.

2. Bei lebenden Frühgeborenen kamen die Mißbildungen erheblich öfter vor: 5%.

3. Bei reifen Stillgeburten noch häufiger: 12%.

4. Bei toten Frühgeborenen am häufigsten: 21%.

5. Die Mißbildungshäufigkeit war bei Frühgeborenen ungefähr zenmahl höher, als bei reifen Neugeborenen (6,6% bzw. 0,6%).

6. 9,6% der Frühgeborenen und 1,6% der reifen Neugeborenen kamen tot zur Welt.

7. 91,5% der Stillgeburten waren unreif, 8,5% waren reif.

Diese Angaben bestätigen die alte These, daß die an einer Entwicklungsanomalie leidenden Früchte selten ausreifen; sie werden vorzeitig und/oder tot geboren.

Die ausführlichen Daten der 132 Geburten mit Mißbildungen zeigt Tab. III. 30% waren Stillgeburten. Das Verhältnis der zwei Geschlechter war nicht

Tabelle III

Mißgeb.		Geschlecht			Körpergewicht					Gestorben (von 92 lebenden)				Leben
Lebend geb.	Tot geb.	♂	♀	?	unter 1000 g	1001—1500 g	1501—2000 g	2001—2500 g	über 2500 g	1	2—8	9—30	I—IV	
							126 = 95%							
92	40	61	69	2	43	42	27	14	6	61	20	3	3	5
					85		41							
70%	30%				64%		31%		5%	66%	22%	3%	3%	6%

1 = lebte 1 Tag
2—8 = lebte 2—8 Tage
9—30 = lebte 9—30 Tage
I—IV = lebte 1—4 Monate

auffällig. In 2 Fällen konnte das Geschlecht nicht bestimmt werden. 126 von 132 (95%) waren Frühgeburten, und zwar 85 (64%) unter 1500 g Gewicht,

41 (31%) waren 1500—2500 g schwer. Die Zahl der reifen Neugeborenen mit Entwicklungsanomalien war bloß 6 (5%).

Was das weitere Schicksal anbelangt, blieben von 92 lebend mit Mißbildungen Geborenen nur 5 (6%) am Leben. Innerhalb von 8 Tagen starben 81 (88%), und zwar 61 (66%) am 1. Tag, 3 (3%) im Alter von 9—30 Tagen, 3 (3%) nach 30—120 Tagen. 5 lebten noch, als diese Arbeit abgeschlossen wurde.

In Tab. IV wurden die Entwicklungsanomalien nach ihrer Häufigkeit zusammengestellt. Wir fanden bei 132 Kindern 72 verschiedene Anomalien, insgesamt 272.

Tabelle IV

1. Anencephalus	46	37. Synechia palpebrarum	2
2. Rachischisis	31	38. Aplasia funiculi umbilici	1
3. Pes equinovarus	16	39. Aplasia glundulae thyreoideae	1
4. Hydrocephalus cong.	11	40. Aplasia nucl. gris. cerebri	1
5. Hernia umbilicalis	10	41. Aplasia org. genit. int	1
6. Cheilo-gnatho-palatoschisis	8	42. Aplasia org. genit. int. et ext.	1
7. Foramen ovale late apert.	8	43. Aplasia ovarii	1
8. Polydactylia	7	44. Aplasia thymi	1
9. Ren polycysticus	7	45. Atresia aortae	1
10. Atresia recti	6	46. Atresia bronchi	1
11. Defectus septi ventr. cordis	6	47. Atresia laryngis	1
12. Hernia diaphragmatica	6	48. Atresia urethrae	1
13. Atresia oesophagi	5	49. Cheiloschisis	1
14. Hydrops foetus univ.	5	50. Cyclopia	1
15. Aplasia renis	4	51. Cysta epicardii	1
16. Aplasia suprarenis	4	52. Cysta solit. renis	1
17. Aplasia ureteris	4	53. Diverticulum Meckeli	1
18. Atresia ani	4	54. Dysplasia arteriae mesent	1
19. Fistula oesophago-trachealis	4	55. Dystopia renis	1
20. Hyplasia renis	4	56. Formatio aliena ossis ilei	1
21. Hypospadiasis	4	57. Hydranencephalus	1
22. Adactylia	3	58. Hypogroma colli. cong.	1
23. Coarctatio aortae	3	59. Hypoplasia bulbi oculi	1
24. Hydronephros	3	60. Hypoplasia pulmonum	1
25. Meningo-encephalocele occipitalis	3	61. Hypoplasia scroti et penis	1
26. Syndactylia	3	62. Hypoplasia suprarenis	1
27. Agenesia corporis callosi	2	63. Macroglossia	1
28. Aplasia urethrae	2	64. Megacolon congenitum	1
29. Aplasia vesicae urinariae	2	65. Pes valgus	1
30. Meloschisis	2	66. Porencephalia	1
31. Meningocele	2	67. Ren arcuatus	1
32. Mongolismus	2	68. Struma congenita	1
33. Myelo-meningocele	2	69. Synechia costarum	1
34. Phocomelia	2	70. Synechia cranio-placentaris	1
35. Pseudohypertrophia pulm	2	71. Teratoma embr. reg. sacralis	1
36. Stenosis art. pulm.	2	72. Tumor (fibroma molle) brachii	1

Hinsichtlich der Häufung von Entwicklungsanomalien bei einzelnen Kindern machten wir eine interessante Beobachtung. In mehr als der Hälfte unserer Fälle war bei den Säuglingen, im Gegensatz zur allgemein angenommenen These, nur je eine Anomalie zu finden. Das gehäufte Vorkommen der Entwicklungsfehler wurde nur bei einer kleinen Gruppe beobachtet, bei denen durchschnittlich 9 Anomalien gefunden wurden (Tab. V).

Tabelle V

Zahl der Mißbildungen	1	2	3	4	5	Über 5 (durchschn. 9)
Zahl der Kinder	69	37	11	7	1	7

Tab. VI zeigt die Anomalien nach Organsytemen geordnet. Die Mehrzahl der Anomalien, 103 von 272, kamen im Zentralnervensystem vor (38%). Unter diesen steht die Anencephalie an der ersten (46), die Rachischise an der zweiten Stelle (31). Nach diesen folgen mit 12—12% Häufigkeit die Entwicklungsfehler der Verdauungs-, der Harn- und der Bewegungsorgane. Von den 12% betragenden Anomalien der Verdauungsorgane wird die größte Rolle von den Atresien gespielt (15), hierauf folgen die Gesichtsspalte (11). Der Harnapparat wies 34 (12%) Anomalien auf, und zwar Aplasie, Hypoplasie der Nieren und der Ureteren und Atresie der letzteren in 17 Fällen. Eine Zystenniere kam in 7 Fällen vor. Unter der Anomalien der Bewegungsorgane (34 Fälle) fanden wir 16 Fälle von Pes equinovarus, bei über 30% lag eine Adaktylie, Syn- oder Polydaktylie vor. 22 Anomalien wurden an den Kreislauforganen beobachtet (8%), zumeist Septumdefekte (14 Fälle). Die anderen Organsysteme wurden selten befallen.

*

Im weiteren wollten wir in bezug auf die möglichen Ursachen der Entwicklungsfehler Daten erhalten. Bedauerlicherweise war unser Material in dieser Hinsicht wenig aufschlußreich. Wir untersuchten in allen Fällen beide Eltern. Zunächst wurde die Familienanamnese aufgenommen, dann wurde die Mutter nach Kinderkrankheiten, vor und während der Schwangerschaft überstandenen Infektionen und beide Eltern nach Berufskrankheiten, gewerblichen Schädigungen, Alkohol- und Nikotinmißbrauch usw. gefragt. Ihre Lebensumstände, Ernährungsverhältnisse, die Daten der Geburt vom Blasensprung bis zum Ende des Wochenbettes wurden aufgezeichnet. Wir mußten aber feststellen, daß die Angaben mangelhaft waren, da die Eltern zahlreiche Fragen nicht beantworten konnten, ferner, daß auch die zuverlässigen Angaben nicht verwertet werden konnten, da ähnliche Schädigungen auch bei den Eltern der normalen Kinder vorkommen. Aus diesem Grunde wollen wir auf die Ursachen der Mißbildungen nicht eingehen, wir verweisen lediglich auf die einschlägige Arbeit von LEWIN und FISCHER [7].

Vier Faktoren sind dennoch erwähnenswert, indem sie in der Entstehung der Mißbildungen eine Rolle zu spielen scheinen: 1. die Zahl der vorangegangenen Geburten, 2. das Alter der Mutter, 3. das Hydramnion, 4. Krankheiten und pathologische Zustände, die während der Schwangerschaft bestehen.

Tabelle VI

Zentralnervensystem
103 = 38%

Anencephalus	46
Rachischisis	31
Hydrocephalus cong.	11
Meningo-encephalocele occip.	3
Agenesia corporis callosi	2
Meningocele	2
Mongolismus	2
Myelomeningocele	2
Agenesia nucl. gris. cerebri	1
Cyclopia	1
Hydranencephalus	1
Porencephalia	1

Bewegungsorgane
34 = 12%

Pes equinovarus	16
Polydactylia	7
Adactylia	3
Syndactylia	3
Phocomelia	2
Formatio aliena ossis ilei	1
Pes valgus	1
Synechia costarum	1

Harnorgane
34 = 12%

Ren polycysticus	7
Aplasia renis	4
Aplasia ureterum	4
Hypoplasia renum	4
Hypospadiasis	4
Hydronephros cong.	3
Aplasia vesicae urinariae	2
Aplasia urethrae	2
Atresia urethrae	1
Cysta sol. renis	1
Dystopia renis	1
Ren arcuatus	1

Verdauungsorgane
33 = 12%

Cheilo-gnatho-palatoschisis	8
Atresia recti	6
Atresia oesophagi	5
Fistula oesophago-trachealis	4
Atresia ani	4
Meloschisis	2
Cheiloschisis	1
Diverticulum Meckeli	1
Macroglossia	1
Megacolon congenitum	1

Kreislauforgane
22 = 8%

Foramen ovale late apertum	8
Defectus septi ventr. cordis	6
Coarctatio aortae	3
Stenosis arteriae pulmonalis	2
Atresia aortae	1
Cysta epicardii	1
Dysplasia arteriae mesent.	1

Hernien
16 = 6%

Hernia umbilicalis	10
Hernia diaphragmatica	6

Endokr. Organe
12 = 4%

Aplasia suprarenis	4
Aplasia glandulae thyreoideae	1
Aplasia org. gen. int.	1
Aplasia org. gen. int. et ext.	1
Aplasia ovarii	1
Aplasia thymi	1
Hypoplasia scroti et penis	1
Hypoplasia suprarenis	1
Struma congenita	1

Atmungsorgane
5 = 2%

Pseudohypertrophia pulmonum	2
Atresia bronchi	1
Atresia laryngis	1
Hypoplasia pulmonum	1

Sinnesorgane
3 = 1%

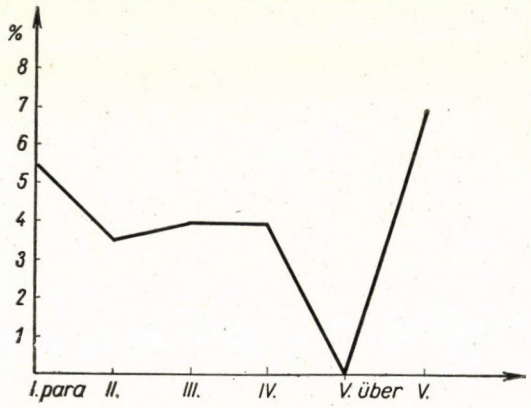
Synechia palpebrarum	2
Hypoplasia bulbi oculi	1

Mischfälle
10 = 5%

Hydrops foetus univ.	5
Aplasia funic. umb.	1
Hygroma colli	1
Synechia cranio-placentaris	1
Teratoma embr. reg. sacr.	1
Tumor (fibroma molle) brachii	1

Tabelle VII

	I. para	II.	III.	IV.	V.	Multi-para über 5	Insgesamt
Zahl der Geburten	1625	709	279	129	33	71	2846
Zahl der mit Entwicklungsanomalie Geborenen	86	25	11	5	—	5	132
%	5,4	3,5	3,9	3,9	—	7,0	4,6



Kurve 1

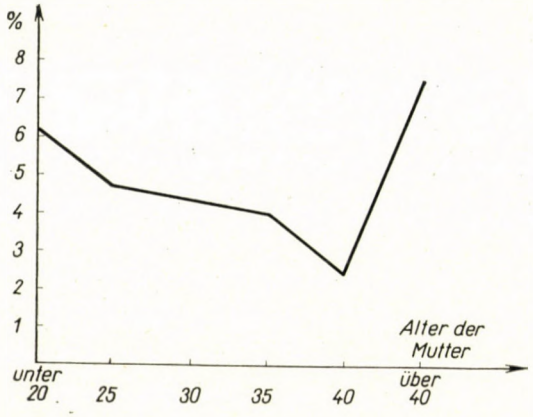
Ad 1. Tab. VII und die Kurve 1 zeigen die Beziehungen der Mißbildungen zur Geburtenzahl. Die Mehrzahl der Früchte mit Entwicklungsanomalien (86) wurde von Erstgebärenden geboren, aber unser Krankenmaterial bestand auch überwiegend von Erstgebärenden (1625). Bei den Erstgebärenden war die Häufigkeit der Mißbildungen 5,4%, bei der 2—4. Geburt 3,5% bis 3,9%, nach der 5. Geburt ungefähr 7%.

Ad 2. Die Abhängigkeit der Mißbildungen vom Alter der Mutter ist von Tab. VIII und der Kurve 2 abzulesen. Die größte Altersgruppe in unserem Material war die der 21—25jährigen Mütter (974). Auch die absolute Zahl der Mißbildungen war in dieser Gruppe die höchste (45), die prozentuellen Verhältnisse zeigen aber ein anderes Bild. Bei Müttern über 40 Jahren war 7,5% die Häufigkeit der Entwicklungsanomalien, bei denen unter 20 Jahren 6,2%. Über diesem Alter nahm die Häufigkeit bis zum 40. Jahr allmählich, von 4,7% auf 2,4% ab, nachher erfolgte der erwähnte Sprung auf 7,5%.

Der ähnliche Verlauf der Kurven 1 und 2 zeigt, daß die meisten Mißbildungen von den Multiparen bzw. den über 40 Jahre alten Mütter, anderseits von Primiparen und Müttern von unter 20 Jahren geboren wurden.

Tabelle VIII

Alter der Mutter	Unter 20	21—25	26—30	31—35	36—40	Über 40	Ingesamt
Zahl der Geburten	483	974	698	455	210	53	2846
Zahl der mit Entwicklungsanomalie Geborenen	30	45	30	18	5	4	132
%	6,2	4,7	4,3	4,0	2,4	7,5	4,6



Kurve 2

Ad 3. Bei 62 von 132 Mißbildungen lag Hydramnion vor. Ein Hydramnion wurde angenommen, wenn die Menge des Fruchtwassers 2 Lit. überstieg. In den meisten Fällen war die Menge des Fruchtwassers 4—6 Lit., aber Mengen von 18—20 Lit. kamen auch vor. Akutes Hydramnion wurde bei zwei Primiparae beobachtet, ihr Alter war 17 bzw. 23 Jahre.

Unter 2846 Geburten lag bei 110 (3,9%) ein Hydramnion vor. Bei 62 (56%) dieser 110 Fälle wurde eine Mißbildung vorgefunden. Die Häufigkeit des Hydramnions war auf die Gesamtzahl der Säuglinge mit Mißbildungen bezogen — 47% (62 von 132).

50 von den 62 Hydramnionfällen (81%) wiesen schwere Veränderungen des Zentralnervensystems auf. 41 von den 46 Anencephalien traten zusammen mit Hydramnion auf, es sei aber bemerkt, daß das Hydramnion nur in 1 Fall von Anencephalie ausgeschlossen werden konnte, da bei 4 der Blasensprung vor der Aufnahme erfolgte und es war nicht möglich, die Fruchtwassermenge zu messen. Übrigens wollen wir uns mit diesem Problem nicht näher beschäftigen, unsere Absicht war lediglich ein Hinweis auf die evtl. Beziehungen von

Hydramnion und Mißbildungen. Selbstredend werden bei uns die Hydramnionfälle womöglich röntgenologisch untersucht; finden wir eine Anencephalie, wird die Geburt in Gang gesetzt (Tab. IX).

Tabelle IX

Anomalien bei den Hydramnionfoeten

Anencephalus	41	
Spina bifida	3	
Hydrocephalus	3	50 Anomalien (81%)
Meningoencephalocele	2	im Bereich des
Hydranencephalus	1	Zentralnervensystems.
Atresia oesophagi	2	
Macroglossia	1	5 Anomalien (8%)
Atresia laryngis	1	des Verdauungkanals
Atresia bronchi	1	und der Luftwege.
Synechia palpebrarum	1	
Defectus septi ventr. cordis	1	
Dystopia renis	1	
Hydrops foetus univ.	1	7 verschiedene (11%).
Hernia umbilicalis	1	
Hernia diaphragmatica	1	
Tumor brachii	1	

Ad 4. 49 von den Müttern der Säuglinge mit Mißbildungen überstanden Krankheiten während der Schwangerschaft. Die vor der Schwangerschaft überstandenen Krankheiten verdienen keine besondere Aufmerksamkeit, da es sich um Kinderkrankheiten oder solche Prozesse und Operationen handelte, die auch bei den Müttern gesunder Kinder nicht weniger häufig vorkommen.

In den Arbeiten über die Ätiologie der Mißbildungen wird oft auf die während der Schwangerschaft vorkommenden Anoxie- bzw. Hypoxie-Zustände hingewiesen (BÜCHNER, MAURATH und REHN [2], BÜCHNER, RÜBSAAMEN und ROTHWEILER [3], INGALLS [5, 6], SCHELLONG [10], WARKANY [12]). Die diesbezügliche Analyse unseres Materials hat gezeigt, daß schwere Hyperemesis, Toxämie, drohende Fehl- und Frühgeburt auffallend oft beobachtet wurden. Außer diesen können Anämien, Hypertonie und Herzklappenfehler zur Hypoxie der Gewebe und der Plazenta Anlaß geben. Die Zahl dieser Fälle war 35. Von den Viruskrankheiten kam Influenza in zwei Fällen vor, im 1—2. bzw. 4—5. Monat der Schwangerschaft. (Beide Frauen hatten auch eine Zwerchfellhernie.) Über Rubeola wurde von einer Mutter berichtet. Die Diagnose konnte nicht bewiesen werden, für ihre wahrscheinliche Richtigkeit sprach aber das Hydramnion und das anenzephale Kind. 4 Frauen überstanden Pyelitis. Dieser Krankheit wollen wir keine ätiologische Rolle zuschreiben, da die Pyelitis in der 2. Hälfte bzw. im letzten Drittel der Schwangerschaft auftrat, als die Entwicklung längst entschieden war. In je 1 Fall wurden Placenta praevia, Bronchialasthma, Cholecystitis, Addisonsche Krankheit, latente Syphilis und Pso-

riasis verzeichnet; es wäre kaum zulässig, aus ihnen Schlüsse zu ziehen. Dagegen halten wir das Auftreten von Pedes equinovari in einem Fall von Uterus duplex für charakteristisch, obwohl dieselbe Fußanomalie in 15 Fällen ohne einen Uterus duplex entstand.

In einem Fall war der Vater ein Röntgenfacharzt. Das Kind wurde mit 1660 g Gewicht und Foramen ovale late apertum geboren, und starb innerhalb 24 Stunden.

Im Krankengut fanden sich 6 Zwillinge. Drei von ihnen waren bestimmt mehreiig. In 1 Fall waren die Monochoriaten gleichen Geschlechtes, aus einer Doppelzwillingsgeburt. Da Foetus »B« gesund war, sind auch diese als zweieiige anzusehen. Ein Zwillingspaar war bestimmt eineiig, beide waren anenzephal mit Rachischisis. Die zweifache Entwicklungsanomalie wurde röntgenologisch während der Schwangerschaft erkannt (Tab. X).

Tabelle X

Daten der Zwillinge

Nr.	A	B	C	Bemerkung
1.	anencephalus, rachischisis ♀		—	Eineiige
2.		anencephalus, ♀ rachischisis	— —	
3.	normal ♂	normal ♀	tumor brachii ♂	Dreieiige
4.	hernia umbilic., polydactylia, pes equinovarus	normal ♂	—	Zweieiige
5.	hypospadiasis, atresia ani et recti ♂	normal ♂	—	Monochoriaten, wahrschn. zweieiige
6.	defectus septi ventriculorum cordis ♀	normal ♀	normal ♀	Dreieiige

Unter 132 Mißbildungen gab es nur eine Mutter, die zum zweiten Mal ein Kind mit Entwicklungsanomalie gebar.

Zwischen den Entwicklungsfehlern und den vorzeitigen Geburten läßt sich eine interessante Parallelität finden. Hunderttausende von Beobachtungen, die im Laufe von mehreren Jahrzehnten gemacht wurden, zeigen ein gehäuftes Vorkommen von Frühgeburten und Mißbildungen den Entbehrungen der Nachkriegszeiten folgend und unter schlechten sozialen Verhält-

nissen (OPITZ [9], WITT [13]). Hieraus dürfte gefolgert werden, daß der Entwicklungsfehler nicht die Ursache der Frühgeburt darstellt, sondern beide durch die gleiche äußere Schädigung hervorgerufen werden. Eine Ausnahme bildet natürlich der intrauterin abgestorbene Foetus, der als Fremdkörper zum vorzeitigen Geburtseintritt Anlaß gibt. Der äußere schädigende Faktor kann in gewissen Fällen Sterilität (z. B. psychogene Amenorrhoe), habituellen Abort, habituelle Frühgeburt, den intrauterinen Fruchttod oder einen Entwicklungsfehler zur Folge haben. Der letzterwähnte Umstand folgt auch aus unserem Material, da wir eine Entwicklungsanomalie bei Frühgeburten zehnmal so oft vorfanden, als bei ausgetragenen Neugeborenen (Tab. II, A.). Die Angabe von Tab. III, laut der es sich bei 95% der Mißbildungen um Frühgeburten handelte, läßt sich in demselben Sinne auslegen.

Todesursachen bei Mißbildungen

Gewisse Entwicklungsanomalien werden als obligate Todesursachen angesehen. Von den 92 mit Anomalien Geborenen blieben 5 am Leben, 87 starben. In der letzten Gruppe war der Tod bei 64 Kindern (74%) durch die Mißbildung selbst, bei 23 (26%) durch andere Ursachen bedingt.

Als obligate Todesursachen wurden vor allem die Mißbildungen des Zentralnervensystems betrachtet, ferner die operativ nicht zu beseitigenden Atresien des Verdauungskanals und der Luftwege (Atresie des Kehlkopfes, der Speiseröhre, des Mastdarms), die Aplasie lebenswichtiger Organe (beider Nieren, beider Schilddrüsenlappen).

Von den an nicht letalen Anomalien [z. B. Gliedmassendeformitäten (Pes equinovarus, Adaktylie, Poly- und Syndaktylie), gewisse Darmmißbildungen (Megacolon, Meckelsches Divertikel), Hasenscharte, Gesichtsspalte, Synechie der Lider, usw.] leidenden Kindern starben 11 infolge einer intrakranialen Blutung, 5 an Hirnödem, 1 an Kernikterus, 1 infolge Leberruptur und Verblutung. Diese Todesursachen schienen von der Entwicklungsanomalie unabhängig zu sein. In einigen Fällen war der Tod eine indirekte Folge der Mißbildung: in drei Fällen führte der Entwicklungsfehler des Herzens und der großen Gefässe zu Herzinsuffizienz, bei einem Kind wurde die lumbale Meningomyelokele infiziert und das Kind starb im Alter von 3½ Monaten an einer zerebrospinalen eitrigen Leptomeningitis und pyocephalus internus. In 1 Fall bildete eine enorm große Struma zunächst ein Geburtshindernis, dann hinderte sie die Atmung und führte schließlich zum Erstickungstod (Tab. XI).

Bei den 5 am Leben Gebliebenen lagen nachstehende Anomalien vor: Nabelhernie, Polydaktylie, Pes equinovarus, Hypospadiase, Cheilo-gnato-palatoschisis.

Was die Mißbildungen der Stillgeburten betrifft, lag dem intrauterinen Tod bei 37 von 40 Fällen die Entwicklungsanomalie selbst zugrunde. Bei 2

Tabelle XI

Todesursache

Die Mißbildung selbst 64 Fälle = 74%					Sonstige 23 Fälle = 26%						
Im Hirn	Verd. Org.	Kreisl.	Harn-org.	Sonst.	Intra-kran. Blutung	Hirn-oedem	Kern-ikterus	Leber-ruptur	Kreis-lauf-insuff. Hirn-oedem	Menin-gitis pur.	Suffo-catio
30	9	8	9	8	11	5	1	1	3	1	1

weiteren Foeten bildete der Hydrocephalus ein Geburtshindernis. Bei einem von diesen kam es zur Spontan-Ruptur des Schädels, der andere mußte perforiert werden. Der dritte Fall war ein mazerierter Foetus, bei dem die Ursache des intrauterinen Todes nicht ermittelt werden konnte (Tab. XII).

Tabelle XII

	Frühgeb.	Reif
Anencephalus	27	1
Hydrops foetus univ.	3	1
Spina bifida	2	—
Multiple, mit dem Leben unvereinbare Anomalien	2	—
Hydrocephalus	2	—
Pes equinovarus (mazeriert)	1	—

Zusammenfassung

Die im 3½ jährigen Material des SCHÖPF—MEREI-Krankenhauses beobachteten Entwicklungsanomalien werden besprochen. Es handelte sich um 2846 Entbindungen, bei denen 132 Mißbildungen gefunden wurden.

1. Entwicklungsanomalien kamen bei den über 40 Jahre alten Multiparae und den unter 20 Jahre alten Primiparae am häufigsten vor.
2. Bei über 50% der mit Entwicklungsanomalien geborenen Neugeborenen wurde nur ein einziger Entwicklungsfehler gefunden.
3. 47% aller Mißbildungen waren mit Hydramnion vergesellschaftet.
4. 56% der Hydramnionfälle ging mit einem Entwicklungsfehler einher.
5. 38% der Entwicklungsfehler betraf das Zentralnervensystem und bei 35% lag Anencephalie vor.
6. Die Anencephalie trat in 89% der Fälle in der Gesellschaft von Hydramnion auf.
7. 95% der Mißbildungen kamen bei Frühgeburten vor.
8. Der Entwicklungsfehler ist nicht die Ursache der vorzeitigen Geburt, sondern beiden liegt ein äußerer schädlicher Faktor zugrunde.

LITERATUR

1. ASCHOFF, L.: (1923) Pathologische Anatomie. G. Fischer, Jena. Band II. S. 694. — 2. BÜCHNER, F., MAURATH, J., REHN, H. J.: (1946) Experimentelle Mißbildungen des Zentralnervensystems durch allgemeinen Sauerstoffmangel. Klin. Wschr. *24.* 137. — 3. BÜCHNER, F., RÜBSAAMEN, H., ROTHWEILER, G.: (1951) Reproduktion fundamentaler menschlicher Mißbildungen am Hühnchenkeim durch Sauerstoffmangel. Naturwiss. *38.* 142. — 4. HAMPERL, H.: (1950) Lehrbuch der allgemeinen Pathologie und der pathologischen Anatomie. Springer, Berlin. S. 56. — 5. INGALLS, TH. H.: (1947) The pathogenesis of mongolism. Amer. J. Dis. Childr. *73.* 279. — 6. INGALLS, TH. H.: (1947) Etiology of mongolism. Amer. J. Dis. Childr. *74.* 147. — 7. LEWIN, H., FISCHER, G.: (1958) Über kongenitale Mißbildungen. Zbl. Gynäk. *80.* 413. — 8. MARGITAY-BECHT D., in SURÁNYI GY.: (1957) A koraszülött. Medicina, Budapest. S. 59. — 9. OPITZ, G.: (1956) Über die Ursachen der Frühgeburt. Volk und Gesundheit, Berlin. Ss. 11, 28. — 10. SCHELLONG, G.: (1954) Herz- und Gefäßmißbildungen beim Hühnchen durch kurzfristigen Sauerstoffmangel. Beitr. path. Anat. *114.* 212. — 11. SCHWALBE, E.: (1923) in Aschoffs Lehrbuch der pathologischen Anatomie. G. Fischer, Jena. Band I. Ss. 324, 326. — 12. WARKANY, J., NELSON, R. C., SCHRAFFENBERGER, A., B.: (1943) Congenital malformation induced in rats by maternal nutritional deficiency: cleft palate. Amer. J. Dis. Childr. *65.* 882. — 13. WITT, H. J.: (1958) Vorkommen und Verteilung von Mißbildungen in den letzten fünfundfünfzig Jahren. Zbl. Gynäk. *80.* 1432.

АНОМАЛИИ РАЗВИТИЯ У НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ

Ф. КНЕЙСЛ и А. БОНИВАРТ

Авторы дают обзор аномалий развитиа, имевших место на акушерском материале больницы им. Агошта Шепф—Мереи за три с половиной лет на основании 1912 родов в ходе которых наблюдались 132 аномалии развития. Авторы установили, что

1. аномалии развития чаще всего встречаются у многорожавших женщин старше 40 лет и у первородящих женщин моложе 20 лет;
2. больше чем в половине наблюдаемых случаев на одном плоде наблюдалась аномалия развития только одного вида.
3. в 47% всех аномалий развития имел место гидрамнион.
4. гидрамнионы 56% случаев соправождаются ненормальными развитиями.
5. 38% аномалий развития относились к центральной нервной системе, а в 35% случаев имела место анэнцефалия.
6. В 89% случаев анэнцефалия сопровождалась гидраммионом.
7. 95% детей с аномалиями развития были недоношены.
8. Аномалия развития не является причиной преждевременных родов, а оба явления обусловлены одним и тем же вредным агентом.

MALFORMATION IN PREMATURE INFANTS

F. KNEISZL and A. BONIVÁRT

Observations made in 1912 premature infants, among whom 132 displayed malformations, have been reported.

(i) Malformations were the most frequent in the babies of multiparae of over 40 years of age, and in those born from primiparae under 20 years of age;

(ii) in more than half the cases only one type of malformation was found in each infant;

(iii) in 47 per cent of all the cases displaying malformations a hydramnion was present;

(iv) 56 per cent of the hydramnions were associated with some malformation;

(v) 38 per cent of the malformations affected the central nervous system. 35 per cent of these was anencephaly;

(vi) anencephaly was associated with hydramnion in 89 per cent;

(vii) 95 per cent of the infants afflicted with some malformation were prematurely born;

(viii) malformation is not the cause of premature birth; both may be the result of the same adverse external factors.

Dr. Ferenc KNEISZL, Budapest IX. Knézits u. 14. Ungarn
Dr. Antal BONIVÁRT, Budapest VII. Majakovszkij u. 91. Ungarn

Институт онкологии, Бухарест, Румынская Нар. Респ.

ВСПОМОГАТЕЛЬНОЕ ЛЕЧЕНИЕ ОПУХОЛЕЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ВВЕДЕНИИ НЕ ВЫЗЫВАЮЩИХ ЛЕЙКОПЕНИЮ ДОЗ ЦИТОСТАТИКОВ

А. Ривензон и. П. Неделеску

(Поступило 22 декабря 1959)

В ходе продолжительных экспериментальных и клинических исследований было установлено, что цитостатические вещества показанны при куративном или паллиативном воздействии на различные формы опухолей, разумеется с условием очень внимательного отбора случаев.

Все же, в настоящее время еще не существуют химические вещества для лечения рака, достаточно активные и одновременно не вредные для организма, которые позволили бы верное и окончательное излечение.

В общих чертах, то чего можно ожидать в нынешней стадии от лечения цитостатиками, это замедление темпа роста опухолей и задержку появления рецидивов и метастазов.

В результате анализа клинических случаев, леченных различными способами введения цитостатических веществ, а также на основании опытов на животных, мы пришли к заключению, что одна из предпосылок эффективности лечения: это избегание ухудшения иммуннобиологического и эндокринного состояния организма, борющегося своими собственными средствами против опухоли. Это выявляется еще более ясно при метастатических или системных формах новообразований.

Исходя из этой предпосылки, мы пытались уменьшить вредное действие цитостатика на селезенку (1), лимфатические узлы и костный мозг, а также на печень и надпочечники. Мы также пытались избегать возникновения токсического «стресса» сверх хронического влияния, на организм со стороны самого заболевания. Эффективность лечения должна быть результатом этой небольшой разницы в чувствительности к цитостатику между опухолевыми клетками и клетками ретикуло-гистоцитарной системы. Необходимо наносить поражения раковым клеткам и поскольку возможно не поражать здоровые клетки.

Вещества использованные авторами (сарколизин, ТЕМ, дегранол, Е 39 и т. д.) общеизвестны и часто применяются в клинике и эксперименте во всем мире (2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 и т. д).

Для всех этих веществ классическим тестом поражения ретикулоэндотелиальной системы являются лейкопения и тромбопения.

Рассматривая появление лейкопении как указание на превышение переносимой дозы для нормальных клеток, мы пытались вводить ту максимальную дозу цитостатиков, которая не вызывала бы снижения числа лейкоцитов за пределы нормы даже после более продолжительных введений.

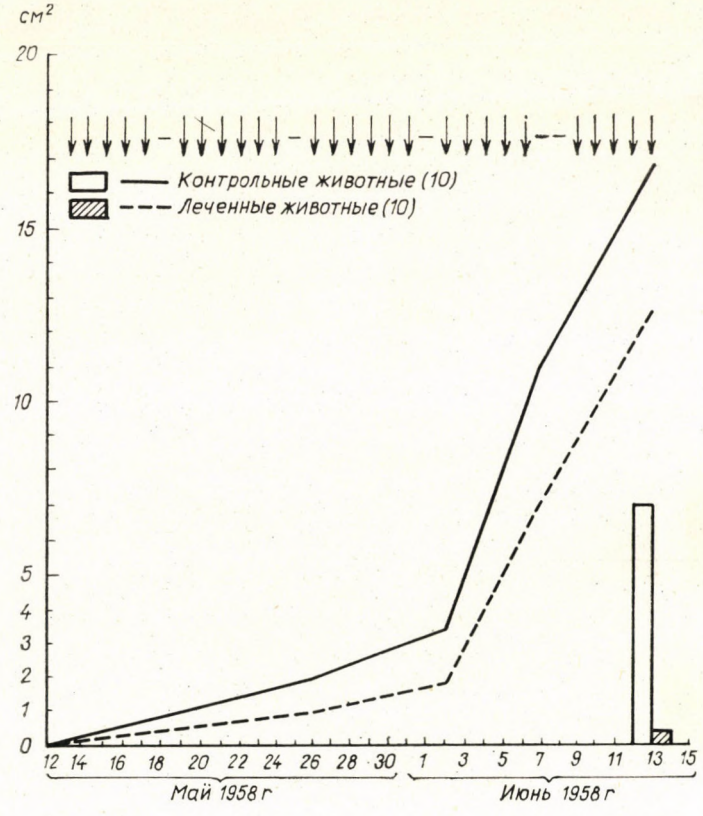


Рис. 1

Изучение продолжительного введения таких доз нормальным животным показало, что нельзя установить никакого изменения в состоянии их бодрости или аппетита; не имеет место гипертрофия надпочечников, а лишь в известных пределах, потеря в весе животных.

Ранее мы изложили результаты, полученные вследствие ежедневных введений не вызывающих лейкопении доз цитостатиков. Результаты касаются эволюции эпителиомы Т 8 Герена у крыс (13). Введение цитостатика

было начато уже на второй день после прививки опухоли и продолжалось ежедневно в течение 10—30 дней. Лечение оказывало умеренное влияние на развитие первичной опухоли и выраженное действие на развитие метастазов (рис. 1, 2, 3, 4, 5).

В продолжение эксперимента было проверено влияние, которое оказывает та же самая терапия на аденокарциному грудной железы W 256 и на

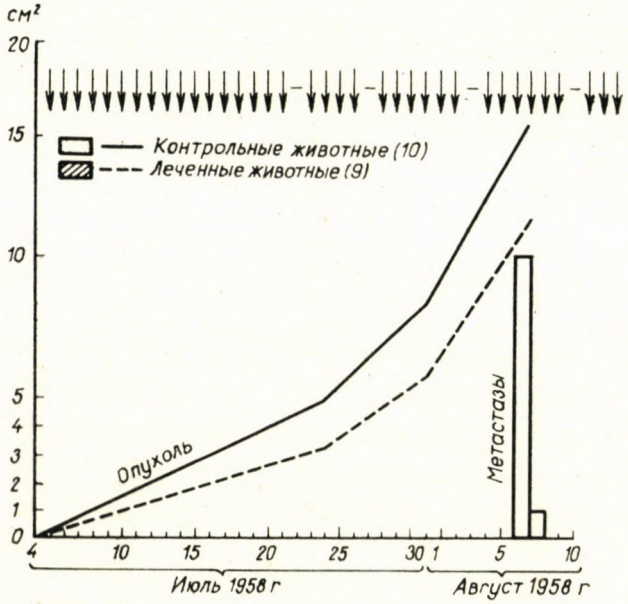


Рис. 2

саркому 10В 9. Рис. 8 и 6 показывают кривую развития этих двух опухолей под влиянием не вызывающих лейкопении доз цитостатиков.

После установления вышесказанного, мы пытались приблизить экспериментальную модель к фактическим случаям, встречающимся в клинике. Поэтому мы не начинали лечения непосредственно после прививки опухоли, а тогда когда последняя достигала известных размеров (т. е. когда она достигала примерно величину черешни или лесного ореха). Опыты проводились над опухолями Т 8 Герена и W 256.

Полученные данные приведены на рис. 7, 9, 10 и 11. В случае опухоли Т 8 поддерживается умеренное влияние на первичную опухоль и резкое угнетение метастазов. В случае опухоли W 256 наблюдается также выраженное влияние на развитие первичной опухоли.

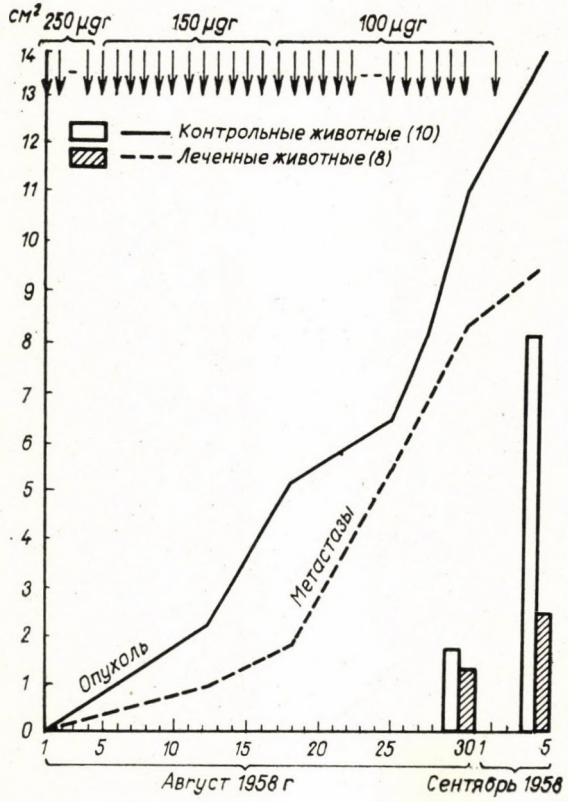

см²
250 μgr
150 μgr
100 μgr
Контрольные животные (10)
Леченные животные (8)
Опухоль
Метастазы
Август 1958 г
Сентябрь 1958

Рис. 3

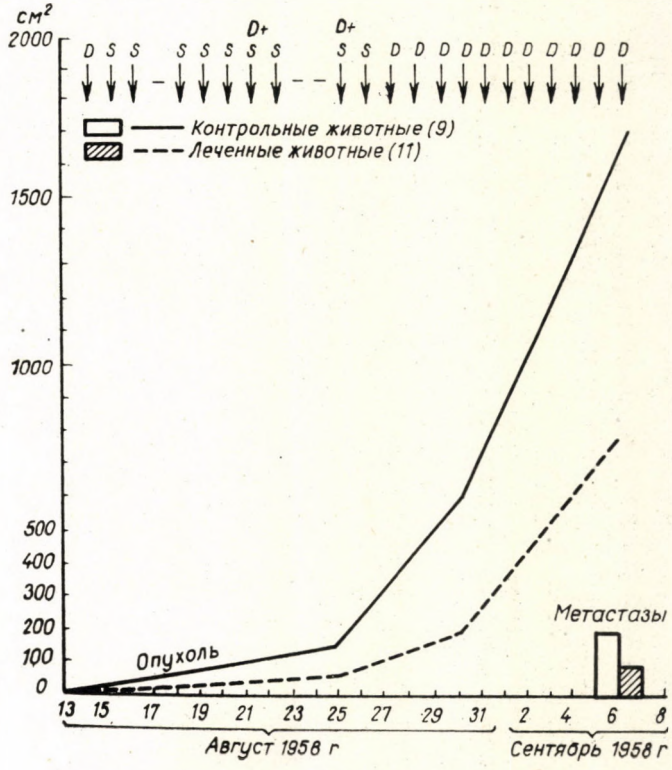

см²
D+
D+
Контрольные животные (9)
Леченные животные (11)
Опухоль
Метастазы
Август 1958 г
Сентябрь 1958 г

Рис. 4

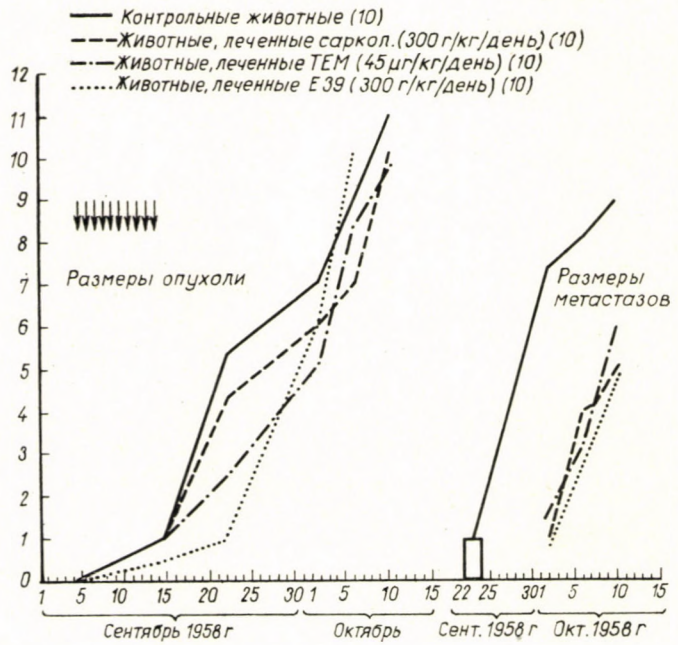

Контрольные животные (10)
Животные, леченные саркол. (300 г/кг/день) (10)
Животные, леченные ТЕМ (45 мг/кг/день) (10)
Животные, леченные Е 39 (300 г/кг/день) (10)
Размеры опухоли
Размеры метастазов
Сентябрь 1958 г
Октябрь
Сент. 1958 г
Окт. 1958 г

Рис. 5

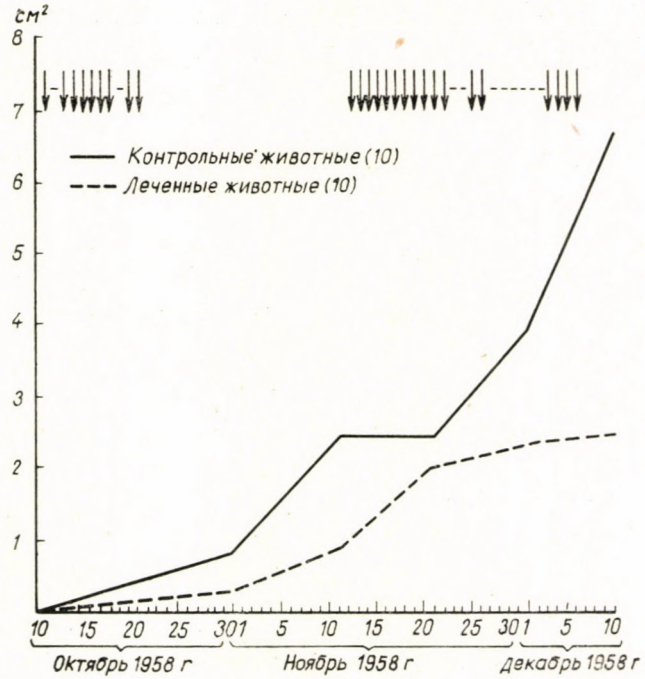

см²
Контрольные животные (10)
Леченные животные (10)
Октябрь 1958 г
Ноябрь 1958 г
Декабрь 1958 г

Рис. 6

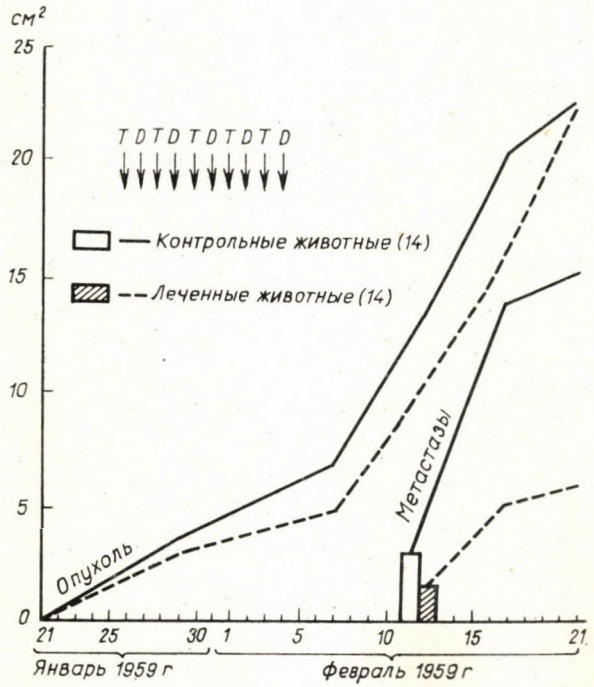

см²
25
20
15
10
5
0
T D T D T D T D T D
Контрольные животные (14)
Леченные животные (14)
Опухоль
Метастазы
21 25 30 1 5 10 15 21
Январь 1959 г
Февраль 1959 г

Рис. 7

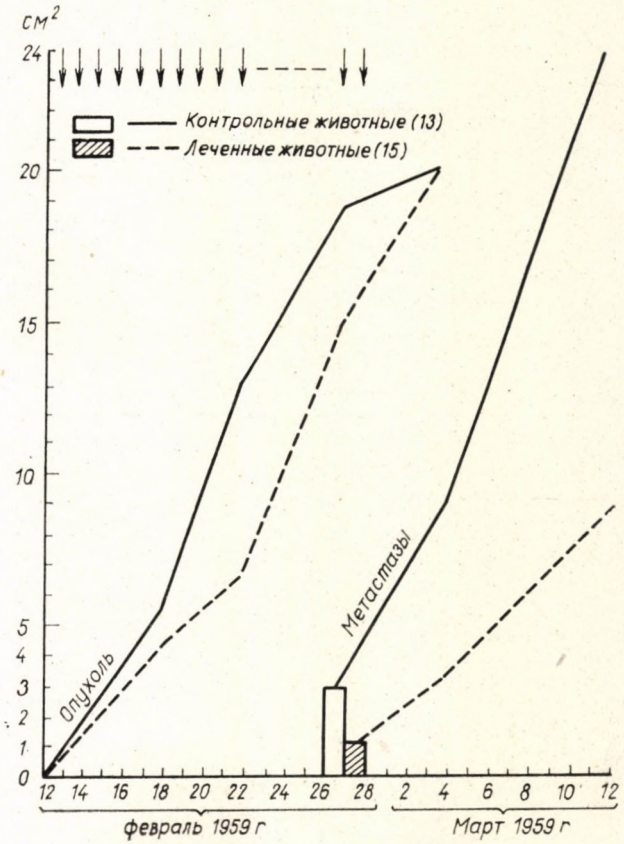

см²
24
20
15
10
5
4
3
2
1
0
Контрольные животные (13)
Леченные животные (15)
Опухоль
Метастазы
12 14 16 18 20 22 24 26 28 2 4 6 8 10 12
Февраль 1959 г
Март 1959 г

Рис. 8

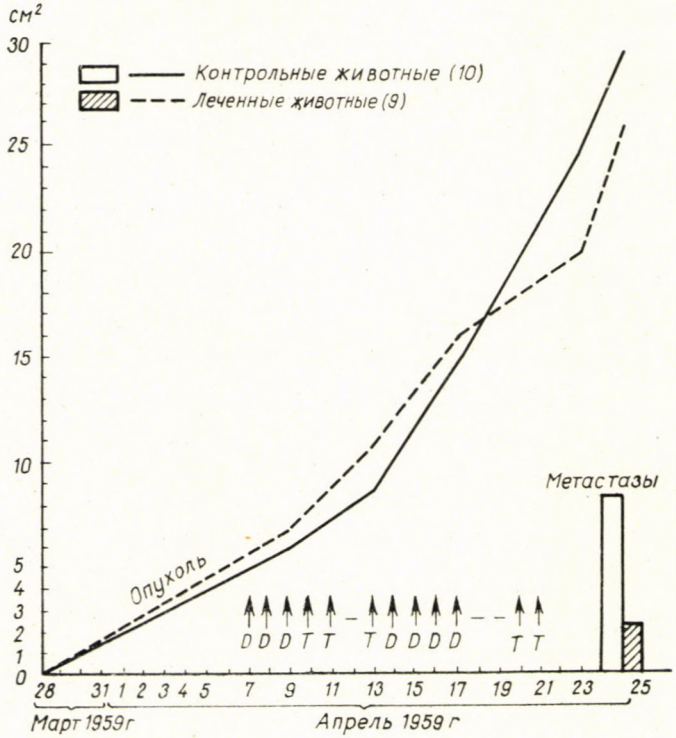

см²
30
25
20
15
10
5
4
3
2
1
0
Контрольные животные (10)
Леченные животные (9)
Опухоль
Метастазы
D D D T T – T D D D D – – T T
28 31 1 2 3 4 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25
Март 1959г
Апрель 1959 г

Рис. 9

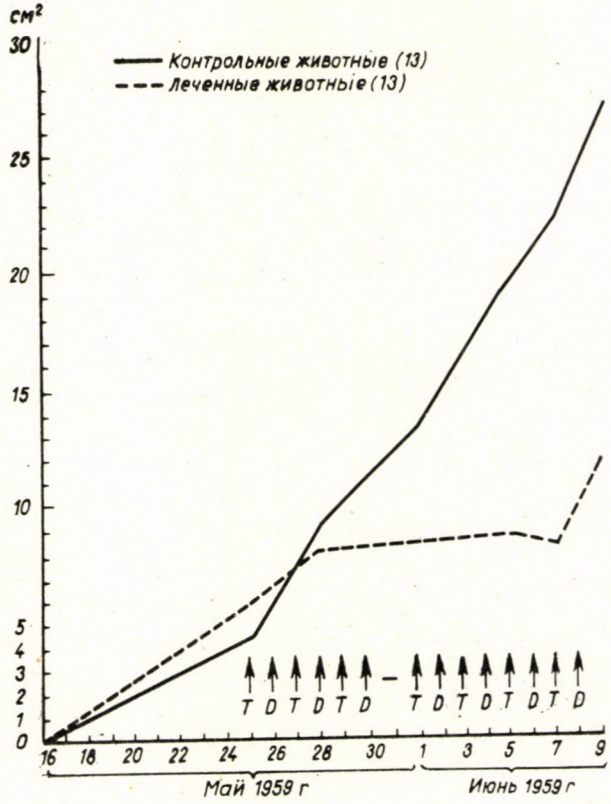

см²
30
25
20
15
10
5
4
3
2
1
0
Контрольные животные (13)
Леченные животные (13)
T D T D T D – T D T D T D T D
16 18 20 22 24 26 28 30 1 3 5 7 9
Май 1959 г
Июнь 1959 г

Рис. 10

Лучшие результаты были получены при ежедневном чередовании цитостатиков различных типов.

Результаты, полученные на достаточно большом числе групп животных и на различных опухолях, представляют собой, по нашему мнению, достаточную экспериментальную основу для осуществления следующего этапа,

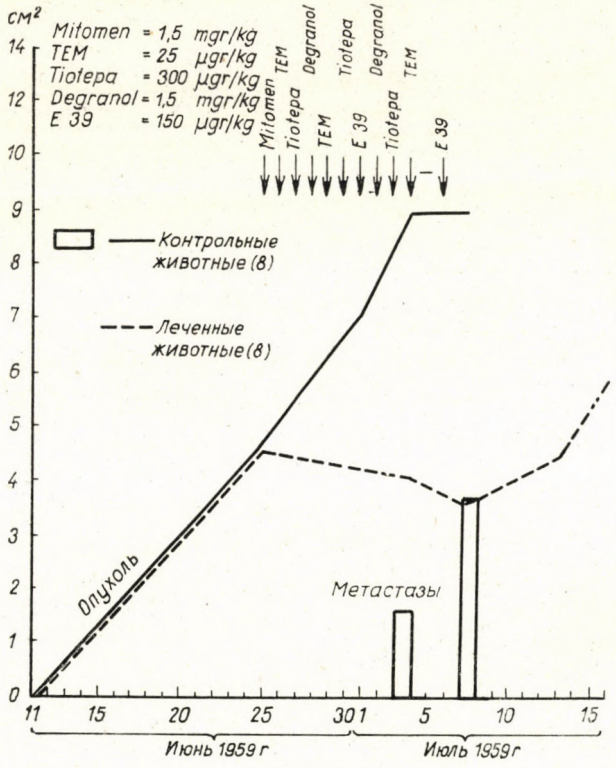


Рис. 11

т. е. для осуществления клинической ориентировки в применении на человеке не вызывающих лейкопении доз цитостатиков, с лечебной и в особенности профилактической целях.

Резюме

Авторы указывают на основании своих исследований на то, что одной из предпосылок эффективности лечения злокачественных опухолей цитостатическими препаратами является избегание ухудшения иммунобиологического и эндокринного состояния организма.

Авторы пытались уменьшить вредное влияние цитостатиков на селезенку, лимфатические узлы и костный мозг, а также на печень и на надпочечники.

Рассматривая выявление лейкопении как указание на превышение переносимой дозы для нормальных клеток, авторы пытались вводить ту максимальную дозу цитостатиков, которая не вызывала бы снижения числа лейкоцитов за пределы нормы. Авторы изучили влияние цитостатиков на ряд экспериментальных опухолей.

Литература

1. Costachel, O.—Rivenzon, A.: (1958) Comunicare la Societatea Stiintelor Medicale, Sectia Oncologie, Iunie. — 2. Desaive, P.: (1958) Bull. Acad. Royale de Med. de Belgique, *23*, 268—312. — 3. Domagk, G.: (1957) Krebsarzt *10*, 1—5. — 4. Mc. Donald, G. O., Livingston Ch., Boyles, C. F., Cole, W. H. (1957) Ann. of Surgery *145*, 624—629. — 5. Hesse, F., Kampen, G.: (1957) Krebsarzt, *12*, 150—156. — 6. Holziger, L.—Kellner, B.: (1957) Zeitschrift f. Krebsfs. *62*, 90—94. — 7. *Жданов, Г. Л.:* (1957) Вопросы онкологии *6*, 678. — 8. Kellner, B., Németh, L., Sellei, C.: (1955) Naturwissenschaften, *42*, 582—583. — 9. Lapis, K.—Németh, L.: (1957) Bull. Ass. fr. Et. du Canc., *44*, 519—532. — 10. Larionov, L. F.: (1956) Brit. J. Canc., *10*, 26—32. — 11. *Ларионов, Л. Ф. и сотрудн:* (1956) Вопросы онкологии *6*, 717. — 12. *Ларионов, Л. Ф.:* (1954) Вопросы онкологии *3*, 290—298. — 13. Rivenzon, A.: (1958) Comunicare la Soc. St. Med. Bucuresti, Sect. Oncologie, dec.

LE TRAITEMENT COMPLEMENTAIRE DU CANCER PAR DES DOSES NON-LEUCOPENIQUES DE CYTOSTATIQUES, ADMINISTRES DE MANIÈRE CHRONIQUE

A. RIVENZON et P. NEDELESCU

Des rats porteurs de tumeur Guérin T8, Walker 256, ou sarcome I.O.B. 9, sont traités au moyen de cytostatiques (Degranol, Sarcolysine, TEM, E39) administrés en doses non-leucopéniques.

Les injections intrapéritonéales sont pratiquées chaque jour ou une fois tous les deux jours, en obtenant la dose maxima par tatonnement, dose qui, même après une longue période d'utilisation, ne détermine pas l'abaissement du nombre des leucocytes.

Ces doses, variables avec chaque cytostatique, sont généralement comprises entre la 20-ème et la 50-ème partie de la dose léthale unique.

Le traitement ne s'avère pas toxique et ne détermine pas l'alteration de l'état général de l'animal.

Les résultats sont les suivants:

***a)* Inhibition accentuée de l'accroissement de l'adénocarcinome de Walker (fig. 8, 10, 11).**

***b)* Développement retardé des métastases de l'épitheloma de Guérin T 8 (fig. 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9).**

***c)* Inhibition de la vitesse de croissance du sarcome I.O.B. 9 (fig. 6).**

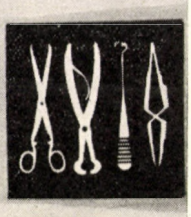
On propose d'essayer chez l'homme le traitement continuel, chronique, à doses non-leucopénique maxima, aussi bien pour le traitement complémentaire en vue de rétarder l'accroissement de la tumeur, que pour la prophylaxie à l'égard des métastases et récidives.

Dr. A. Rivenzon
Dr. P. Nedelescu
} București, B.-dul 1. Mai 11., Romînia

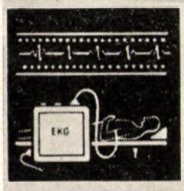
A kiadásért felel az Akadémiai Kiadó igazgatója Műszaki szerkesztő : Farkas Sándor
A kézirat nyomdába érkezett : 1960. X. 26 — Terjedelem : 9,25 (A/5) ív, 91 ábra (23 színes), 5 melléklet

1961.52310 — Akadémiai Nyomda, Budapest — Felelős vezető : Bernát György

Einrichtungen für Operationsräume



Chirurgische Instrumente



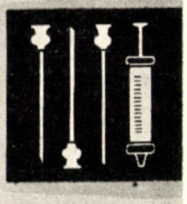
Elektromedizinische Apparate

Diagnostische Kleinapparate und mechanische Behandlungsgeräte

Zahnärztliche Stühle, »Unit« zahnärztliche Apparate, zahnärztliches Material

Tierärztliche Geräte

Eiserne Lungen verschiedener Typen



Injektionsnadeln und Spritzen

Schaukelbett-Respirator und andere Behandlungsgeräte für Atemlähmungserkrankungen

Ampullen, Phiolen, Gläser

Ausfuhr:

»METRIMPEX« Ungarisches Aussenhandelsunternehmen für Erzeugnisse des Instrumentenindustrie

Briefanschrift: **Budapest 62. Postfach 202. Ungarn**
Drahtanschrift: **INSTRUMENT BUDAPEST**

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 I. Fő utca 32. 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 I. Fő u. 32. 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 дря редакции и администрации.

Подписная цена «Acta Morphologica» — 110 форинтов за том. Заказы принимает предприятие по внешней торговле книг и газет «Kultura» (Budapest I. Fő utca 32. Текущий счет № 43-790-057-181) или его заграничные представительства и уполномоченные.

32,— Ft

INDEX

ANATOMIA NORMALIS ET EXPERIMENTALIS

Csaba, Gy.—Horváth, J.—Ács, T.—Horváth, C.: Effect of Galvanic Current and X-ray-Irradiation on the Tissue Reaction of Thymus 1

Barabás, Cs.—Barta, O.—Z. Szabó, L.—Vizkelety, T.: Beiträge zur funktionellen Anatomie des Sakroiliakalgelenks 7

Donáth, T.—Lengyel, I.: Analysis of the Staining Properties of Acridine Orange in Epithelial Cells 21

Katona, I.: Procédés de conservation des préparations anatomiques à l'aide de l'air raréfié 33

Gyévai, A.—Kapa, E.: Succinic Dehydrogenase Activity in the Thymus of Laboratory Rodents 49

Schranz, D.: Die quantitativen Veränderungen einzelner Bestandteile des Humerus und der Mandibula während des Seniums 59

PATHOLOGIA

Maros, T.—Csiky, M.—Seres—Sturm, L.: Über die nach Chlorpromazinbehandlung eingetretene Modifikation der Mikrogliareaktion an der Stelle experimenteller Gehirnläsionen 65

Kneiszl, F.—Bonivárt, A.: Angaben zu den Entwicklungsanomalien von Frühgeborenen 81

ONCOLOGIA

Ривензон, А.—Неделеску, П.: Вспомогательное лечение опухолей при хроническом введении не вызывающих лейкопению доз цитостатиков. 97

ACTA MORPHOLOGICA

ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE

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

REDIGIT
I. TÖRŐ

TOMUS X FASCICULI 2—4

AKADÉMIAI KIADÓ BUDAPEST

1961

ACTA MORPH. HUNG.

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 I. Fő utca 32. 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.

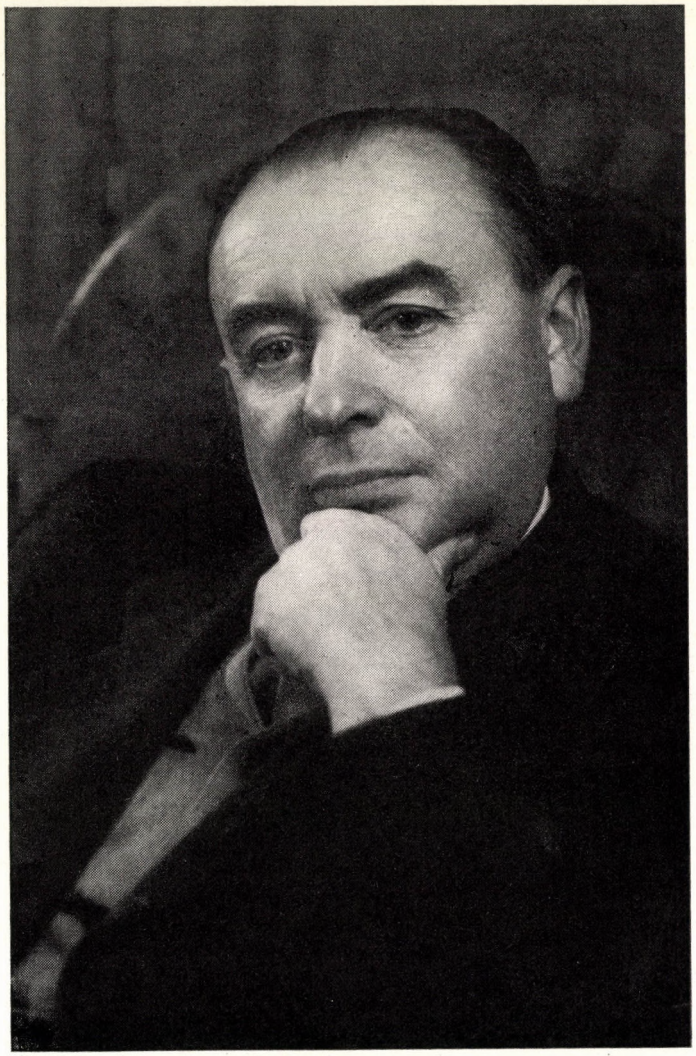
Die zur Veröffentlichung bestimmten Manuskripte sind an die folgende Adresse zu senden:

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 I. Fő utca 32. Bankkonto Nr. 43-790-057-181) oder bei seinen Auslandsvertretungen und Kommissionären.

EMERICO TÖRŐ
SEXAGENARIO
PROFESSORI ILLUSTRISSIMO
ET DE ARTE MEDICA ET BIOLOGIA
EXPERIMENTALI OPTIME MERITO
COLLEGAE DISCIPULIQUE HOC VOLUMEN
GRATO ANIMO
DD



Dr. I. Törő

Institut für experimentelle Medizin der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, Morphologische Abteilung (Abteilungsleiter: Prof. I. Törő), Budapest

VERGLEICHENDE HISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG DER NUKLEOPROTEIDE IN DEN BLUTZELLEN VON WIRBELTIERARTEN I. UNTERSUCHUNG DER WIRKUNG PROTEOLYTISCHER ENZYME

Gy. Rappay und Gy. Balogh

(Eingegangen am 26. März 1960)

Im letzten Jahrzehnt sind über die Nukleoproteide (NP) ständig mehr vergleichende Arbeiten erschienen, die teils auf qualitativen, teils auf quantitativen histochemischen und biochemischen Methoden beruhen. Besondere Bedeutung kommt den Versuchen von Mirsky und Ris (1949) zu, die sie an den isolierten Chromosomen von Individuen verschiedener Arten durchgeführt haben, weiterhin den Arbeiten von Gerzeli, Casati und Meneghetti Genaro (1956), die einen entschiedenen Zusammenhang zwischen dem Desoxyribonukleinsäuregehalt (DNS), dem Kernvolumen und dem Verhältnis des Kern-Plasmavolumens der Erythrozyten mehrerer Wirbeltierarten festgestellt haben. Hierzu rechnen sich auch die von Perugini und Mitarbeitern (1958) an Erythroblasten und von Vialli (1957) an den Erythrozyten zahlreicher Wirbeltierarten vorgenommenen quantitativen DNS-Bestimmungen. Bereits aus dieser sehr kurzen Literaturübersicht ergeben sich zwei Hauptzüge der erwähnten vergleichenden Versuche. Erstens handelt es sich fast ausnahmslos um quantitative Untersuchungen, was zweifellos den immer stärker verbreiteten und von vielen für grundlegend gehaltenen zytophotometrischen Methoden zu verdanken ist. Zweitens fällt auf, daß sich die Forscher — von wenigen Ausnahmen abgesehen — am intensivsten mit einem Bestandteil des Desoxyribonukleoproteidkomplexes (DNP), mit der DNS, befassen. Nur sehr wenige haben die andere DNP-Komponente, das basische Eiweiß, zum Objekt ihrer Versuche gewählt. Daß die Erforschung der Kerneiweiße noch sozusagen in den Kinderschuhen steckt, beruht wahrscheinlich darauf, daß die Eiweiß-Histochemie auch heute nur über wenig Methoden verfügt, mit denen in dieser wichtigen Frage zuverlässige Angaben gewonnen werden können.

Im Rahmen voriger Versuche (Rappay, 1959) haben wir das Verhalten der mit proteolytischen Enzymen (Trypsin, Pepsin) behandelten Säugerthymusdrüse und -Lymphgewebe untersucht. Nach der Enzymbehandlung wurde die Daniellische Tetrazonium- und die Feulgensche Reaktion durchgeführt. Bei der Auswertung der Resultate stellte sich heraus, daß die unserseits benutzten proteolytischen Enzyme nicht gleichartig wirken und diese

Methode zur Durchführung weiterer vergleichender Untersuchungen geeignet ist.

In der hier zu besprechenden Untersuchungsserie waren die Versuchsobjekte die Erythrozyten von Wirbeltieren, die verschiedene Klassen und Ordnungen repräsentieren. Die Zellen wurden nach Fixierung verschieden lange mit proteolytischen Enzymen inkubiert und anschließend die Tetrazonium- und Feulgen-Reaktion ausgeführt. Wie die Untersuchungen ergaben, werden die Blutzellen der phylogenetisch auf niedrigerer Entwicklungsstufe stehenden Tiere nach kürzerer Enzymwirkung verdaut als die Zellen der höheren Tiere. Aus den Versuchsergebnissen ziehen wir den Schluß, daß in den NP des Kerns der Blutzellen im Verlauf der Phylogenese Veränderungen eintreten.

Material und Methoden

Die Untersuchungen wurden an folgenden Tierarten vorgenommen: *Fische* = Karpfen (Cyprinus carpio); *Amphibien* = Rippenmolch (Pleurodeles waltlii), Frosch (Rana esculenta); *Reptilien* = Eidechse (Lacerta agilis); *Vögel* = Taube (Columba domestica), Huhn (Gallus domesticus). Das Blut gewannen wir von den Versuchstieren durch Dekapitation oder Venenpunktion. Die Blutgerinnung wurde mit Natriumzitrat verhindert. Im Verlauf der Behandlungen waren wir bestrebt, dieselben Bedingungen so gut wie möglich zu gewährleisten, weshalb wir Ausstriche in der Weise herstellten, daß drei oder vier Blutarten auf ein und demselben Objektträger aufgetragen wurden. Diese Ausstriche wurden 15 Minuten in Carnoy-Lösung fixiert. Sowohl an den Kontrollpräparaten als auch an den mit proteolytischen Enzymen behandelten Präparaten wurde die Daniellische Tetrazonium-Reaktion (unter Anwendung vom stabilisierten Diazoniumsalz Diazo Fast Blue B und H-Säure, laut PEARSE, 1954) und die Feulgensche Reaktion ausgeführt. Außer diesen Reaktionen kam Sudanschwarz-Färbung mit in 70%igem Alkohol gesättigter Sudan Black B-Lösung zur Anwendung.

Zusammensetzung der Inkubationsflüssigkeiten: *a)* Trypsin-Lösung. 1 ml des 0.05 *M* Phosphatpuffers pH 6,7 enthielt 0,3 mg Trypsin B. D. H. *b)* Pepsin-Lösung. 0,02 N HCl enthielt je ml 2 mg Pepsin cryst. (Ph. Hung. V). Die Kontroll-Lösung war in beiden Fällen enzymfreie Inkubationslösung. Die Inkubation erfolgte mit Trypsin-Lösung 1—25 Minuten, mit Pepsin-Lösung 1—60 Minuten im Thermostaten bei 37° C.

Versuche

Die mikroskopische Untersuchung der ohne vorherige Behandlung ausgeführten Tetrazonium-Reaktion ergab, daß in den Erythrozyten sämtlicher unserseits untersuchten Arten das Zytoplasma eine schwache und der Kern eine sehr intensive Reaktion zeigte. Eine sehr auffallende, starke Reaktion gaben die weißen Blutzellen sämtlicher Arten, insbesondere die Lymphozyten. In den Kontrollpräparaten trat die Feulgensche Reaktion typischerweise im Kern in Erscheinung. Eine gleichmäßig intensive Reaktion trat nach 10 Minuten dauernder Salzsäurehydrolyse zutage. Nach Sudanschwarz-Färbung war im Zytoplasma der Fisch-Erythrozyten sehr blasse Färbung und im Bereich der Kernmembran und Zellgrenze in den Erythrozyten sämtlicher Arten, insbesondere aber in den Zellen der Fische, mittelstarke Reaktion zu beobachten.

1. Wirkung der Trypsinbehandlung

Bereits nach sehr kurzer Behandlung (nach 60 Sekunden) war zu sehen, daß die Tetrazonium-Reaktion, mit den Kontrollpräparaten verglichen, in den Erythrozyten diffuser wurde, das Zytoplasma stärker gefärbt war und die Kerne in den Zellen sämtlicher untersuchten Arten geschwellt waren. Die intensivste Zytoplasmafärbung fanden wir in den Blutzellen der Amphibien. Farbintensität und Lokalisation der Tetrazonium-Reaktion änderten sich parallel mit der Erhöhung der Inkubationsdauer. Nach 4 Minuten währen-

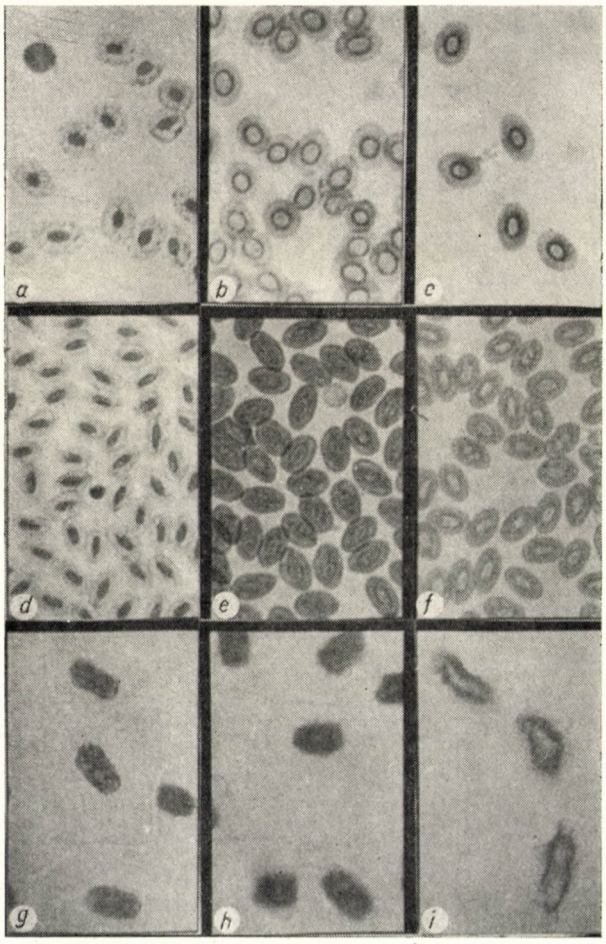


Abb. 1. Blutausstrich von Fisch, Taube und Rippenmolch. *a—f* — Tetrazonium-Reaktion, *g—i* — Feulgen-Reaktion. 40× Obj. *a, d, g)* Kontrolle; *b, e, h)* 4 Minuten mit Trypsin verdaut; *c, f, i)* 25 Minuten mit Trypsin verdaut

der Verdauung war die auffallendste Veränderung in den Fisch-Erythrozyten zu beobachten. Die starke Tetrazonium-Reaktion im Kern war verschwunden, d. h. eine sehr blasse Reaktion im Kern zu sehen. Dagegen wies die Kernmembran eine sehr intensive Reaktion auf. In den Blutzellen der anderen Tiere war die Farbreaktion im Zytoplasma intensiver, während die Tauben-Lymphozyten interessanterweise ihre Färbung verloren. In bezug auf die Färbung verhielten sie sich wie die Erythrozytenkerne des Fisches. Eine wesentliche Veränderung trat im weiteren erst nach der Inkubationsdauer von 18 Minuten ein. Zu diesem Zeitpunkt war der Erythrozytenkern bei allen untersuchten Arten blasser gefärbt, nur bei den Fischen war die Zellfärbung unverändert. Nach 25 Minuten dauernder Inkubation hatten sämtliche Zellkerne ihre Färbung verloren, aber das Zytoplasma der Zellen gab eine unverändert starke Tetrazonium-Reaktion (Abb. 1, *a-f*).

Die parallel durchgeführte Feulgensche Reaktion zeigte ein ähnlich variables Bild. Bis zur 3.—4. Minute fanden wir im Vergleich mit den Kontrollen keine Veränderung. Nach einer Inkubation von 4 Minuten war die Feulgensche Reaktion bei den Kernen der Fisch-Erythrozyten nur an den peripheren Randabschnitten zu beobachten. Dieselbe Veränderung sahen wir in den Zellen der anderen Arten erst nach längerer Behandlung, nach 25 Minuten (Abb. 1, *g-i*).

Die Sudanschwarz-Färbung wurde nach einer Verdauung von 25 Minuten vorgenommen. An der der Zell- und Kernmembran der Fisch-Erythrozyten entsprechenden Stelle war ein intensiv dunkel gefärbter Ring anzutreffen. Diese Färbung trat in den Zellen der anderen Spezies weniger charakteristisch zutage (Abb. 2).

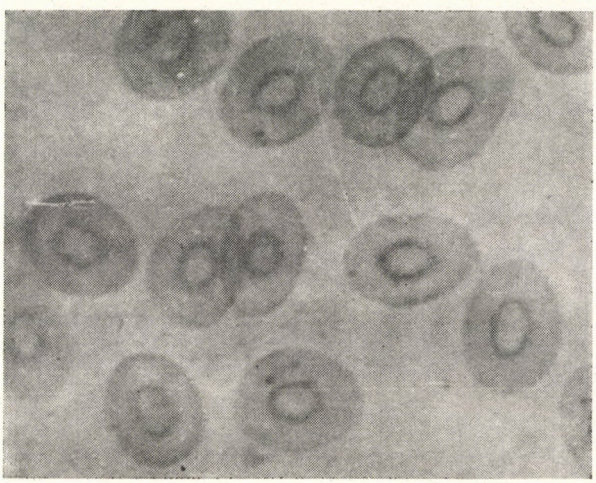


Abb. 2. Blutausstrich vom Fisch. Sudan Black B-Färbung, 40× Obj. 25 Minuten mit Trypsin behandelt

2. Die Wirkung der Pepsinbehandlung

Bei den mit Pepsin vorgenommenen Versuchen wurde die Inkubationsdauer verlängert, weil die Zelleiweiße anläßlich ähnlicher Untersuchungen an anderen Objekten erst nach längerer Inkubationsdauer verdaut worden waren. In den ersten 15 Minuten der Inkubation trat im Bild der Zellen, mit den Kontrollpräparaten verglichen, überhaupt keine Veränderung ein. Nach 20 Minuten dauernder Inkubation war das Zytoplasma der Zellen aller Arten — mit Ausnahme der Amphibien-Erythrozyten — blasser gefärbt, die Tetrazonium-Reaktion der Zellkerne jedoch völlig intakt geblieben. Nach einer Inkubation von 25 Minuten war die Färbung im Zytoplasma sämtlicher Zellen verschwunden, lediglich die bloßen Kerne traten hervor. Auch nach der längsten Inkubationsdauer (60 Minuten) zeigten die Zellkerne intensive Tetrazonium-Reaktion.

Die Farbintensität der Feulgenschen Reaktion blieb von der ersten bis zur letzten Minute der Inkubation gleichmäßig intensiv.

Besprechung

Trypsin und Pepsin sind Endopeptidasen mit bekannter proteolytischer Wirkung. Nach neueren biochemischen Untersuchungsergebnissen (Hauro-vitz, 1950) besitzen diese beiden Enzyme einen unterschiedlichen Angriffspunkt. Unter entsprechenden Bedingungen werden von Trypsin die basischen, von Pepsin die an aromatischen Aminosäuren reichen Eiweiße gespalten. Mit der unserseits angewandten Daniellischen Tetrazonium-Reaktion lassen sich sowohl die basischen wie die aromatische Aminosäuren enthaltenden Eiweiße nachweisen; nach dem heutigen Stand unseres Wissens ist diese Reaktion zum Nachweis der tyrosin-, tryptophan- und histidinhaltigen Eiweiße geeignet.

Bei der mikroskopischen Auswertung der Präparate fiel anläßlich der Untersuchung der trypsinbehandelten Präparate auf, daß sich die Farbintensität der Tetrazonium-Reaktion im Erythrozytenkern der phylogenetisch auf niedrigerer Entwicklungsstufe stehenden Exemplare (Fisch) nach sehr kurzer Enzymbehandlung wesentlich verringerte. In denselben Zellen der phylogenetisch höher entwickelten Tiere blieb die Eiweißreaktion des Kerns längere Zeit intakt und glich erst nach 25 Minuten währender Verdauung der an den Fischzellen beobachteten Reaktion. Dieses Verhalten der Reaktion läßt sich unseres Erachtens auf mehrere Ursachen zurückführen. Vor allem ist anzunehmen, daß sich die Aminosäurenzusammensetzung des Kerneiweißes in den Blutzellen der phylogenetisch auf niedrigerer Entwicklungsstufe stehenden Lebewesen — im vorliegenden Fall des Fisches — von der Zusammensetzung bei den höher entwickelten Tieren unterscheidet. Unser Versuch bietet aller-

dings keinen Beweis für diese Annahme, weil aus der Farbintensitätsveränderung der Reaktion in keiner Weise auf die Aminosäurenzusammensetzung geschlossen werden kann. Viel plausibler erscheint die Vermutung, daß die Ursache der beobachteten Veränderungen auf das wechselseitige Verhältnis der Komponenten im Eiweiß-Nukleinsäurekomplex der verschiedenen Tierarten, d. h. auf die eventuellen quantitativen Beziehungen dieser beiden Komponenten der NP zurückgeführt werden muß.

Bei der Untersuchung der quantitativen Beziehungen zwischen dem Residualeiweiß und der DNS in den Chromosomen, die aus Zellen verschiedener Arten bzw. gleicher Arten, aber verschiedener Organe gewonnen wurden, haben MIRSKY und RIS festgestellt, daß in den aus Erythrozyten — und interessanterweise aus der Thymusdrüse — isolierten Chromosomen die Residualeiweißmenge im Verhältnis zum DNS-Gehalt sehr gering, demgegenüber in den aus Leber-, Nieren- und Pankreaszellen isolierten Chromosomen das Verhältnis umgekehrt ist. Angesichts dieser Literaturangabe wirkt unsere vorhin erwähnte Annahme bereits wahrscheinlicher, d. h. im Verlauf der Phylogenese kommt es offenbar zu einer Veränderung der Residualeiweißmenge, und vielleicht manifestiert sich diese Veränderung in unseren trypsinbehandelten Präparaten. Darauf scheint auch unsere Beobachtung hinzuweisen, daß sich der Kern der phylogenetisch höher entwickelten Tauben-Lymphozyten bei gleicher Behandlungsdauer ebenso verhielt wie der Kern der Fisch-Erythrozyten.

Im Rahmen unserer Versuche erscheint weiterhin die Wahrnehmung interessant, daß sich die Farbintensität und Lokalisation der Feulgenschen Reaktion parallel zur Trypsinbehandlung veränderte. Aus dieser Veränderung geht unzweifelhaft hervor, daß die feulgenpositive Kernsubstanz allmählich verschwand bzw. nur an gewissen Stellen — an den Randabschnitten der Zellkerne — erhalten blieb. Auch diese Veränderungen führen wieder zu Hypothesen. Diese Veränderung der Feulgenschen Reaktion könnte so erklärt werden, daß wir die Spezifität der Reaktion in Zweifel ziehen, d. h. annehmen, nur die Eiweißfraktion der intakten NP sei imstande Leukofuchsin wieder rot zu färben, und daß die eigentliche Reaktion nicht von der DNS verursacht werde. Gegen diese Annahme lassen sich zahlreiche Angaben anführen, welche die Spezifität der Feulgenschen Reaktion beweisen. Man könnte auch die Frage stellen, ob das Trypsin nicht mit Nuklease verunreinigt gewesen und das Verschwinden der Feulgenschen Reaktion auf die Wirkung der verunreinigenden Desoxyribonuklease zurückzuführen sei. Gegen diese Annahme spricht unsere bei anderen Untersuchungen gemachte Beobachtung, wonach die Objekte von chemisch reiner Desoxyribonuklease erst nach 16stündiger Inkubation verdaut wurden, während zugleich die Eiweißreaktion der untersuchten Zellen intakt geblieben ist. Die in den vorliegenden Untersuchungen angewandte Trypsinverdauung war von so kurzer Dauer, daß eine etwaige

Verunreinigung keine wesentliche Wirkung auf die DNS ausgeübt haben kann. Letzten Endes müssen wir die Hypothese akzeptieren, daß der NP-Komplex im Verlauf der Trypsinverdauung eine Veränderung erleidet. Es kommt zur Spaltung der Eiweißkomponente, wodurch notwendigerweise die Stabilität der DNS beeinträchtigt oder ganz aufgehoben wird, so daß das DNS-Molekül zerfällt und die Feulgensche Reaktion verschwindet. Wenn es sich nur um eine geringe oder partielle Stabilitätsverminderung handelt, so tritt noch eine gewisse Farbreaktion in Erscheinung.

Die Auswertung der mit Pepsin behandelten Präparate ergab, daß das Zytoplasma der Erythrozyten aller unserseits untersuchten Arten auf gleiche Weise verdaut wird. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen der früher am Säugergewebe durchgeführten eigenen Untersuchungen überein.

Zusammenfassung

Die Erythrozyten von Tieren, die verschiedene Wirbeltierklassen und -Spezies repräsentieren, wurden mit proteolytischen Enzymen inkubiert. Die Untersuchungen ergaben, daß von Trypsin die Kernsubstanz der Erythrozyten von phylogenetisch auf niedrigerer Stufe stehenden Arten rascher gespalten wird, während Pepsin auf das Zytoplasma der untersuchten Zellen gleichmäßig wirkt.

LITERATUR

1. Gerzeli, G., Casati, C., Meneghetti Genaro, A. (1956): I volumi nucleari e cellulari in relazione di acido desossiribonucleico in eritrociti al tenore di alcune specie dei Vertebrati. Riv. Istochim. norm. pat. *2*, 149—153. — 2. Haurovitz, F. (1950): Chemistry and Biology of Proteins. Academic Press, New York. — 3. Mirsky, A. E., Ris, H. (1949): Variable and Constant Components of Cromosomes. Nature (London) *103*, 666. — 4. Pearse, A. G. (1954): Histochemistry, Theoretical and Applied. Churchill, London. — 5. Perugini, S., Soldati, M. u. Torelli, U. (1958): Cytoplasmatic Studies on the Desoxyribonucleid Acid and Histone Content of Normal Human Erythroblasts. Acta histochem. *6*, 133—138. — 6. Rappay, Gy. (1959): Das Verhalten des Thymusgewebes gegenüber proteolytischen Enzymen. Magy. Tud. Akad. biol. orv. Oszt. Közl. (Budapest) *10*, 129—134. — 7. Vialli, M. (1957): Volume et contenu en ADN par noyau. Exp. Cell Res. Suppl. IV, 284—293.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НУКЛЕОПРОТЕИДОВ В КРОВЯНЫХ ТЕЛЬЦАХ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ПОЗВОНОЧНЫХ. I

ДЬ. РАППАИ и ДЬ. БАЛОГ

В своих экспериментах авторы применяли ядерные эритроциты животных, представляющих различные классы и отряды позвоночных. Эритроциты инкубировались протеолитическими энзимами, причем было установлено, что трипсин разлагает быстре ядерное вещество индивидуумов, находящихся на филогенетически более низкой ступени, в то время как пепсин воздействует в одинаковой мере на цитоплазму исследованных клеток.

NUCLEOPROTEINS IN THE BLOOD CELLS OF VERTEBRATES. I

GY. RAPPAY and GY. BALOGH

Nucleated erythrocytes of animal species representing different classes and orders of vertebrates were incubated with proteolytic enzymes. The nuclear substance in the erythrocytes of phylogenetically higher animals was found to have an increased sensibility to trypsin. Pepsin exerted an identical effect of the cytoplasm of all examined cells.

Dr. György Rappay
György Balogh
Budapest IX. Tűzoltó u. 58. Ungarn

Department of Histology and Embryology, University Medical School, Budapest,
(Director: Prof. I. Törő)

TRANSPLANTATION OF REGENERATIVE HEPATIC TISSUE

Gy. Csaba and Cecilia Horváth

(Received April 7, 1960)

In the course of transplantation experiments that have been in progress in our Department for some time it was possible to demonstrate that heterotransplants — and presumably also homologous transplants — pass through three phases in the host organism; *viz.* (i) the period of local nutritional disturbance; (ii) the period of assimilation-adaptation; and (iii) that of the development of immune materials. We attach a particular importance to the second phase during which the implanted heterologous tissue has to combat the harmful influences of and adapt itself to the new milieu, and must become capable of assimilating foreign proteins. This is the phase which we think determinates the destiny of the transplant: negatively if it perishes and positively if it survives this phase, whereafter the chances of its further existence are favourable [1, 2, 3, 7, 8].

It has been observed in the course of these experiments that, if autologous hepatic tissue had been transplanted into the anterior eye chamber of rats, the parenchymal cells degenerated, while the biliary ducts began to proliferate and formed islets of hepatic parenchyma. This was a remarkable phenomenon considering that the liver tissue of adult rats practically never survives explantation on heterologous medium and proliferates very poorly even in autologous media [2]. Only regenerative adult liver is able to thrive under such conditions. We had therefore to assume the existence of factors which activate the fragments of tissue taken from intact liver and transplanted into a regenerating organism, factors which make the vitality of the transplants similar to that of regenerative tissue.

The purpose of the experiments to be reported was to ascertain whether direct (local) or humoral factors of the regenerative process are at play at transplantation, and to control some theoretical considerations regarding transplantation of tissues of increased vitality.

Method

A total of 64 albino rats of 200 g body weight each was used in the experiments. Each experimental group consisted of 8 animals into both eyes of which hepatic tissue was implanted. The transplantations were partly homologous and partly heterologous, with mice as donors

in the latter case. The t ssue to be transplanted was cut up into fragments of 0.5 cu. mm and inserted into the lumen of an injection cannula with a blunt point. After opening the anterior chamber of the recipient's eye by means of Graefe's lancet, the cannula was introduced through the aperture and the tissue-fragment was placed into the anterior chamber, strictly observing the rules of sterility.

Likewise Graefe's lancet was used to injure the liver of the recipient animals. After opening the abdomen, a wound some mm wide and deep was inflicted on the liver, covered with sterile thrombin-fibrin powder to prevent haemorrhage, and the abdominal wall was closed. Transplantation was performed 24 hours after the operation.

The technique of injuring the liver of the donor animals was the same as in the case of the recipients; transplantation followed 48 hours later, with uninjured tissue taken from the edge of the wound.

The recipients' eyes were removed and fixed in Carnoy's fluid 10 and 20 days after the transplantation. After embedding the area of the anterior chamber in methyl-benzoate-celloidin-paraffin, serial sections were made and stained with methyl green-pyronine.

The period of observation lasted 20 days.

Experimental

The experiments were carried out in four groups: (i) intact hepatic tissue was transplanted into rats with intact liver; (ii) intact hepatic tissue was transplanted into rats with their liver injured; (iii) hepatic tissue from animals with a damaged liver (regenerative tissue) was transplanted into rats with intact liver; (iv) regenerative hepatic tissue was transplanted into rats with impaired (regenerative) liver. All these transplantations were made homologously and heterologously alike. Since no difference was observed in the behaviour of homologous and heterologous transplants, the results will be discussed without regard to this factor.

(i) *Transplantation of normal liver into the anterior chamber of rats with intact liver*

Ten days after the operation there was no nuclear staining observable in the area of the disintegrated graft. Pyroninophilia was slight and non-specific. Plasmocytes were accumulated in the marginal parts of the transplant, while occasional macrophages containing haemoglobin appeared nearer the centre.

Twenty days after the operation, the structure of the transplanted tissue-fragment had become pervaded by capillaries and was no longer recognizable so that only proliferating connective tissue marked the site of the vanished transplant. The plasmocyte and macrophage count had increased since the 10th postoperative day. The process of absorption was very marked.

(ii) *Transplantation of normal liver into the anterior chamber of rats with impaired liver*

On the tenth postoperative day the transplant was smaller than its original size, with a necrotic zone in its central part and a slight plasmocytic reaction. Islets of regular hepatic cells were found in several areas, with

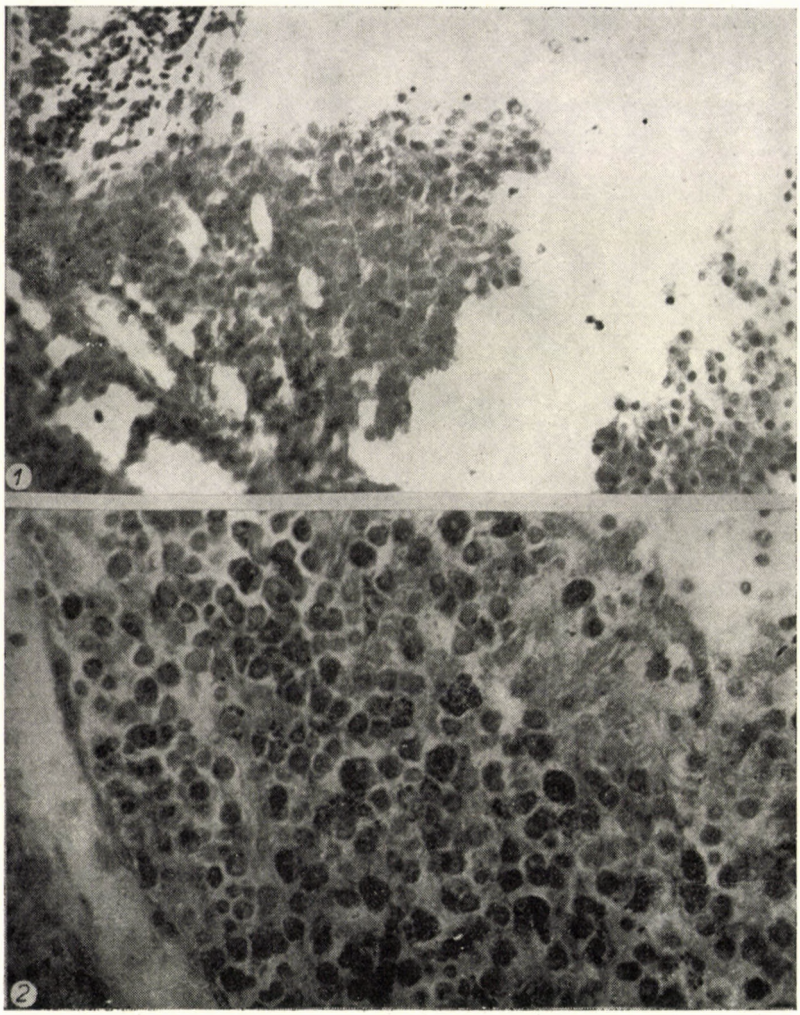


Fig. 1. Heterologous regenerative hepatic tissue transplanted into rat with liver injury, after 20 days. Note intact liver-cell trabeculae. Methyl green-pyronine, ×100

Fig. 2. Homologous regenerative hepatic tissue transplanted into rat with unimpaired liver, after 20 days. Marked degeneration, many plasmocytes and macrophages. Hepatic tissue not recognizable. Methyl green-pyronine, ×200

pronounced nuclear staining of the cells and very marked pyroninophilia of the cytoplasm. The reduction of the necrosed area was associated with a decrease in the number of macrophages.

On the twentieth postoperative day, the hepatic structure was still preserved and in some parts even more pronounced than in the 10-day preparation. Marked capillarization was seen.

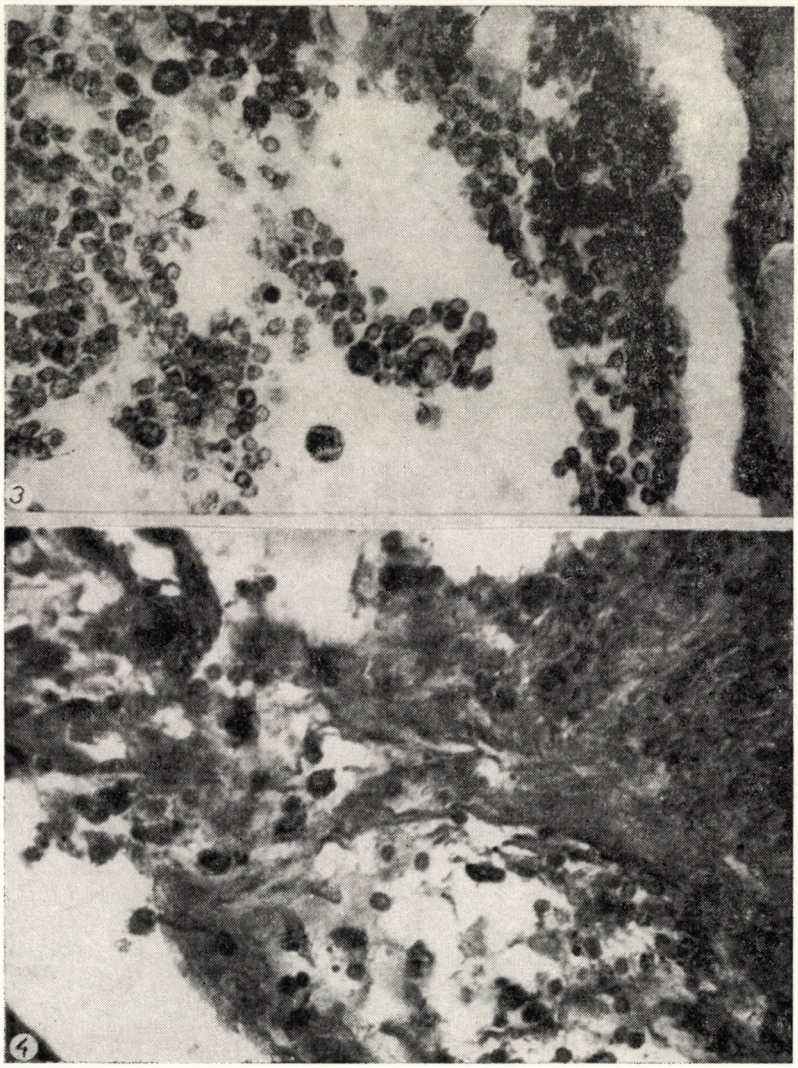


Fig. 3. Heterologous regenerative hepatic tissue transplanted into intact animal, after 10 days. Changes as in Fig. 2. Methyl green-pyronine. ×200

Fig. 4. Homologous intact hepatic tissue transplanted into intact animal, after 10 days. Note almost complete absorption. Methyl green-pyronine. ×200

(iii) *Transplantation of regenerative liver to the anterior chamber of rats with intact liver*

After 10 days the general picture was as in (ii). Central necrosis, plasmocytes in the marginal parts, islets of hepatic cells, regular structures and staining were characteristic.

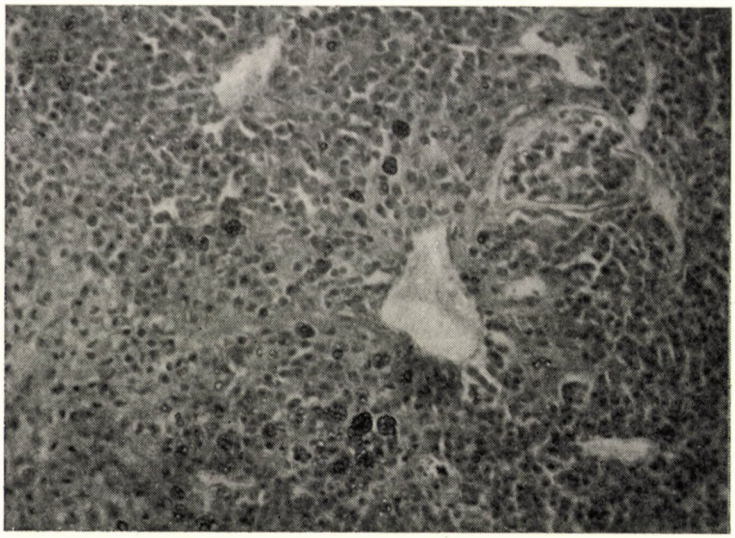


Fig. 5. Heterologous intact hepatic tissue transplanted into rat with liver injury. Note regular structure and occasional macrophages filled with haemoglobin. Methyl green-pyronine. ×100

After 20 days considerable parts of the transplants had been absorbed. Their whole area was so densely interwoven with capillaries that frequently nothing but the vascular network was observable. There were many macrophages, filled with haemoglobin, also many plasmocytes. No intact hepatic structure was visible.

(iv) *Transplantation of regenerative liver to the anterior chamber of rats with impaired liver*

The general picture ten and twenty days after transplantation was as under (ii).

Discussion

According to the findings, the process of regeneration seems to be favourable for the survival of transplants. Whether it was in the transplanted tissue or in the liver of the recipient animal that regeneration was under process, transplantation was more successful than in cases where intact tissue was transferred into intact hosts. There were, nevertheless, some differences between the particular forms of transplantation which may throw light upon certain biological laws.

The attempt to transplant normal hepatic tissue into rats with an intact liver was a failure. The highly differentiated liver tissue usually does not survive explantation on heterologous medium [2], although immunological

factors do not harm it in tissue cultures. The possibility of immune reactions is commonly regarded as limited in case of implantation into the eye-chamber [9, 10], although, according to both the literature [6] and our own experience, injury to the eye opens the path to immune reactions, a fact confirmed by the appearance of plasmocytes. Destruction was complete in our experiments, but this could not be ascribed to immunological factors alone, considering the different fate of normal tissue transplanted into animals with intact and animals with a damaged liver. Not only did the transplant in hosts with impaired liver survive the first ten days, but it was alive even on the 20th day and seemed, moreover, to have developed in the meantime. It is evident that, while the immunological factors were identical in both cases, humoral-regenerative factors produced in the latter case an effect promoting the vitality of the implanted tissue.

The primary role of regenerative factors was further illustrated by the fact that although transplants obtained from donors with an injured liver (*i. e.* regenerative tissues) were on the 10th day still viable and presented a picture similar to that described in the foregoing, they showed marked signs of degeneration and began to be absorbed by the 20th postoperative day. This observation proves that regenerating hepatic tissue, if transplanted, has a decidedly higher vitality than unimpaired tissue but needs a permanent stimulus for its survival, a stimulus ensured by the regenerative liver of the host or rather those active substances which are released by it.

Our experimental results seem to support our theory of the three phases. The fact that, aided by the regenerative factor, the transplant survived the immunologically critical 8th day and that the vascularized tissue was still alive on the 20th day, bears out the significance of the second phase. It should be borne in mind that both regenerative and intact hepatic tissue provoke an immune reaction. The fact that more decomposed tissue induce more intensive immune reactions does not diminish the significance of the phase of assimilation and adaptation, since the very process of decomposition is due to disturbed assimilation. It is thus obvious that the humoral and, to a slighter extent, the local actors of regeneration promoted the success of transplantation by enhancing the vitality of the implanted tissue and possibly also by promoting its differentiation.

The indentical behaviour of homologous and heterologous transplants shows that if a highly differentiated tissue like the liver of adult mammals is transplanted, the success or failure of the operation depends much more on the degree of differentation, *i. e.* the vitality of the transferred tissue, than the racial difference between donor and host [4, 5].

Summary

Homologous and heterologous normal and regenerative hepatic tissue has been transplanted into rats with intact and rats with damaged liver. Survival of the transplants was promoted by a regeneration of the recipient's liver and also but less, by that of the donors. The cause of the phenomenon and its connection with the three-phase theory have been discussed.

REFERENCES

1. Csaba, Gy. (1956): Three Phases in the Life of Heterotransplantants. Acta Biol. Hung. *6*, 361. — 2. Csaba, Gy.—Hegyi, K. Cs. (1958): Behaviour of Phylogenetically and Ontogenetically Different Tissues in Tissue Culture, Explanted on Autologous, Homologous and Heterologous Media. Acta Biol. Hung. *8*, 149. — 3. Csaba, Gy. (1958): Die Rolle der Assimilations-Adaptationsfaktoren in der Entwicklung von Heterotransplantaten. Virch. Arch. path. Anat. *331*, 653. — 4. Loeb, L. (1930): Transplantation and Individuality. Physiol. Rev. *10*, 4. — 5. Loeb, L. (1953): Organismal Differential and Organ Differential. Proc. nat. Acad. Sci. *39*, 127. — 6. Sure, T.—Sudimack, J. (1954): Capillary Tube Method for Antibody Determination. Arch. Ophtalm. *51*, 6. — 7. Törő, I.—Csaba, Gy. (1958): Experimentalni prispevky k problemu adaptace a assimilace transplantatu. Folia Biol. Suppl. — 8. Törő, I. (1959): A szöveti immunitás és tranplantatio néhány problémája. Orv. Hetil. Budapest. *100*, 1065. — 9. Weekers, R. (1939): Cristallin et survie selon la méthode de Haan—Baker. Ophtalmologica *97*, 159. — 10. Witmer, R. (1952): Elektrophorese des Kammerwassers. Ophtalmologia. Basel. *123*, 280.

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ПЕЧЕНОЧНОЙ ТКАНИ В УСЛОВИЯХ РЕГЕНЕРАЦИИ

ДЬ. ЧАБА и Ц. ХОРВАТ

На крысах с непораженной и с пораженной печенью проводились гомо- и гетеротрансплантации ткани эдоровой печени крыс или же печени в стадии регенерации, причем было установлено, что регенерация печени реципиента выраженно, а регенерация печени донора в меньшей степени способствует приживанию трансплантатов. Обсуждаются причины этого явления, или же его связь с трехфазовой теорией.

ÜBER DIE TRANSPLANTATION VON LEBERGEWEBE IM REGENERATIONSSTADIUM

GY. CSABA und C. HORVÁTH

Dr. György Csaba
Dr. Cecilia Horváth
Budapest IX. Tűzoltó u. 58. Hungary

An Ratten mit intakter und geschädigter Leber wurden Homo- bzw. Heterotransplantationen von normaler Rattenleber bzw. von regenerierender Rattenleber durchgeführt. Es wurde festgestellt, daß die Regeneration der Leber des Rezipienten in stärkerem, die Regeneration der Leber des Donors hingegen in geringerem Maße das Überleben der Transplantate fördert. Die Ursachen dieser Beobachtung, bzw. ihr Zusammenhang mit der Dreiphasen-Theorie werden diskutiert.

Institut für Histologie und Embryologie der Medizinischen Universität, Budapest
(Vorstand Prof. I. Törő)

ÜBER DAS VERHALTEN DER HASSALLSCHEN KÖRPERCHEN NACH RÖNTGENBESTRAHLUNG

Irén Pályi und Eszter Kapa

(Eingegangen am 14. April 1960)

Es ist bekannt, dass der Thymus die verschiedenen Reize die den Organismus treffen, immer mit einer spezifischen Reaktion beantwortet [5]. Nach Implantation von Eiweissen, nach Hungern und nach Hormonbehandlung wurde das Ausschütten der Thymozyten, die Zusammenziehung des Epithelretikulums und die Zunahme der Hassallschen Körperchen beobachtet [9]. Mehrere Autoren beschrieben das Entstehen von Zysten im Thymus nach Röntgenbestrahlung, welche von den Hassallschen Körperchen abstammen sollen[2, 8, 1]. Tschassownikow beobachtete nach Röntgenbestrahlung eine kompakte Epithelstruktur, die in der Gewebekultur intensiv proliferierte [10].

Vorliegende Arbeit behandelt das weitere Schicksal der nach Röntgenbestrahlung vermehrt auftretenden Hassallschen Körperchen und ihr Verhalten in vitro.

Material und Methoden

Zu den Versuchen verwendeten wir 7 Tage alte Meerschweinchen. Der Thymus der Versuchstiere wurde in der medianen Linie des Halses auf einem Gebiet von 2×2 cm mit Strahlendosen von 100, 200, 300, 500, 800, 1000 r behandelt. (kV 180, mA 10, Filter 0,5 Cu, Feld 2×2 cm, Focus 40 cm, r/Min: 60). In jeder Versuchsgruppe wurden je 10 Tiere bestrahlt. Die Explantation erfolgte 48 Stunden nach der Bestrahlung. Ein Teil jeder bestrahlten Thymusdrüse wurde histologisch bearbeitet, aus dem anderen Teil wurden Gewebekulturen angesetzt. Es wurden Röhrenkulturen verwendet, als protektives Medium diente ein Gemisch von Hühnerplasma und Hühnerembryonalextrakt.

Die Nährflüssigkeit war ein Gemisch von Tyrodelösung, menschlichem Serum und Embryonalextrakt im Verhältnis 2:2:1. Die Kulturen wurden jeden zweiten Tag gewaschen und am 2., 4., 8., 14. Tag fixiert. Sowohl die Kulturen, als auch die histologisch bearbeiteten Thymuspräparate wurden in Carnoy fixiert und mit May—Grünwald—Giemsa-Lösung gefärbt. Daneben wurde die Tetrazonium-Kupplungsreaktion und nach Fixieren in kaltem, 80%igen Alkohol die alkalische Phosphatase-Reaktion (3) angewendet. Die Kulturen wurden zum Teil nach Einbettung in Serienschnitten, zum Teil in toto untersucht. Der Thymus der Kontrolltiere wurde mit denselben Methoden bearbeitet.

Befunde

Nach Irradiation mit verschiedenen Strahlendosen erfolgen charakteristische Veränderungen in den Hassallschen Körperchen. Nach Irradiation mit 100—300 r entstehen am zweiten Tage nach der Bestrahlung mehrere

kleinere Hassallsche Körperchen, nach 500 r kommt es zur Ausbildung von sehr grossen Körperchen. Die Gewebereaktion nach diesen Strahlendosen ist im Prinzip nicht verschieden, nur die Intensität der Reaktion nimmt mit zunehmender Dosis ebenfalls zu. Die Ergebnisse werden deshalb zusammengefasst behandelt.

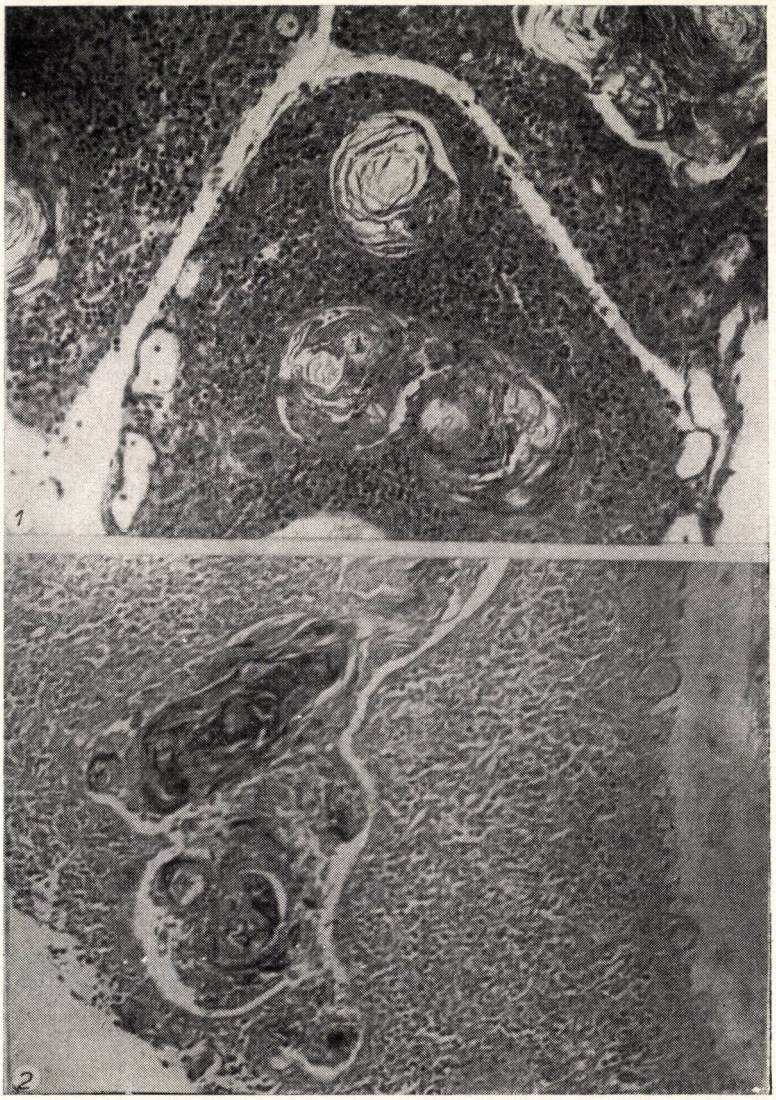


Abb. 1. Thymus nach Bestrahlung mit 1000 r. May—Grünwald—Giemsa

Abb. 2. Thymus nach Bestrahlung mit 800 r. Tetrazonium-Kupplungsreaktion

1. *Das histologische Bild der bestrahlten Thymusdrüsen*

Im Vergleich zu den Kontrollen ist das Mark-Rinden-Verhältnis in den bestrahlten Thymusdrüsen gestört. Nach Bestrahlung mit 100—300 r sind im Mark sehr viele, aus einer einzigen Zelle bestehende Hassallsche Körperchen sichtbar. Diese können mit May—Grünwald—Giemsa nur schwer festgestellt werden, sind aber mit der Tetrazonium-Kupplungsreaktion gut sichtbar.

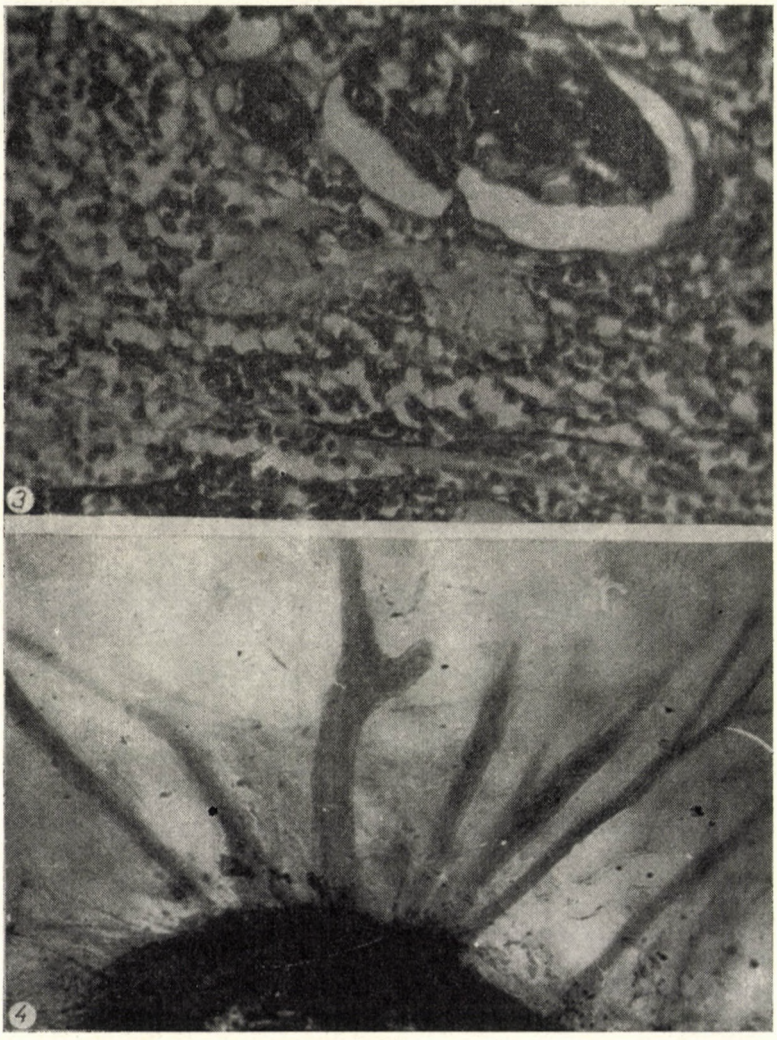


Abb. 3. Thymus nach Bestrahlung mit 800 r. Phosphatase-Reaktion

Abb. 4. Eintägige Gewebekultur aus einem mit 800 r bestrahlten Thymus. Tetrazonium-Reaktion

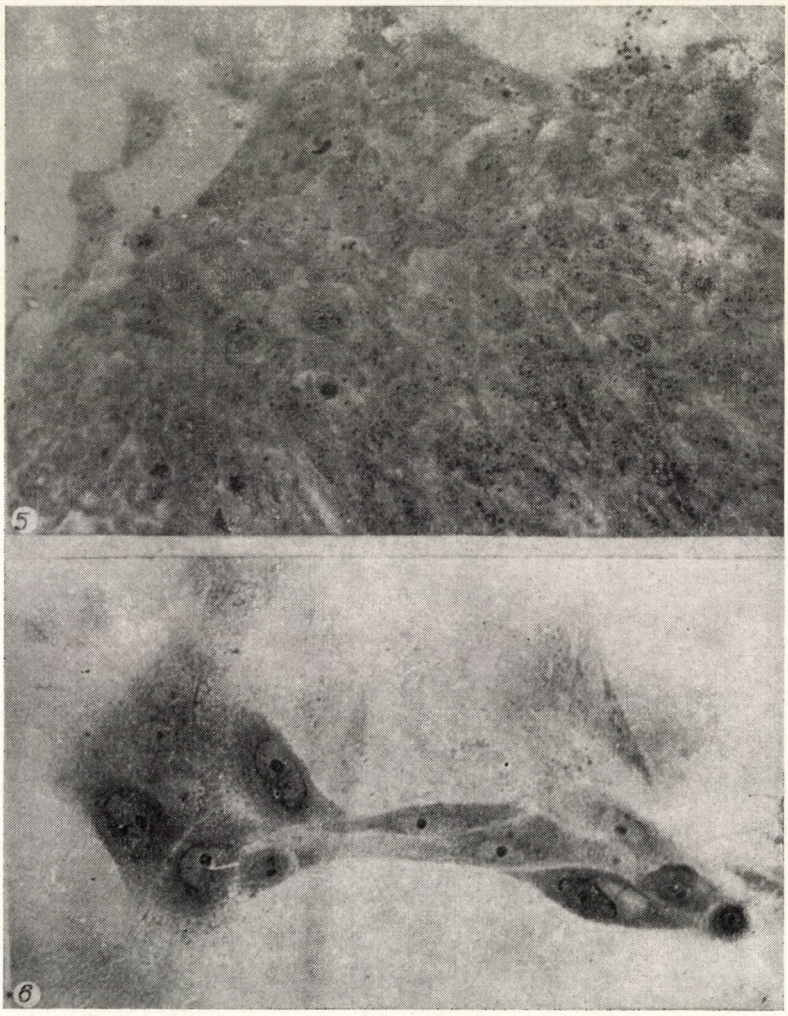


Abb. 5. Viertägige Gewebekultur aus einem mit 800 r bestrahlten Thymus. May—Grünwald—Giemsa

Abb. 6. Zehntägige Kultur aus einem mit 800 r bestrahlten Thymus. Tetrazonium-Reaktion

Nach Bestrahlung mit 500—800 r erscheinen sehr grosse Hassallsche Körperchen, welche aus mehreren Zellen bestehen (Abb. 1). Der zentrale Teil dieser grossen Körperchen zeigt zum Teil eine zelluläre, zum Teil eine konzentrische lamelläre Struktur. Die zentrale Struktur gibt eine sehr starke Tetrazonium-Kupplungsreaktion (Abb. 2), und zeigt eine bedeutende alkalische Phosphataseaktivität (Abb. 3). Diese Zentren werden von einem Zellring umgeben. Ausser den Hassallschen Körperchen können im Thymusgewebe neben Thymo-

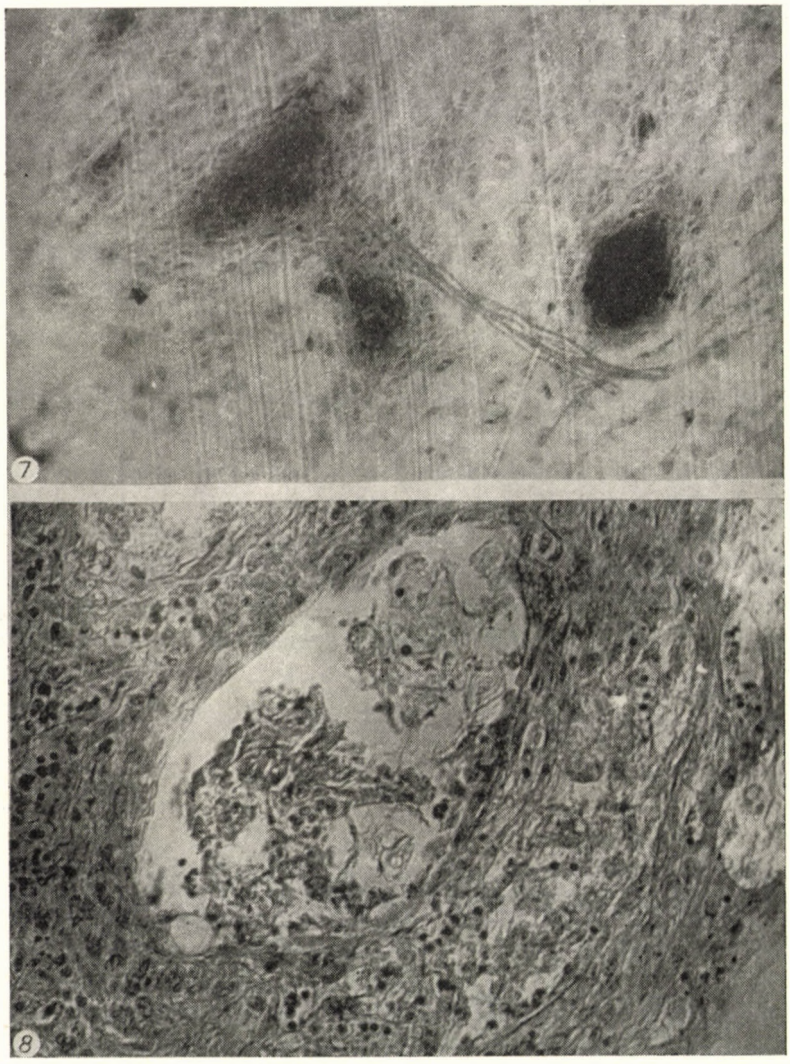


Abb. 7. 14tägige Kultur aus einem mit 800 r bestrahlten Thymus. Tetrazonium-Reaktion

Abb. 8. Schnitt-Präparat einer eintägigen Gewebekultur aus einem mit 800 r bestrahlten Thymus. May—Grünwald—Giemsa

zyten mit pyknotischen Kernen auch Plasmazellen und Histiozyten beobachtet werden.

2. *Die Kulturen von bestrahlten Thymusdrüsen*

In den Kontrollkulturen dominiert in den ersten 3 Tagen das Wachstum des Bindegewebes und erst dann beginnt das Wachstum des Epithels. Kulturen die aus bestrahltem Thymusgewebe angesetzt wurden, zeigen demgegenüber

bereits am ersten Tage die Sprossung charakteristischer Epithelzapfen (Abb. 4). Am vierten Tag der Züchtung wird infolge des intensiven Epithelwachstums das ganze Explantat von einer grossen, zusammenhängenden Epithellamelle umgeben (Abb. 5). Am 10. Tag der Züchtung dissoziiert die Epithellamelle. Einzelne Epithelzellgruppen geben eine starke Tetrazonium-Kupplungsreaktion (Abb. 6). Diese Zellgruppen werden zum Zentrum der sich in der Wachstumszone ausbildenden Hassallschen Körperchen.

3. *Serienschnitte von Thymuskulturen bestrahlter Tiere*

Die Kontroll-Explantate enthielten schon beim Ansetzen der Kulturen weniger Hassallsche Körperchen, als die Mutterstücke aus bestrahlten Thymusdrüsen. Die Kulturen die nach Bestrahlung angesetzt wurden, zeigten nach eintägiger Züchtung eine Destruktion der grossen Hassallschen Körperchen. Die gequollenen Retikulumzellen des Zellringes, der die Körperchen umgibt, reichen bis an den Rand des Explantates (Abb. 8).

Am vierten Tag der Gewebekultur sind die Hassallschen Körperchen schon bedeutend kleiner und am Rand des Explantates bildet auch das Epithelretikulum einen breiteren Ring. In 14 Tage alten Gewebekulturen sind nur noch kleine Überreste der Hassallschen Körperchen zu beobachten. Ein ähnliches Verhalten der Körperchen konnte in den Kontrollkulturen nicht beobachtet werden.

Besprechung

Die am meisten charakteristische Reaktion nach Röntgenbestrahlung ist im Thymus der Meerschweinchen ohne Zweifel die rapide Zunahme und Vergrösserung der Hassallschen Körperchen. In manchen Fällen wird am zweiten Tag nach der Bestrahlung sozusagen das ganze Mark zu einem einzigen riesigen Körperchen. Auch SMITH [6] und FLUHR [1] beobachteten nach Bestrahlung eine Zunahme der Hassellschen Körperchen, beschrieben aber keine solche Vergrösserung. SMITH [7] fasst die Zunahme der Hassallschen Körperchen nach Röntgenbestrahlung als ein Zeichen der Degeneration auf. Nach seinen Befunden dauert diese Phase der Degeneration 3 Tage lang nach der Bestrahlung, und nachher regeneriert sich der Thymus.

Auf Grund unserer Experimente stellen wir uns die kurz nach Bestrahlung auftretenden Veränderungen im Thymus folgendermassen vor: Der Thymus reagiert auf Röntgenbestrahlung ähnlich, wie auf andere Einwirkungen, (Hungern, Hormonbehandlung). Ein Zeichen dieser allgemeinen Reaktion die auch nach Röntgenbestrahlung erscheint, ist das Ausschütten der Thymozyten. Diese Reaktion ist auch bei geringen Strahlendosen (100—300 r)

ausgesprochen. Das Epithelretikulum zieht sich zusammen [9] und eine Folge dessen ist die Bildung von Hassallschen Körperchen. Die Stärke dieser Reaktion des Retikulums hängt weitgehend von der Strahlendosis ab. Geringere Dosen (100—300 r) führen nur zur Bildung von Anlagen der Hassallschen Körperchen (einzellige Hassallsche Körperchen), mit zunehmender Dosis nimmt aber auch die Intensität der Reaktion des Epithelretikulums zu. Nach 48 Stunden, d. h. zur selben Zeit wie in den Versuchen mit geringeren Dosen, entstehen in den Zentren Hassallsche Körperchen von bekannter Grösse bzw. Riesenkörper.

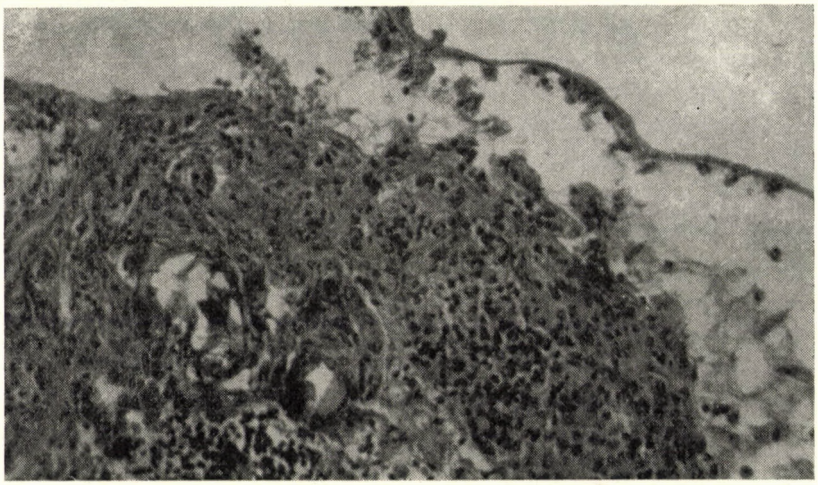


Abb. 9. Schnitt-Präparat einer viertägigen Gewebekultur aus einem mit 800 r bestrahlten Thymus. May—Grünwald—Giemsa

Die Beurteilung, ob der Thymus in diesen Fällen in Degeneration begriffen ist und auch die Hassallschen Körperchen inaktive Gebilde sind, ist auf Grund der Analyse histologischer Bilder schwer zu beantworten. Die histochemischen Reaktionen könnten bei der Beurteilung eine Hilfe leisten, müssen aber sehr vorsichtig bewertet werden. Die starke Tetrazonium-Kupplungsreaktion, die bereits bei der Ausbildung der Hassallschen Körperchen beobachtet wird, kann als ein Zeichen der Zunahme von Eiweisskörpern aufgefasst werden, woraus wiederum auf einen aktiven Prozess geschlossen werden kann. Ebenso kann auch die starke alkalische Phosphatasereaktion als ein Indikator einer intensiven Zelltätigkeit aufgefasst werden. Dies spricht aber gegen die Auffassung, dass die Hassallschen Körperchen degenerative Gebilde wären.

Auf Grund dieser Reaktionen kann aber die Frage nicht entschieden werden. Es ist nämlich bekannt, dass die Tetrazonium-Reaktion nicht für

gewisse Eiweiss-Komponenten spezifisch ist, sondern die Anwesenheit von eiweissreaktiven Gruppen nachweist und unter gewissen Umständen eine Koppelung auch mit anderen Verbindungen gibt [4]. Wenn diese reaktiven Gruppen angereichert werden, und das kann auch bei degenerativen Prozessen vorkommen, wird die Reaktion stärker ausfallen. Es gibt Angaben auch dafür, dass die Stärke der alkalischen Phosphatasereaktion bei degenerativen Prozessen zunimmt [7]. Dies kann damit erklärt werden, dass sich in diesen Fällen die Anordnung der Struktureiweisse ändert und dadurch auch solche Enzymmoleküle mit dem Substrat in Reaktion treten, welche sonst durch eine Grenzmembran von Substrat abgeschlossen waren. Dadurch wird natürlich die Intensität der Reaktion zunehmen. Diese Überlegungen führten dazu, dass wir in der Gewebekultur untersuchten, ob diese schnell ausgebildeten grossen Hassallschen Körperchen proliferieren.

Die Ergebnisse der Gewebekultur und ihr Vergleich mit den Serienschnitten der Mutterstücke zeigten Folgendes:

Mit zunehmendem Alter der Gewebekultur wurden in dem bestrahlten Thymus-Mutterstück die Hassallschen Körperchen ständig kleiner, ihre Struktur zerfiel immer mehr und die Zellen der umgebenden Zellmasse wurden später am Rand des Explantates gefunden.

Gleichzeitig mit diesen Prozessen, die im Inneren des Explantates ablaufen, erscheinen erst Epithelzapfen und später eine Epithellamelle in der Wachstumszone. Der zeitliche Vergleich der Serienschnitte und der Bilder der Wachstumszone zeigt, dass sich die Hassallschen Körperchen im Mutterstück in dem Masse verkleinern, in dem sich die auswachsenden Epithellamellen vergrössern. Am vierten Tag der Züchtung ist in der Wachstumszone die Epithellamelle sehr ausgesprochen, im Mutterstück sind aber nur noch sehr kleine Hassallsche Körperchen sichtbar.

Diese Ergebnisse können unseres Erachtens so ausgelegt werden, dass die Hyperfunktion des Epithelretikulums die nach Röntgenbestrahlung zustande kommt, und deren Ausdruck das Erscheinen von Hassallschen Körperchen ist, unter den Bedingungen der Gewebekultur wieder aufhört. Das zeigt sich in der bereits am ersten Tag bemerkbaren Proliferation der Epithelelemente in den Randpartien des Explantates und im gleichzeitigen Zerfall der Hassallschen Körperchen und des Zellringes, der die Körperchen umgibt.

Unsere Untersuchungen zeigen also, dass die nach Röntgenbestrahlung entstehenden Hassallschen Körperchen aller Wahrscheinlichkeit nach einen nach Bestrahlung eintretenden funktionellen Zustand des Epithelretikulums anzeigen.

Es muss aber bemerkt werden, dass diese Hassallschen Körperchen nicht identisch sind mit den Hassallschen Körperchen der alten Tiere, welche sich in der Gewebekultur ganz anders verhalten.

Zusammenfassung

Der Thymus 7 Tage alter Meerschweinchen wurde mit Röntgenstrahlendosen von 100—1000 r irradiiert. In den bestrahlten Thymusdrüsen war die Zunahme der Zahl und Grösse der Hassallschen Körperchen charakteristisch. Gewebekulturen aus dem Thymusgewebe der bestrahlten Tiere zeigten im Vergleich zu den Kontrollen eine charakteristische und rapide Epithelproliferation.

Es wird ein Zusammenhang zwischen den schnell verschwindenden Hassallschen Körperchen des Mutterstückes und der Epithelproliferation in der Wachstumszone angenommen. Die nach Bestrahlung erscheinenden Hassallschen Körperchen werden als eine Reaktion auf die Strahleneinwirkung und als Ausdruck eines bestimmten funktionellen Zustandes des Epithelretikulums aufgefasst.

LITERATUR

1. Fluhr, R. (1956): Die Wirkung kleiner Röntgen-Dosen auf Milz und Thymus der Ratte nach einmaliger und wiederholter Applikation. Strahlentherapie. *100*, 225—240. — 2. Hammar, J. A. (1931): Die normale morphologische Thymusforschung im letzten Vierteljahrhundert. Barth, Leipzig. — 3. Kovách, A. G. B. red. Kísérletes orvostudomány vizsgáló módszerei. Akadémiai Kiadó, Budapest 1959. Bd. V. — 4. Rappay, Gy.—Pósalaky, Z. (1959): Beiträge zur Frage der Spezifität der Tetrazoniumreaktion. Acta histochem. 7, 212—216. — 5. Selye, J. (1950): The Physiology and Pathology of Exposure to Stress. Acta Inc. Montreal. — 6. Smith, C. (1956): Studies on Thymus of the Mammal IX. Histochemical Study of Irradiated Mouse Thymus. Proc. soc. exp. biol. N. Y. *93*, 310—314. — 7. Smith, C.—Wharton, T. J.—Gerhardt, A. M. (1958): Studies on the Thymus of the Mammal. XI. Histochemical Studies of Thymus, Spleen and Lymphnode in Normal and Irradiated Mice. Anat. Rec. *131*, 369—387. — 8. Tesseraux, H. (1953): Physiologie des Thymus. Zwanglose Abhandlungen aus dem Inneren Sekretion. Bd. 9. Barth, Leipzig. — 9. Törő, I.—Aros, B. (1958): Die Gewebsreaktion des Thymus auf verschiedene Einwirkungen. Acta morph. hung. *8*, 151—171. — 10. Tschassownikow, N. (1929): Über die in vitro Züchtung von röntgenisiertem Thymus. Arch. exp. Zellforsch. *8*, 189—236. — 11. Worms, G., Klotz, H. P. (1935): Le Thymus. Masson, Paris.

ПОВЕДЕНИЕ ГАССАЛЕВСКИХ ТЕЛЕЦ ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ РЕНТГЕНОВЫМИ ЛУЧАМИ

И. ПАЛЬИ и Э. КАПА

Зобная железа 7 дневной морской свинки была местно облучена рентгеновскими лучами количеством 100—1000 r. В облученных зобных железах наблюдалось характерное и значительное размножение и увеличение гассалевских телец. Тканевые культуры облученных зобных желез показали — в противоположность контролям — характерное и быстрое разрастание эпителия. Между постепенно исчезающими из высаженного куска Гассаллевскими тельцами и появляющемся в зоне роста разрастанием эпителия авторы полагают взаимосвязь. Следовательно, появление Гассаллевских телец после облучения авторы рассматривают как реакцию на действие облучения, и эти тельца выражают функциональное состояние эпителия зобной железы.

BEHAVIOUR OF HASSALL'S CORPUSCLES AFTER X-RAY IRRADIATION

I. PÁLYI and E. KAPA

X-ray irradiation of the thymus of 7-day old guinea pigs with 100 to 1000 r was followed by a considerable increase in the size and number of Hassall's corpuscles. In contrast with the controls, the tissue cultures of irradiated thymus revealed characteristic and rapid epithelial proliferation. A correlation was assumed to exist between the gradual disappearance of Hassall's corpuscles from the explanted mother piece and the appearance of epithelial growth in the growth zone. The appearance of Hassall's corpuscles after irradiation is therefore regarded as a reaction to the effect of X-rays, expressing the functional state of thymic epithelium.

Dr. Irén Pályi
Eszter Kapa
Budapest IX. Tűzoltó u. 58. Ungarn

Morphological Department, Institute of Experimental Medicine of the Hungarian Academy of Sciences (Head: Prof. I. TÖRŐ) and Department of Histology and Embryology (Director: Prof. I. TÖRŐ), University Medical School, Budapest

CONTRIBUTIONS TO THE MECHANISM OF SPERMATOGENESIS, ON THE BASIS OF STUDIES OF THE ACID-FAST STAINING, SUCCINIC DEHYDROGENASE ACTIVITY AND HISTOCHEMICAL EXAMINATION OF LIPIDS

Z. PÓSALAKY, ANGELA GYÉVAI and B. BUKULYA

(Received June 6, 1960)

Research into the mechanism of spermatogenesis may be considered to have begun with V. EBNER's (1871) classical studies in rats. Since then, the rat has been the main object in the studies concerned with spermatogenesis, apparently due to the fact that it is in that animal that can best be observed the complicated processes taking place one after the other or simultaneously in the germinal epithelium of the seminiferous tubules. In most mammals the fundamental processes of spermatogenesis are identical and thus the results obtained for rats may be applied to a wide variety of species, with minor restrictions.

The process of spermatogenesis is known now in considerable detail, especially from the histochemical and electronmicroscopic studies of the past few years (LEBLOND and CLERMONT, 1952*a*, CLERMONT and LEBLOND, 1955, DAOUST and CLERMONT, 1955, HANSON et. al., 1952, KAYE, 1957, SOTELO et. al., 1958, BURGOS, 1955, YASUZUMI et. al., 1956, 1958). However, little is known about the mechanism, about the enzymes involved in the process. In some of our more recent studies we have shown that in the course of spermiogenesis, when the spermids are transformed into spermatozoa, an acid-fast component appears in the head and is in a close relationship to the morphological maturation of that past of the spermatozoon (PÓSALAKY and TÖRŐ, 1957, 1958, 1959). The present studies were intended to gain a deeper insight into the mechanism of this phenomenon. We have assumed spermatogenesis to be a high-energy process and as such, its indicator may be the activity of the enzyme dehydrogenase. We have therefore studied the behaviour of succinic dehydrogenase in the course of spermatogenesis.

Methods

Sexually mature Wistar rats weighing about 180 g each were killed by decapitation, the testes were removed, frozen and cut up into sections 10 and 20 μ thick in a cryostate of the Linde type. The sections were dried at room temperature for about 1,5 minutes, incubated without fixation in a neotetrazolium solution (BARKA, 1959), for from 30 minutes to 4 hours.

A period of 2 hours was found the most suitable. Some sections were stained with methyl green. The control sections were incubated for 2 hours in a solution containing 3 mg/ml malonic acid.

The method of acid-fast staining has been described earlier (PÓSALAKY and TÖRŐ, 1957), it consisted in staining with crystal violet, differentiating in acetic acid, then alcohol, and finally staining with Bismarck brown.

Lipids were studied by the acid haematein method of Baker (PEARSE, 1954).

Results

The results will be described according to the stages of spermatogenesis, as determined on the basis of the evidence published by v. EBNER (1871, 1888), CURTIS (1918), ROSEN-RUNGE (1950, 1955), LEBLOND and CLERMONT (1952a, 1955) and observed by us.

Stage 1. Spermatozoa are not visible in, or are just disappearing from, the tubular lumen. Granules, the so-called "residual bodies" of REGAUD (1901) are visible on the surface. The spermids are located usually in 3 to 4 layers: they are round cells with pale, round nuclei. Under them there are usually two layers of spermatocytes: the upper layer is older, and the nuclei are in the meiotic prophase (pachytene). The lower layer on the basal membrane, between the spermatogonia is either in the "resting" phase, with fine, granular nucleus, or has begun the meiotic prophase (leptotene), with the nuclei more intensely staining. Spermatogonia are few, and their nuclei are pale and contain chromatin in the form of dust-like particles (type "A").

In this stage dehydrogenase activity is the strongest in the basal membrane. Spots sometimes as big as half a nucleus indicate activity around the nuclei of the younger layer of spermatocytes. The layer of spermids shows clusters of activity, apparently in the cytoplasm. The cytoplasm of the older primary spermatocytes exhibits a fine, granular, pale reaction.

There is no acid-fast staining in this stage.

The results of the lipid reaction will be described with stage 3.

Stage 2. The nuclei of the spermids have become elongated and are grouped in bundles, forming 3 to 4 layers on one side of the cell. The two layers of spermatocytes are present, both in the meiotic prophase (the upper in pachytene, the lower in leptotene). The number of spermatogonia is somewhat larger, the nuclei are still "dust-like" (type "A").

Dehydrogenase activity continues to increase along the basal membrane, while no major change is noticeable in the rest of the preparation *(Fig. 1, Fig. 7)*.

There is no acid-fast staining in this stage.

The results of the lipid reaction will be described with stage 3.

Stage 3. The nuclei of the spermids are more elongated and the longitudinal, bundle-like pattern has fully developed. The nuclei stain more intensely

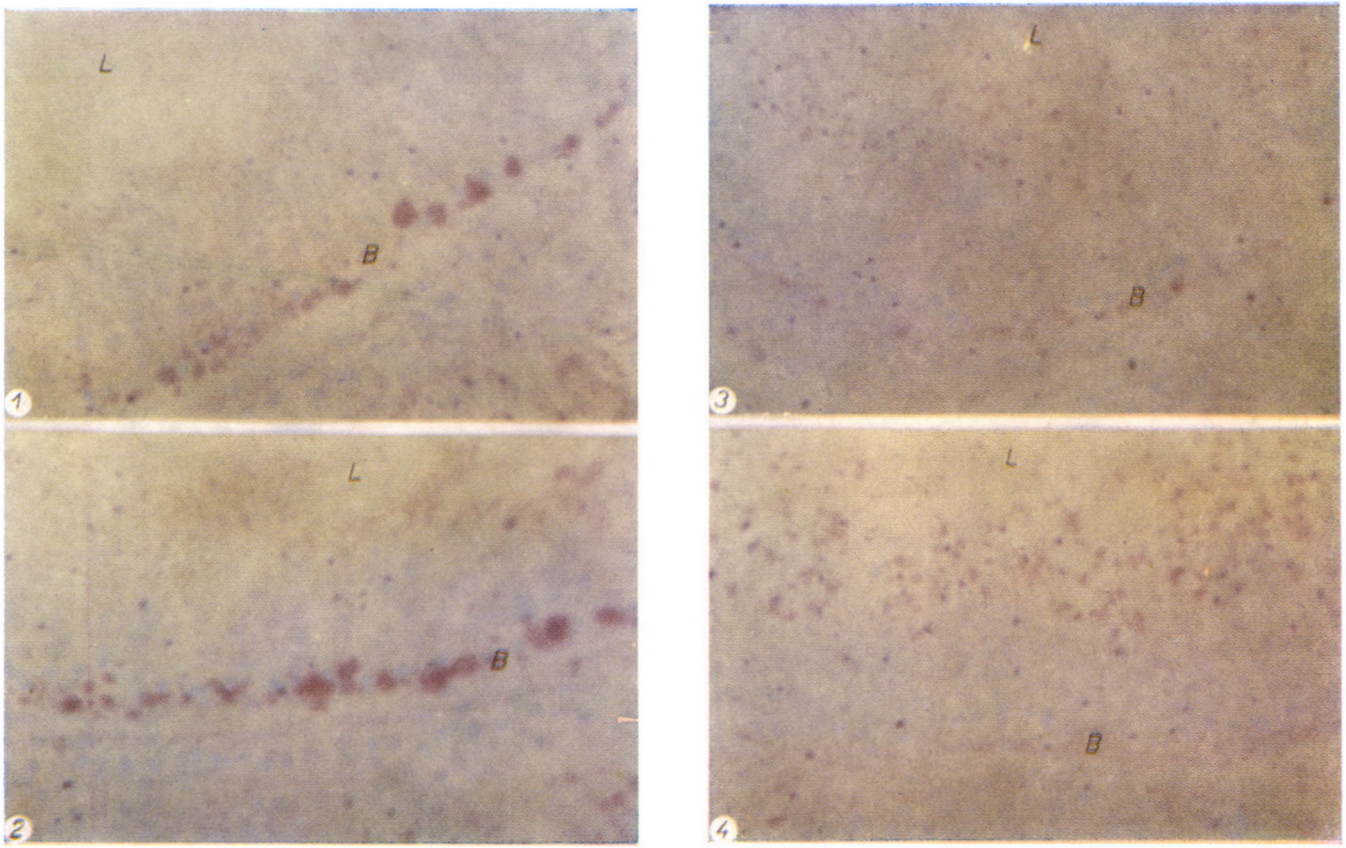


Fig. 1 to 4. Seminiferous tubule. Succinic dehydrogenase reaction, methyl green contrast staining. Cryostate sections
Fig 1 = Stage 2 Fig 3 = Stage 4
Fig 2 = Stage 3 Fig 4 = Stage 6.
B = basal part of tubule. L = luminar part of tubule

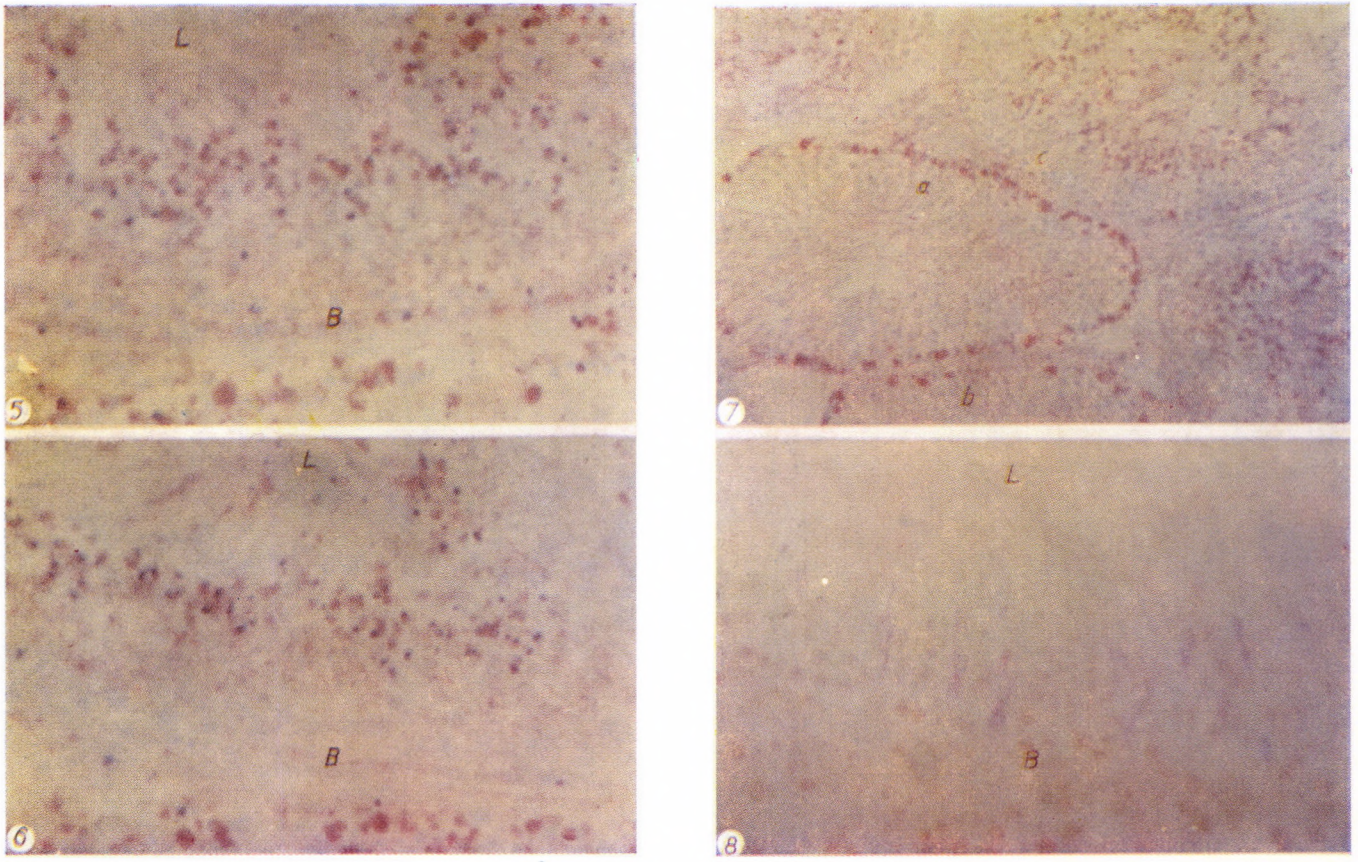


Fig. 5 to 7. Seminiferous tubule. Succinic dehydrogenase reaction, methyl green contrast staining. Cryostate sections
Fig. 5 = Stage 7 Fig. 7 = *a)* Stage 2
Fig. 6 = Stage 8 *b)* Stage 4
c) Stage 7

Fig. 8. Seminiferous tubule. Fixation in Carnoy, embedding in paraffine, crystal violet — Bismarck brown acid-fast staining. Acid-fast staining of the head of the spermatozoon is visible

than in stage 2. Among the spermatocytes in the meiotic prophase those nearer the lumen (the older generation) are in the diplotene or eventually the diakinetic phase, while the younger generation is in the strongly staining zygotene phase. The spermatogonia of type "A" occur in about the same numbers as in stage 2.

The dehydrogenase reaction along the basal membrane appears in the form of big, confluent structures, so-to-say embracing the nuclei of the young spermatocytes. In and around the spermids it appears in the form of clusters while a weaker reaction showing a pattern of fine granules is visible in the older spermatocytes *(Fig. 2)*.

There is no acid-fast staining.

In the first 3 stages the lipid reaction is very strong along the basal membrane, where the younger layer of spermatocytes is to be found *(Fig. 10)*. There it forms structures reaching sometimes the size of the nuclei. In the luminar areas microgranular reaction is visible, located apparently to the cytoplasm of transforming spermids.

Stage 4. The spermids have already assumed the head-shape characteristic of spermatozoa. Early in this stage the nucleus is reduced to about $^2/_3$ of its former size and stains more intensely. The spermid-Sertoli cell complexes are clearly visible and the spermids begin to migrate toward the basal part of the tubule. Both division of the spermatocytes take place in this stage. The younger layer of the primary spermatocytes, nearer the base, is in the meiotic prophase (zygotene, or pachytene), while the older generation shows division resulting in secondary spermatocytes. The secondary spermatocytes are smaller than the primary ones, have round reticular nuclei containing round chromatin granules. The number and shape of spermatogonia are similar to those in the former stages.

The dehydrogenase reaction along the basal membrane appears in the form of a few dispersed large clusters, while the cytoplasm of the spermatocytes shows a pale, granular reaction. Likewise, the new spermids exhibit small, pale granular reaction. Around the transforming spermatozoa the reaction is more intense *(Fig. 3, Fig. 7)*.

By the end of this stage the spermatozoal head begins to show a pale acid-fast staining (*Fig. 9*).

The lipid reaction appears in the form of clusters along the base; in the lumen the granules of finer distribution are larger and stain more intensely than in the earlier stages. The reaction is almost negative in the layer of spermatocytes *(Fig. 11)*.

Stage 5. The developing spermatozoa penetrate in bundles corresponding to the cells of Sertoli toward the basal part of the tubule and reach in this stage about the half thickness of the germinal epithelium. Among them there are 3 or 4 layers of newly formed spermids, with pale, lightly staining cyst-like

nuclei. Under them the layer of the growing primary spermatocytes is visible, in the meiotic prophase (pachytene). In this stage the spermatogonia are dividing and a different type of cell, with oval nuclei parallel with the base is formed (type "B").

In the basal area the dehydrogenase reaction is seen in the form of occasional, large clusters, apparently localized to the cells of Sertoli, though this could not be reliably ascertained. The spermatocytes and spermids show

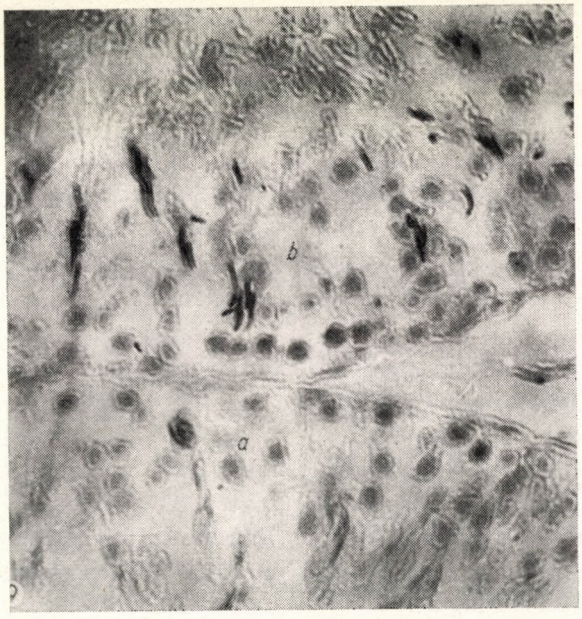


Fig. 9. Two seminiferous tubule sections, fixed in Carnoy, embedded in paraffine, crystal violet-Bismarck brown acid-fast staining. *a)* Stage 4, some of the spermatozoon heads beginning to show acid-fast staining. *b)* Stage 5, marked acid-fast staining of every spermatozoon head

the same pale, fine granular reaction. The reaction is stronger around the spermatozoa undergoing transformation.

In this stage the whole of the head has become acid-fast, especially in the spermatozoa which have penetrated deeper into the cells of Sertoli *(Fig. 8, Fig. 9)*.

The results of the lipid reaction are presented with stage 8.

Stage 6. The developing spermatozoa penetrate in bundles the cells of Sertoli, reaching their nuclei and after passing through the germinal epithelium appear in the spermatogonium layer. Like in the former stage, there are

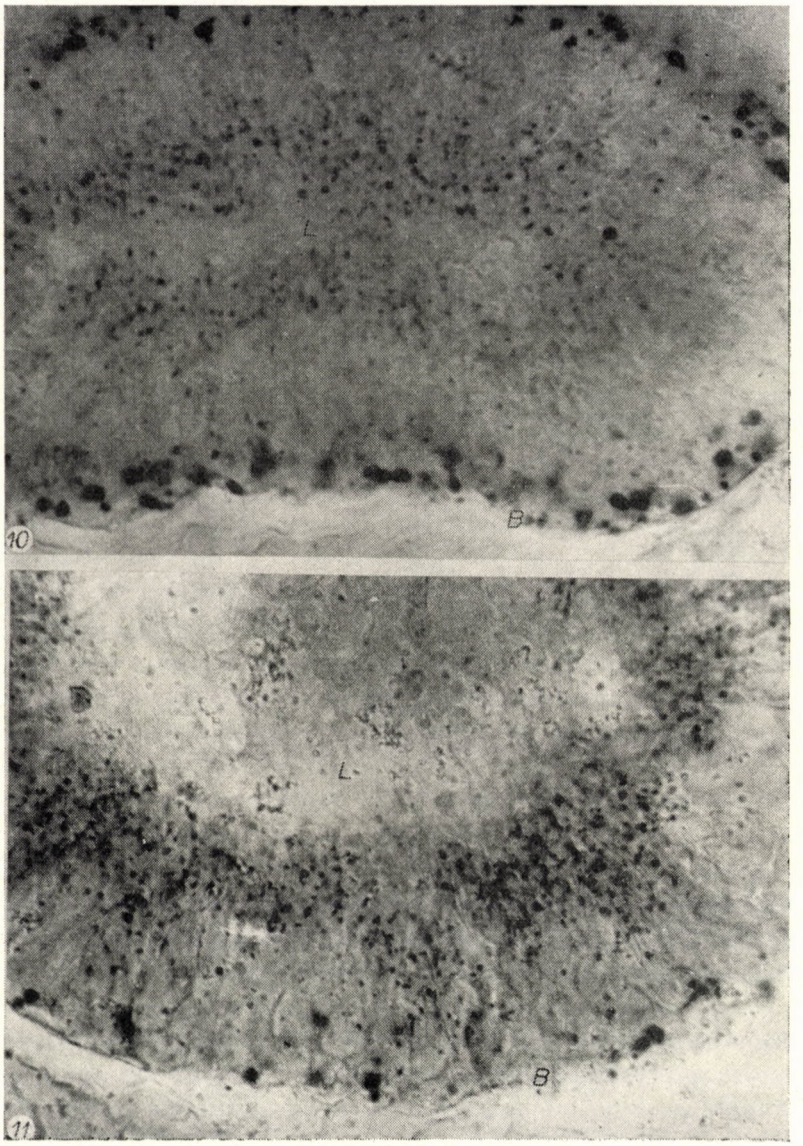


Fig. 10. Cross section of seminiferous tubule. Baker's lipid reaction. Stage 2

Fig. 11. Seminiferous tubule. Baker's lipid reaction. Stage 4

3 or 4 layers of spermids. There is no change in the primary spermatocytes. The spermatogonia are dividing and develop into the type B form.

In this stage the dehydrogenase reaction does not appear any longer in the form of large clusters near the basal part of the tubule. In some areas

a circular reaction in the form of intense by staining but small granules is visible around the nuclei of the cells of Sertoli. The same appears in a few spermatogonia, in the form of pale granules in the spermatocytes, and as rougher, but even smaller granules in the spermids. Larger spots of activity of irregular shape are seen near the cytoplasm of the developing spermatozoa, on the surface of the germinal epithelium *(Fig. 4)*.

The head of the spermatozoon shows a definitely acid-fast staining.

The results of the lipid reaction are presented with stage 8.

Stage 7. The developing *spermatozoa* have withdrawn from the inside of the cells of Sertoli and are to be found in the inner one-third of the germinal epithelium. The luminar layers of the epithelium are formed by 3 to 4 layers of young spermids. The primary spermatocytes have increased in size, but continue to be in the prophase (pachytene). The type B spermatogonia are dividing and form a new, low layer of the primary spermatocytes, that can be found among the fewer type A spermatogonia, with rougher chromatin clustered onto the nuclear membrane. These are called resting, non-dividing spermatocytes. Their nuclei are similar to those of the type B spermatogonia, only smaller.

An increase of dehydrogenase activity is visible corresponding to the layer of newly formed spermatocytes, in the form of small granules in the cytoplasm of these cells and in an occasional cell of Sertoli. The older spermatocytes exhibit pale, granular reaction and the spermids show more intense, cluster-shaped activity. In the detached cytoplasmic parts of the spermatozoa moving toward the lumen strong activity is visible in the form of clusters. In the middle piece of the spermatozoa enzyme activity appears in the form of small granules, corresponding to the distribution of mitochondria *(Fig. 5, Fig. 7)*.

The head of the spermatozoa shows definitely acid-fast staining.

The results of the lipid reaction are presented with stage 8.

Stage 8. The newly formed spermatozoa are grouped in regular rows on the luminar surface of the germinal epithelium and have completely lost the excess cytoplasm. In the row of the heads there are several granules of irregular shape (the "residual bodies" of Regaud). By the end of this stage the spermatozoa detach themselves from the germinal epithelium and disappear in the tubular lumen. The upper, older generation of the primary spermatocytes is in the prophase (pachytene). Under them on the basal membrane are the younger, resting spermatocytes, which have increased in size and show now a finer distribution of chromatin. There are few spermatogonia (which are of the A type).

Dehydrogenase activity is very strong in the large granules of irregular shape that can be found between the spermatozoa and that apparently correspond to detached excess cytoplasm. In the middle piece of spermatozoa protruding into the lumen there are regular rows of reaction in the mito-

chondria. Likewise, large granules of strong activity are visible immediately above the basal membrane, especially in young spermatocytes. This reaction increases in intensity with the disappearance of spermatozoa and appears in the form of confluent large granules by the end of this stage. Fine granular activity of even distribution appears around the prophasic nucleus of older spermatocytes. In the layer of spermids the reaction is intense and takes the form of larger granules *(Fig. 6)*.

The head of the spermatozoa shows marked acid-fast staining.

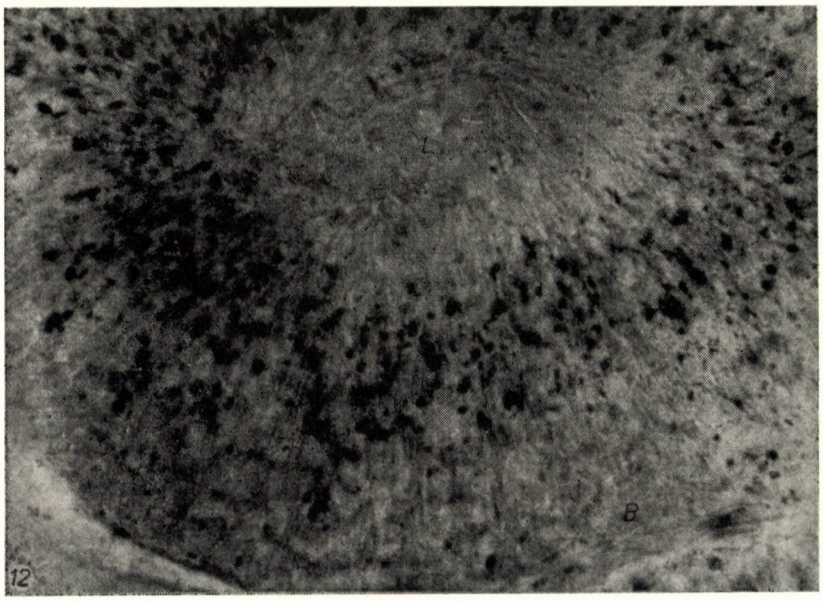


Fig. 12. Seminiferous tubule. Baker's lipid reaction. Stage 7

The lipid reaction disappears almost completely in stages 5 and 6 from the basal part of the germinal epithelium, but at the same time it becomes more intense in the luminar area, along the bundles of spermatozoa penetrating into the epithelium. The latter is especially marked in stage 6. In stages 7 and 8 the reaction tends to appear in the form of large granules chiefly in the luminar area, corresponding to the row of spermatozoon heads, while in the rest of the epithelium there are only a few granules. In a few tubules, along the basal membrane and apparently in the newly formed spermatocytes, the granular form of the reaction is intensified in stages 7 and 8 *(Fig. 12)*.

In the control sections treated with malonic acid, succinic dehydrogenase activity is absent.

Discussion

Research into the process of spermatogenesis dates back to the earliest phase of histology. As early as 1841—1854 KÖLLIKER showed active cells in the wall of the seminiferous tubule. SERTOLI described the cells named after him in 1865. In 1866 HENLE differentiated the two types of cell in the tubule, emphasizing the difficulties of studying the cytogenesis of spermatozoa. The eight distinct stages in the spermatogenesis of the rat were described in 1871 by v. EBNER. The various stages of development can be found side by side in the seminiferous tubule and therefore the cross sections of the tubules show the different stages of development. Measurement of the length of one stage in the tubule showed that it averaged 32 mm (v. EBNER, 1888). This development by stages in the rat and other animal species has been observed by several authors (BENDA, 1887, FÜRST, 1887, v. EBNER, 1888, HERMANN, 1889, MOORE, 1893, LENHOSSÉK, 1898, REGAUD, 1900, 1901, v. EBNER, 1902, CURTIS, 1918, BINDER, 1927). ROOSEN-RUNGE (1950) reinvestigated the genesis of spermatozoa and its division into eight stages, with the purpose of using it in quantitative studies of testicular function. According to him the first stage begins with the transformation of spermid nuclei and the eighth stage ends with the disappearance of the mature spermatozoa; the single stages are judged on the basis of the histologic pattern, taking into account the single forms of development of spermatozoa and the meiotic division. LEBLOND and CLERMONT (1952) introduced a new classification. They studied the PAS reaction of the acrosome system and divided spermatogenesis almost exclusively on the basis of the transformation of spermids into spermatozoa. The beginning is marked by the appearance of the PAS-positive granule in the Golgi substance of the spermid and the end with the development of new spermids. They divided the period between these two events into 14 stages, characterizing each stage with one form of acrosome development. This method undoubtedly makes it possible accurately to define the phases of spermatogenesis and thus helps to understand not only the development of the acrosome, but also the events in spermatogenesis. The method, however, has the disadvantage that special fixation (HELLY) and embedding are required and even then a proper judgement of the slight differences between the single stages is rather difficult. The advantages of the two methods have been united by ROOSEN-RUNGE (1955), introducing the PAS reaction for the determination of stages 5 and 6.

We did not use the method of LEBLOND and CLERMONT (1952), because in the cryostate sections the development of the acrosome could not be followed by means of the PAS reaction, obviously because of the destructive action of ice crystals during freezing (NEUMANN, 1958). We therefore used the Roosen-Runge method based on the principles laid down by v. EBNER (1871), taking into account also the evidence published by other authors (CURTIS 1918,

LEBLOND and CLERMONT 1952, CLERMONT and LEBLOND 1955, DAOUST and CLERMONT 1955, ROOSEN-RUNGE 1955). Our results indicate that the single stages of spermatogenesis may readily be distinguished by taking into account the condition of every layer of the germinal epithelium, in the cryostate sections, with the succinic dehydrogenase reaction (with methyl green contrast staining) and the acid-fast staining alike.

In previous investigations we studied in detail the acid-fast staining of the spermatozoon head (PÓSALAKY and TÖRŐ 1957, 1958, 1959), pointing out that it seems to develop in the course of spermatogenesis, presumably in connection with the synbiosis with the cells of Sertoli. This has been proved by the present results. The acid-fast staining appears in the form of a pale reaction by the end of stage 4 *(Fig. 9)*, while in stage 5 it takes its stronger, final form *(Fig. 8, Fig. 9)*. In stage 4 the bundles of spermatozoa begin to penetrate toward the base of the cells of Sertoli and this process continues in stages 5 and 6. It is in the latter phase that the processes required for the morphological maturation take place. One sign of this is the acid-fast staining of the head and as it appears in stage 5 (in stage 4 the acid-fast staining is still vague), this stage may be considered to be the most important one in the head's differentiation. We are unable to put forward an ultimate explanation of the development of the acid-fast staining; its relationship with the testicular lipids (TÖRŐ, PÓSALAKY 1958) and with the structural changes in the nucleic acid and other substances of the head (PÓSALAKY, TÖRŐ 1959; TÖRŐ, PÓSALAKY 1959) had been discussed in previous papers.

There are several reasons why we know so little about the mechanism of spermatogenesis. One of them is that in the testis various tissues occur side-by-side and interwoven, and the processes take place so close to one another that they can be examined almost exclusively by histochemical methods, being hardly accessible for biochemical tests. This explains why so much is known about the composition of the semen and about the metabolism of the spermatozoa in it (MANN 1954) and why evidence is lacking as to the metabolic processes involved in spermatogenesis. A sequence of events, such as spermatogenesis, in which cells divide, migrate, then become transformed, requires a great amount of energy and the function of every enzyme system involved in its creation. However, the known enzyme histochemical methods do not suffice to study the question in all its details. Of the energy-producing processes in the cell, oxidation is the most significant. Succinic dehydrogenase, one of the enzymes of the Szent-Györgyi—Krebs cycle, can be studied by more or less reliable histochemical techniques. The other enzymes of the cycle are not directly amenable to histochemical study, because they are taking place in the soluble phase of the cell. For the demonstration of succinic dehydrogenase the methods based on the reduction of tetrazolium salts are the most suitable. The valuable properties of the tetrazolium salts had been pointed

out by KUHN and JERCHEL (1941) and were discussed in detail by REMMELE (1958). KUN and ABOOD (1949) were the first to use tetrazolium salt for the demonstration of succinic dehydrogenase in tissue homogenates. Blue tetrazolium was introduced into histochemical studies by SELIGMAN and RUTHENBURG (1951). Later, some authors (PADYKULA, 1952, ROSA and VELARDO, 1954) preferred neotetrazolium. These salts take over electrons from the enzyme after it has dehydrogenated succinate, and are reduced to an insoluble formazan dye. But both tetrazolium salts have the disadvantage that the formazan formed is thick, often needle-shaped, crystal-like, highly lipid-soluble and appears in the sections in two colours, red and blue. It is generally accepted that the colour depends on the intensity of the reaction and the red is the monoformazan and the blue is the diformazan. Recently, the use of both blue tetrazolium and neotetrazolium has been attacked by several authors, because of the lipid-solubility and the presence of the two kinds of formazan. According to BURTNER et al. (1957) blue formazan and red formazan (mono- and diformazan) resulting from the reduction of neotetrazolium would originate from different tetrazoliums, thus they would not be products depending on the intensity of the reaction and appearing one after the other. FARBER, STERNBERG, DUNLAP (1956) kept sections in formazan and found that monoformazan was non-specifically deposited from the solution into the section, while the diformazan was not. However, it was also found that in the area of enzyme activity first a red, then a blue colour develops when incubation is continued. These results make it doubtful whether these substances are actually suitable for the demonstration and quantitative study of succinic dehydrogenase activity at the cytochemical level.

We, too, used neotetrazolium and the problems outlined above are therefore to be taken into account in our work as well. It is first of all the lipid content of the testis that interferes with evaluation. The tests *(Figs. 10, 11* and *12)* have shown the lipid content to be considerable and changing in the course of spermatogenesis. The pictures showing the changes in the lipid content of the basal and luminar parts of the seminiferous tubule are extremely similar to those obtained by studying succinic dehydrogenase activity by the use of neotetrazolium *(Figs. 1* to *7)*.

Taking into consideration the data in the literature (BURTNER 1957, FARBER et al. 1956, NACHLASS 1957, PEARSE 1957, 1958), it might be suggested that what we deal with is a non-specific dissolution of monoformazan in lipids and thus it cannot be brought into correlation with enzyme activity. The negative results obtained following inhibition with malonic acid absolutely contradict this suggestion, indicating that the staining obtained was a result of enzyme activity, as the lipid reaction is unchanged after treatment with malonic acid. Malonic acid being a competitive inhibitor of enzyme activity, a negative reaction proves also that the lipids in the testis could not by them-

selves reduce the neotetrazolium even to monoformazan. Had this taken place, it would have been dissolved in the lipids and staining would have resulted even after inhibition with malonic acid. It had therefore to be concluded that formazan formation resulted from enzyme activity, but the monoformazan part of it was dissolved in the cellular lipids. In some areas diffuse staining occurred over practically the entire cytoplasm, so that an exact location of the reaction within the cell could not be determined and quantitative conclusions must be drawn with caution.

According to our results, during spermatogenesis enzyme activity changes in the following way. The spermatogonia show no appreciable activity. The spermatocytes arising after their division exhibit in the resting and growing phases (stages 7 and 8, *Fig. 5*, *Fig. 6)* increasing activity. The intensity of the reaction continues to increase in the early meiotic prophase of these young spermatocytes (stages 1, 2, 3 and in part 4, *Figs. 1, 2, 3)*. Owing to the high lipid content of the cells the staining is diffuse. Late in the meiotic prophase the intensity of the reaction decreases above the basal membrane, in the so-called older spermatocytes near the lumen and is seen in the form of evenly distributed pale granules (stages 5, 6, 7, 8, 1, 2, 3, *Figs. 4, 5, 6, 1, 2)*. The same pattern is exhibited following meiotic division by the young spermids (in part stages 4 and 5, *Figs. 3* and *7)*. This corresponds to the period called the Golgi phase by LEBLOND and CLERMONT (1952*a*), when the acrosoma granule develops. Subsequently the reaction of the spermids becomes somewhat more intensive and this form of the reaction is visible until the so-called maturation phase of transformation to spermatozoon (*i. e.* during the "cap" and "acrosome" phases; LEBLOND and CLERMONT 1952*a*; stages 6, 7, 8, 1, 2, 3; *Figs. 4, 5, 6, 1, 2)*. During the maturation phase (stages 4 to 8, *Figs. 3, 4, 5, 6)* the reaction continues to increase rapidly in intensity together with the lipid reaction and is seen in the form of large confluent clusters. The detaching cytoplasmic parts are also giving the reaction (stages 7 and 8, *Figs. 5* and *6)*, but this ceases when the spermatozoa have disappeared into the lumen. Almost simultaneously with the detachment of excess cytoplasm (approximately in stage 7, *Fig. 7)* the fine granular form of the reaction appears in the mitochondria of the middle-piece of the spermatozoa. The Sertoli cells show marked reaction in stages 5 and 6, and sometimes in stage 7 as well, when the spermatozoa are burying themselves in the cytoplasm of the Sertoli cells.

As an important enzyme of the Szent-Györgyi—Krebs cycle, succinic dehydrogenase plays a significant role in the oxidation of several metabolites. It has close connections with the cytochrome system, with the terminal oxidation responsible for the production of high-energy phosphate compounds, thus its activity may be considered to be proportionate to oxygen consumption. No activity, or a low activity suggests that in that area the Szent-Györgyi—Krebs cycle functions poorly or not at all. A high activity permits one to

assume that the cycle plays an important role in the metabolism of the cells of that region. The activity of the enzyme may on this way reflect the state of function and metabolism in tissues. The cycle is mitochondrium-bound, though it has been suggested (NOVIKOFF, 1957) that some of its enzymes may take place also in the soluble fractions.

The activity of the Szent-Györgyi—Krebs cycle may be found in virtually every stage of spermatogenesis, though it varies in intensity and is in general less marked than in other organs, for example in the kidney. Two phases are outstanding with their marked activity. One is the layer of young spermatocytes, in the resting and early prophase, the other is the maturing phase of spermatozoa. Both are important in spermatogenesis. The first is the condition preparing for meiotic division, the other is the final step in spermatozoon maturation, as a sign of which the acid-fast staining of the head appears. The undisturbed course of these two phases seems to require very lively metabolic activity. Later in the meiotic phase and during divisions the low, almost negative reaction is in agreement with the observation that during mitosis succinic dehydrogenase activity is considerably lower than in the interphase (OGAWA and ZIMMERMAN, 1959). The increasing intensity of the reaction observed in the spermids during transformation obviously reflects the high-energy requirement of the metabolic process involved.

The importance of the stages with increased activity is shown also by the increased lipid metabolism. The precise chemical composition of the lipids in question is not known. Our histochemical data suggest the presence of phosphatide-containing lipids, but this requires further confirmation. SCOTT (1952) claimed that the testicular lipids may eventually have certain ties with hormonal activity. We, too, think that the said lipid reaction is an expression not of an increase in ballast lipids, but of an increase associated with certain functional activity, such as that observable in the adrenals. Just as the adrenal lipid reactions are not specific for ketosteroids, and yet we interpret this battery of reactions as a certain reflection of function, we may also in the case of the testis accept the lipid reaction as a more or less reliable indicator of functional activity. This is the more justified since in the adrenals, too, the lipid reaction presents itself together with a strong succinic dehydrogenase activity.

As already mentioned, owing to the dissolution of formazan the intracellular site of enzyme activity cannot be precisely located in the areas showing strong lipid activity. In recent years attempts have been made to produce substrates superior to neotetrazolium; promising results have been obtained with nitro blue tetrazolium (NACHLASS, 1957) and MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-*diphenyl* tetrazolium bromide (MTT)] (PEARSE, 1957). In these compounds the lipid-solubility of formazan was eliminated and this localization improved in the lipid-rich areas. However, dissolution of nitro blue tetra-

zolium formazan has been described to occur in the adrenals (PEARSE, 1957) and it is likely that this occurs also in the testis. NACHLASS does not mention it (1957), though he studied the testis and described it to show slight activity. Likewise, BRUNO and GERMINO (1958) mention the testis just briefly, as an organ not showing major activity with neotetrazolium. As they did not study the changes in enzyme activity during the various stages, no conclusions may be drawn from their studies as to the process of spermatogenesis.

At any rate, the MTT method of PEARSE (1957) seems to hold some promise of being suitable for use in studying the dehydrogenase activity during spermatogenesis.

Summary

Changes in acid-fast staining, lipid content and succinic dehydrogenase activity have been studied in the course of spermatogenesis. The development of spermatozoa has been divided into 8 stages. The acid-fast staining of the head becomes marked in stage 5 and at the same time changes occur in succinic dehydrogenase activity and the lipid reaction of the germinal epithelium. During spermatogenesis enzyme activity is more marked in the young spermatocytes and in the maturing spermatozoa, indicating an increased metabolic activity during these phases. According to the evidence obtained the changes of the testicular lipids may to some extent be considered as an indicator of functional activity.

The methodological problems involved in the evaluation of succinic dehydrogenase activity are discussed.

REFERENCES

1. ARGYRIS, T. S. (1956): The Distribution of Succinic Dehydrogenase and Non-specific Esterase in Mouse Skin throughout the Hair Growth Cycle. Anat. Rec. *125*, 105. — 2. BAKER, J. R. cit. A. G. E. PEARSE (1954): Histochemistry. Churchill, London. — 3. BANGHAM, A. D., HANCOAK, I. L. (1955): A New Method for Counting Live and Dead Bull Spermatozoa. Nature (Lond.) *176*, 656. — 4. BARKA, T., DALLNER, G. (1958): The Reduction of Tetrazolium Salts by Ascites Tumor Cells in the Presence of Glucose. J. Histochem. Cytochem. *6*, 174—180. — 5. BARKA, T. (1959): in KOVÁCH, A. A kísérleti orvostudomány vizsgáló módszerei, Akadémiai Kiadó, Budapest, Vol. 5, 231—487. — 6. BARNETT, R. J., PALADE, G. E. (1957): Histochemical Demonstration of the Sites of Activity of Dehydrogenase Systems with the Electron Microscope. J. biophys. biochem. Cytol. *3*, 577—588. — 7. BENDA, C. (1887): Untersuchungen über den Bau des funktionierenden Samenkanälchens einiger Säugethiere und Folgerungen für die Spermatogenese dieser Wirbelthierklasse. Arch. mikr. Anat. *30*, 49—110. — 8. BINDER, S. (1927): Spermatogenese von Macropus giganteus mit Berücksichtigung einiger allgemeiner Fragen der Säugerspermatogenese. Z. Zellforsch. *5*, 293—346. — 9. BRUNO, W., GERMINO, N. I. (1958): Distribution of Succinic Dehydrogenase in the Organs of the Adult Rat. Acta Anat. (Basel) *33*, 161—174. — 10. BURGOS, M. H., FAWCETT, D. W. (1955): Studies on the Fine Structure of the Mammalian Testis. I. Differentiation of the Spermatids in the Cat. J. Biophys. biochem. Cytol. *1*, 287—300. — 11. BUTNER, H. I., BAHN, R. C., LONGLEY, J. B. (1957): Observations on the Reduction and Quantitation on Neotetrazolium. J. Histochem. Citochem. *5*, 127—134. — 12. CLERMONT, Y., LEBLOND, C. P. (1955): Spermiogenesis of Man, Monkey, Rat and other Mammals as shown by the Periodic Acid-Schiff Technique. Amer. J. Anat. *96*, 229—253. — 13. CURTIS, G. M. (1918): The Morphology of the Mammalian Seminiferous Tubule. Amer. J. Anat. *24*, 339—394. — 14. DAOUST, R., CLERMONT, Y. (1955): Distribution of Nucleic Acids in Germ Cells during the Cycle of the Seminiferous Epithelium in the Rat. Amer. J. Anat. *96*, 255—283. — 15. EBNER, V. V. (1871): Untersuchungen über den Bau der Samenkanälchen und die Entwicklung der Spermatozoiden bei den Säugethieren und beim Menschen. Rollet's Untersuchungen aus dem Institut f. Physiol. u. Histol. in Graz. Engelmann, Leipzig, S. 200. — 16. EBNER, V. V. (1888): Zur Spermatogenese bei den Säugethieren. Arch. mikr. Anat. *31*, 236—292. — 17. EBNER, V. V. (1902): Die Geschlechtsorgane in A. Kölliker,

Handbuch der Gewebelehre des Menschen. Engelmann, Leipzig, VI/3. — 18. FARBER, E., STERNBERG, W. H., DUNLAP, CH. E. (1956): Histochemical Localisation of Specific Oxidative Enzymes. I. Tetrazolium Stains for Diphosphorpyridine Nucleotide Diaphorase and Triphosphopyridine Nucleotide Diaphorase. J. Histochem. Cytochem. *4*, 254—265. — 19. FARBER, E., STERNBERG, W. H., DUNLAP, CH. E. (1956): Histochemical Localisation of Specific Oxidative Enzymes. III. Evaluation Studies of Tetrazolium Staining Methods for Diphosphopyridine Nucleotide Diaphorase, Triphosphopyridine Nucleotide Diaphorase and the Succindehydrogenase System. J. Histochem. Cytochem. *4*, 284—294. — 20. FARBER, E., BUEDING, E. (1956): Histochemical Localisation of Succinic Dehydrogenase from Carriers by Lipase and the Specific Histochemical Localisation of the Dehydrogenase with Phenazine Methosulfate and Tetrazolium Salts. J. Histochem. Cytochem. *4*, 357—362. — 21. FARBER, E., LOUVIERE, C. D. (1956): Histochemical Localisation of Specific Oxidative Enzymes. IV. Soluble Oxidation-Reduction Dyes as Aids in the Histochemical Localisation of Oxidative Enzymes with Tetrazolium Salts. J. Histochem. Cytochem. *4*, 374—356. — 22. FÜRST, C. (1887): Über die Entwicklung der Samenkörperchen bei den Beutelthieren. Arch. mikr. Anat. *30*, 336. — 23. HANSON, J., RANDELL, J. T., BAYLEY, S. T. (1952): The Microstructure of the Spermatozoa of the Snail Viviparus. Exp. Cell Res. *3*, 65—78. — 24. HENLE, J. (1873): Handbuch der systematischen Anatomie des Menschen, Braunschweig. (cit. Curtis, 1918.) — 25. HERMAN, F. (1889): Beiträge zur Histologie des Hodens. Arch. mikr. Anat. *34*, 58—106. — 26. KAYE, J. S. (1957): Changes in the Fine Structure of Mitochondria During Spermatogenesis. J. Morph. *102*, 347—400. — 27. KÖLLIKER, A. (1841): Beiträge zur Kenntnis der Geschlechtsverhältnisse und der Samenflüssigkeit wirbelloser Tiere nebst einem Versuche über das Wesen und die Bedeutung der sogenannten Samentiere. Berlin. (cit. Curtis. 1918.) — 28. KÖLLIKER, A. (1847): Die Bildung der Samenfäden im Bläschen als allgemeines Entwicklungsgesetzt. Neue Denksch. der Schweizerischen Gesellschaft für die Naturwissenschaften. — 29. KÖLLIKER A. (1854): Manual of Human Anatomy, Translated by Busk and T. H. Huxley, Philadelphia (cit. Curtis 1918.) — 30. KUHN, R., JERCHEL, D. (1941): Über Invertseifen. VII. Mitt.: Tetrazolium Salze. Ber. dtsch. chem. Ges. *74*, 941—948. — 31. KUHN, R., JERCHEL, D. (1941): Über Invertseifen. VIII. Mitt.: Reduktion von Tetrazolium Salzen durch Bakterien, gärende Hefe, und keimende Samen. Ber. dtsch. chem Ges. *74*, 949—952. — 32. KUN, E., ABOOD, L. G. (1949): Colorimetric Estimation of Succinic Dehydrogenase by Triphenyltetrazolium Chloride. Science, *109*, 144—146. — 33. LEBLOND, C. P., CLERMONT, Y. (1952): Spermiogenesis of Rat Mouse, Hamster and Guinea Pig as revealed by the Periodic Acid-Fuchsin Sulfurous Acid Technique. Amer. J. Anat. *90*, 167—216. — 34. LENHOSSÉK, M. (1898): Untersuchungen über Spermatogenese. Arch. mikr. Anat. *51*, 215—318. — 35. MANN, T. (1954): The Biochemistry of Semen. Methuen. London. — 36. MOORE, J. E. S. (1893): Mammalian Spermatogenesis. Anat. Anz. *8*, 683—688. — 37. NACHLASS, M. M., TSOU K. C., DE SOUSA, E., CHANG S. S., SELIGMAN, A. M. (1957): Cytochemical Demonstration of Succinic Dehydrogenase by the Use of a New p-nitrophenyl Substituted Ditetrazole. J. Histochem. Cytochem. *5*, 420—436. — 38. NOVIKOFF, A. B., PODLER, E. (1957): The Contributions of Differential Centrifugation to the Intracellular Localisation of Enzymes. J. Histochem. Cytochem. *5*, 552—564. — 39. OGAWA, K., ZIMERMANN, A. M. (1959): The Activity of Succinic Dehydrogenase in the Experimental Ependymona of C_3H Mice. J. Histochem. Cytochem. *7*, 342—349. — 40. PADYKULA, H. A. (1952): The Localisation of Succinic Dehydrogenase in Tissue Sections of the Rat. Amer. J. Anat. *91*, 107—145. — 41. PEARSE, A. G. E. (1957): Intracellular Localisation of Dehydrogenase Systems using Monotetrazolium Salts and Metal Chelation of their Formazans. J. Histochem. Cytochem. *5*, 515—527. — 42. PEARSE, A. G. E. (1958): Extension of the Limits of Cellular Pathology: the Role of Enzyme Histochemistry. J. clin. Path. *11*, 520—534. — 43. PEARSON, B., DEFENDI, V. (1954): Histochemical Demonstration of Succinic Dehydrogenase in Thin Tissue Sections by means of 2-(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride under Aerobic Conditions. J. Histochem. Cytochem. *2*, 248—257. — 44. PEARSON, B., DEFENDI, V. (1955): Histocheminal Studies of Succinic Dehydrogenase by means of Tetrazolium in Rat Liver Tumors Induced by p-dimethylaminoazobenzene. Cancer Res. *15*, 593—596. — 45. PEARSON, B. (1958): Improvement in the Histochemical Localisation of Succinic Dehydrogenase by use of Nitroneotetrazolium Chloride. J. Histochem. Cytochem. *6*, 112—121. — 46. PÓSALAKY, Z. (1958): Spermiumok szerkezetének hisztokémiai vizsgálata. MTA. Orv. Oszt. Közl. (Budapest) *9*, 301—310. — 47. PÓSALAKY, Z., TÖRŐ, I. (1959): Investigations into the Fate of Intravenously Administered Spermatozoa, Based on their Acidfastness. Folia Biol. *5*, 243—250. — 48. PÓSALAKY, Z., TÖRŐ, I. (1957): Fate of Spermatozoa not Participating in the Fertilization Process. Nature (Lond.) 179, 150—151. — 49. PÓSALAKY, Z., TÖRŐ, I. (1957): Experimental Investigation into the Destiny of Spermatozoa not Participating in Fertilization. Acta Biol. Hung. *8*, 1—10. — 50. REGAUD, C. (1900): Direction hélicoidale du mouvement spermatogénetique dans les tubes seminifères

du rat. C. R. Soc. Biol. (Paris) (cit.: Curtis, 1918.) — 51. Regaud, C. (1901): Études sur la structure des tubes seminifères et sur la spermatogenèse chez les mammifères Arch. Anat. micr. *4*, 101—156, 231—380. — 52. Remmele, W. (1958): Tetrazoliumsalze und Zellfunktion. Frankfurt. Z. Path. *69*, 206—230. — 53. Roosen-Runge, E. C., Giesel, L. O. Jr. (1950): Quantitative Studies on Spermatogenesis in the Albino Rat. Amer. J. Anat. *47*, 1—30. — 54. Roosen-Runge, E. C. (1955): Quantitative Studies on Spermatogenesis in the Albino Rat. III. Volume Changes in the Cells of Seminiferous Tubules. Anat. Rec. *123*, 385—398. — 55. Rosa, C. I., Velardo, J. T. (1954): Histochemical Demonstration of Succinic Dehydrogenase Activity in Tissue Sections by a Modified Technique. J. Histochem. Cytochem. *2*, 110—114. — 56. Scott, W. W., Lynch, K. M. (1952): The Sertoli Cell. In Studies on Testis and Ovary Eggs and Sperm, Ed. E. T. Engle. Thomas, Springfield, Pp. 37—60. — 57. Seligman, A. M., Rutenburg, A. M. (1951): The Histochemical Demonstration of Succinic Dehydrogenase. Science *113*, 317—320. — 58. Sertoli, E. (1865): Morgagni 7, 31. (cit.: Bremer, 1948). — 59. Sotelo, J. R., Trujillo-Cenóz, O. (1958): Electron Microscope Study of the Kinetic Apparatus in Animal Sperm Cells. Z. Zellforsch. *48*, 565—601. — 60. Sternberg, W. A., Farber, E., Dunlap, Ch. E. (1956): Histochemical Localisation of Specific Oxidative Enzymes: II. Localisation of Diphosphopyridine Nucleotide and Triphosphopyridine Nucleotide Diaphorases and the Succindehydrogenase System in the Kidney. J. Histochem. Cytochem. *4*, 266—283. — 61. Törő, I., Pósalaky, Z. (1958): Beiträge zur Struktur des Spermiumkopfes. Verh. Anat. Ges. 55. Versammlung in Frankfurt Main, 9—13. April. Fischer, Jena. — 62. Törő, I., Pósalaky, Z. (1959): Histochemische Untersuchung der Spermiogenese, Acta Histochem. *8*, 393—405. — 63. Yasuzumi, G. (1956): Spermatogenesis in Animals as Revealed by Electronmicroscopy. I. Formation and Submicroscopic Structure of the Middle-Piece of the Albino Rat. J. biophys. biochem. Cytol. *2*, 445—450. — 64. Yasuzumi, G., Fujimura, W., Tanaka, A., Ishida, H., Masuda, T. (1956): Submicroscopic Structure of the Sperm-Head as Revealed by Electronmicroscopy. Folia anat. jap. B. *29*, 133—138. — 65. Yasuzumi, G., Fujimura, W., Ishida, H. (1958): Spermatogenesis in Animals as Revealed by Electronmicroscopy. Exp. Cell. Res. *14*, 268—285.

ДАННЫЕ К МЕХАНИЗМУ ПРОЦЕССА СПЕРМИОГЕНЕЗА, НА ОСНОВАНИИ ИССЛЕДОВАНИЯ КИСЛОТОУПОРНОГО ОКРАШИВАНИЯ, АКТИВНОСТИ СУКЦИНОДЕГИДРАЗЫ, КАК И ГИСТОХИМИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ЛИПИДОВ

З. ПОШАЛАКИ, А. ДЬЕВАИ и Б. БУКУЛЙА

Исследовались изменения кислотоупорного окрашивания а также активности сукцинодегидразы и липидов в процессе спермиогенеза. При исследованиях использовалось распределение развития живчиков на 8 стадий. Кислотоупорное окрашивание головок живчиков становится более выраженным в 5. стадии, и в связи с этим меняется также реакция сукцинодегидразы зародышевого эпителия и реакция липидов. В процессе спермиогенеза в молодых спермиоцитах и в фазе созревания живчиков наблюдается более значительная энзиматическая акивность, что указывает на повышенную активность обмена веществ в этих стадиях. Согласно исследованиям и изменение липидов семенников можно рассматривать как выражение определенной функциональной активности.

Обсуждаются связанные с оценкой дегидрогеназной активности сукцина методологические вопросы.

BEITRÄGE ZUM MECHANISMUS DER SPERMIOGENESE AUF GRUND DER SÄUREFESTEN FÄRBUNG, SOWIE DER SUCCINODEHYDROGENASEAKTIVITÄT UND DER HISTOCHEMISCHEN UNTERSUCHUNG DER LIPOIDEN

Z. PÓSALAKY, A. GYÉVAI und B. BUKULYA

Die im Laufe der Spermiogenese erfolgende Veränderungen der säurefesten Färbung, sowie der Aktivität der Lipoiden und der Succinodehydrogenase wurden untersucht. Die Untersuchungen erfolgten auf Grund der 8 Stadien der Spermienentwicklung. Die säurefeste Färbung des Spermiumkopfes wird im 5. Stadium signifikant, und im Zusammenhang damit

verändert sich auch die Succinodehydrogenase- und Lipoidreaktion des Keimepithels. Im Verlauf der Spermiogenese kann in den jungen Spermiozyten und in der Reifungsphase der Spermien eine bedeutendere Enzymaktivität wahrgenommen werden, was auf eine erhöhte Stoffwechselaktivität in diesen Phasen hinweist. Auf Grund der Befunde kann die Veränderung der Hodenlipoiden als der Ausdruck einer gewissen funktionellen Aktivität aufgefaßt werden.

Die mit der Auswertung der Succinodehydrogenaseaktivität verbundenen methodologischen Fragen werden besprochen.

Dr. Zoltán PÓSALAKY
Angéla GYÉVAI
Dr. Béla BUKULYA
Budapest IX. Tűzoltó u. 58. Hungary

Heiligenberg-Institut, Heiligenberg

FREIE LINSEN IN AUGENLOSEN KÖPFEN UND ISOLATEN VON TRITURUS ALPESTRIS

O. MANGOLD

(Eingegangen am 10. Juni 1960)

I. Einleitung

Nach den ersten experimentellen Versuchen von SPEMANN (1901—1912) über die Entwicklung des Wirbeltierauges ist die Determination der Linse zum klassischen Beispiel der Determination eines Organs in der Entwicklung der Wirbeltiere geworden. Es ist auch kaum zweifelhaft, dass die Ergebnisse, die bei der experimentellen Erforschung dieser Frage erzielt werden, allgemeine Bedeutung für das Determinationsproblem besitzen.

Während in vielen Versuchen die hervorragende Bedeutung der primären Augenblase für die Determination, die Differenzierung und das Wachstum der Linse sichergestellt wurde, ergab sich jedoch bald, dass Linsen auch ohne Augenbecher entstehen konnten. Dabei schienen manche Arten der Amphibien eine Augenbecher-abhängige Linsenentwicklung *(Rana sylvatica, Bufo, Pleurodeles waltlii, Triton taeniatus* und *Triton alpestris)*, andere eine Augenbecher-unabhängige Linsenentwicklung *(Rana esculenta)* aufzuweisen. Weitere Arten lagen zwischen den beiden Extremen, indem sie ohne Augenbecher nur Ectodermverdickungen und Lentoide differenzierten *(Bombinator pachypus, Rana palustris, Rana fusca, Amblystoma punctatum;* Lit. s. bei MANGOLD 1931*b*, S. 248—256).

Dieses reichlich komplizierte Bild wurde noch mehr verwirrt durch direkt einander widersprechende Ergebnisse, die bei jeweils derselben Art teils bei gleichen teils bei verschiedenen Versuchsanordnungen gewonnen wurden.

Eine gewisse Aufklärung brachte die Beobachtung von TWITTY (1928, 1955), dass bei der Determination der Linse die Temperatur, in der die Keime vor der Neurulation gehalten werden, eine Rolle spiele. Dies konnte für mehrere Arten experimentell bestätigt werden (z. B. TEN CATE bei *Rana esculenta* 1953, JACOBSON bei *Taricha torosa* = *Triturus torosus* 1958). — Einen weiteren Einblick in das Problem brachte die Vermutung bezw. Erkenntnis, dass die Linsen nicht nur vom Augenbecher, sondern auch von anderen Organanlagen bezw. Organen des Embryo determiniert werden können. Urdarmdach, Nasen, Gehörblasen und Gehirn schienen ebenfalls fähig, Linsen zu induzieren (Lit. s. MANGOLD 1931, S. 277, OKADA 1949*a*, *b*, HOLTFRETER 1951, S. 128, TWITTY 1955, JACOBSON 1958).

In dem vorliegenden Aufsatz werden Linsen und Lentoide geschildert, die wir im Lauf der Jahrzehnte bei *Triturus alpestris* in augenbecherlosen Köpfen oder Explantaten beobachten konnten. Da *Triturus alpestris* nach der Exstirpation der Retinaanlage im frühen Neurulastadium keine Linse entwickelt, bereitete das Auftreten von augenbecherfreien Linsen eine beträchtliche Überraschung. Von grossem Interesse war auch, dass diese Linsen häufig in enger Nachbarschaft mit Nasen, Haftfäden, Gehörblasen und Gehirnfragmenten auftraten. Sie wurden jedoch auch ohne diese gefunden.

Wir nennen, einem allgemeinen Brauch entsprechend, Linsen ohne Augenbecher »*freie Linsen*«, und Linsen, die zudem ohne Nachbarschaft von Gehirn, Nasen und Gehörblasen sich entwickelten, »*solitäre Linsen*«. Unsere freien Linsen traten bei 3 verschiedenen Defektversuchen an der frühen Neurula von *Triturus alpestris* auf. Sie wurden z. T. 1954, S. 156 ff. kurz veröffentlicht. Die Temperatur fand bei diesen Experimenten keine besondere Beachtung, was aber unsere Schlussfolgerung kaum beeinträchtigt.

Am Ende des Aufsatzes geben wir eine kurze Darstellung des gegenwärtigen Standes des Linsenproblems.

II. Ergebnisse

1. Freie Linsen in augenlosen Köpfen nach grossen rostralen Ectodermdefekten in der späten Gastrula und frühen Neurula

Bei diesem Versuch wurde in Stadien zwischen der mittleren Gastrula und der frühen Neurula im zukünftigen vorderen Kopfbereich ein ziemlich grosses Stück des präsumptiven Gehirns, des angrenzenden Medullarwulstes und der benachbarten Epidermis ohne Unterlagerung weggenommen (etwa wie Abb. 1). Isolat und Spender wurden aufgezogen. — Die Spenderkeime regulierten den Defekt in verschiedenem Masse, und zwar umso besser je jünger sie bei der Operation gewesen waren. Sie variierten zwischen Fällen, bei denen die Wunde grade überhäutet wurde und keinerlei Regeneration der im Zustand der Anlage entfernten Organe (*Postgeneration* Roux) stattfand,

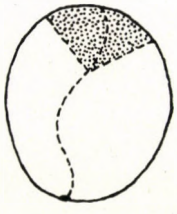


Abb. 1. Schema der Operation 1. Frühe Neurula von rechts, Medullarplatte eben durch Pigmentierung abgegrenzt (N 1). Grosses Stück des Ectoderms rostral ohne Unterlagerung herausgeschnitten (punktiert)

— und Fällen, die vollkommen normale Köpfe bildeten (s. MANGOLD und v. WOELLWARTH 1950, S. 390). Unter diesen Spendern fanden wir Larven, die ihren Gehirnstamm ziemlich gut reguliert, aber keine Augen ausgebildet hatten, und die trotzdem schöne Linsen zeigten. Diese augenbecherfreien Linsen waren aber recht selten. Sie wurden bei 110 Versuchen nur 3mal festgestellt, und zwar stets bei Larven, die sich bei der Operation auf der Grenze zwischen Gastrulation und Neurulation befanden (kleiner Dotterpfropf bis durch Pigmentierung abgegrenzte Medullarplatte = G 5 bis N 1). Von den 3 positiven Experimenten (1933 H 9, 1933 H 235 und 1950 Pg 5) soll ein Fall genauer beschrieben werden.

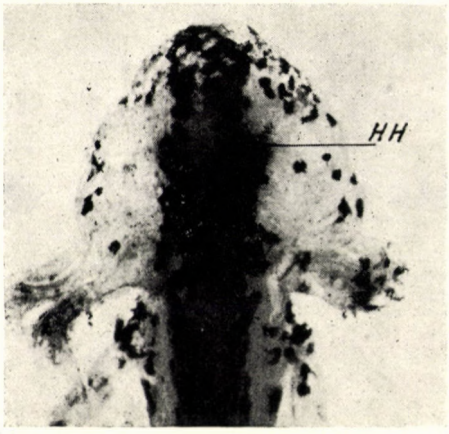


Abb. 2. 1933, H 235. Augenlose Larve 11 Tage n. d. Oper. von dorsal. HH = Hinterhirn

a) *Experiment: 1933, H 255* (Abb. 2 und 3).

Eine ganz frühe Neurula (N O) wurde wie oben angegeben operiert. — 1 Tag nach der Operation war das Neuralrohr geschlossen und die Wunde vollständig verheilt. — Die von dem Keim entwickelte Larve hatte 11 Tage nach der Operation 2 sprossende Zehen an der Vorderextremität und war gerade gestreckt. Der Kopf (Abb. 2) war vorn etwas zu kurz, rechts etwas stärker als links und ohne Augen. Hinterhirn (HH) und Nachhirn waren offenbar normal. Vorderhirn, Zwischenhirn und Mittelhirn waren von vielen Melanophoren bedeckt und daher unklar. Auch der Unterkiefer zeigte vorn rechts eine etwas stärkere Entwicklung als links. Bei der Schnittuntersuchung konnte am Gehirn eine weitgehende Regulation beobachtet werden. Vorderhirn mit 2 Hemisphären, Zwischenhirn mit Epiphyse (Abb. 3*a*, Ep) und Paraphyse, Mittelhirn, Hinterhirn und Nachhirn waren vorhanden. Das Infundibulum jedoch war deutlich gestört: es bildete nur eine breite sackförmige Erweiterung des Zwischenhirns mit starker dorsaler Wand. Die beiden Nasen waren vorhanden, ebenso die Gehörblasen. Es fehlten aber vollständig die beiden Augen. Trotzdem war rechts eine schöne Linse entwickelt (Abb. 3*b* und *c*, Li). Sie bildete über 10 Schnitte zu 10 μ ein gutes Bläschen, das vom Faserkegel gerade ausgefüllt war, und lag zwischen Gehirn, rechter Nase und rechter Choane. Ihre Polaritätsachse war von rechts dorsal nach links ventral gerichtet, der proximale Pol also gegen Gehirn und Choana. Die der Linse benachbarte Gehirnregion entsprach wahrscheinlich dem Recessus opticus (Abb. 3*b*, R. o.). Mit der weit entfernten Epidermis hatte die Linse keine Verbindung; doch bildete die Epidermis wenige Schnitte vor der Linse einen schlauchartigen Zapfen (Abb. 3*a*, Z), der die Entfernung zum Gehirn etwa zur Hälfte überbrückte,

und der wohl ursprünglich mit der Linse zusammenhing. Der Zapfen selbst zeigte eine Neigung zur radiären Stellung der Zellen, aber keine Faserstruktur. Er entstand wohl beim Wundverschluss nach der Operation.

Es ist kaum zweifelhaft, dass die *Linse* aus dem proximalen Ende des Zapfens sich entwickelte, wobei das Gehirn und auch die rechte Nase als Induktoren gewirkt haben mögen. Doch musste das Gehirn selbst zuerst postgeneriert werden. Die Linse besass keine Anzeichen von Degeneration.

Die beiden anderen positiven Fälle (1933 H 9 und 1950 Pg 5) waren sehr ähnlich dem oben beschriebenen Fall H 235; beide zeigten eine gute Linse dicht am Gehirnstamm. Doch waren die vorderen Gehirnabschnitte nicht so gut postgeneriert; sie bestanden nämlich aus einer rostralen Neural-

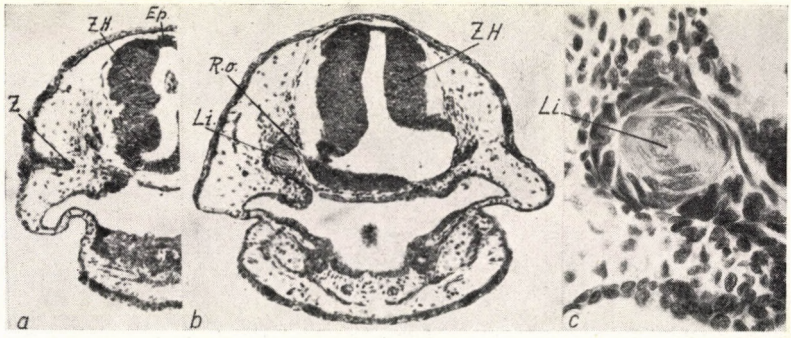


Abb. 3a—c. 1933, H 235. Querschnitte durch Kopf der Larve von Abb. 2. — *a)* im Bereich des Zwischenhirns (ZH) mit Epiphyse (Ep.) Epidermis mit Ectoderm-Zapfen (Z). — *b)* 10 Schnitte caudal von *a)*, mit Linse (Li) an Gehirn im Bereich des Recessus opticus (R. o.). — *c)* Linse von *b)*, stark vergrössert.

blase mit weitem Lumen und teils dicker, teils dünner Wandung, die wohl in erster Linie Zwischenhirn darstellte. Auch fehlten die Nasen. Die rostrale Neuralblase konnte von der Medullarplatte durch Neugliederung der Anlagen postgeneriert oder in der die Operationswunde bedeckenden präsumptiven Epidermis durch das rostrale Urdarmdach nachträglich induziert worden sein.

Der Fall 1950 Pg 5 zeigte weiterhin, dass die linsennahe Gehirnregion der Region des Recessus opticus entspricht. Die rostrale Neuralblase wies nämlich in ihrer linsennahen Wand kleine Fragmente von Pigmentepithel eines Auges auf, wie man sie nach der Excision der Augenanlage in der Neurula oft beobachtet. Bleiben dabei nämlich kleine Teile der Anlage am Keim, so können sie sich innerhalb des Gehirnstammes zu Fragmenten von Pigmentepithel differenzieren, und diese kennzeichnen dann den entsprechenden Gehirnabschnitt als Ursprungsstelle des Augenstiels, also als Region des Recessus opticus.

2. *Freie Lentoide in Epidermis-plus-Mesoderm-Mänteln der Neurula*

Bei diesen Versuchen wurden (Abb. 4) an der jungen Neurula dicht ausserhalb des Medullarwulstes das Ectoderm und das unterlagernde Mesoderm (Entomesoderm) durchschnitten (Abb. 4*a*), die linke und rechte Seite des Schnitts in der Urmundregion durch einen kurzen queren Schnitt verbunden, und dann die präsumptive Epidermis mit ihrer mesodermalen Unterlage dorsal beginnend und nach ventral fortschreitend vom Entoderm abgelöst. Der so erhaltene Epidermis-plus Mesoderm-Mantel (EpiMesMa, Abb. 4*b*) wurde weiterhin entlang der ventralen Mediane nach innen zusammengefaltet (Abb. 4*c*), und die Epidermisränder sodann zur Verheilung gebracht. Solche Mäntel enthalten im Ectoderm die Anlagen der Nasen, Cornea und Linsen und Gehörblasen,

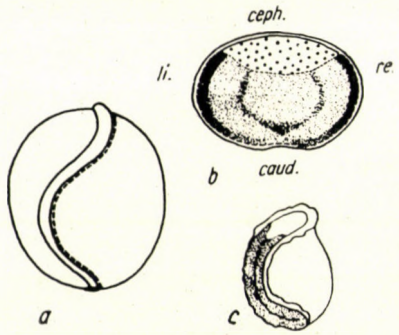


Abb. 4. Schema der Operation zur Herstellung von Epidermis-plus Mesoderm-Mänteln (EpiMesMa). — *a)* frühe Neurula von links. Entlang dem Medullarwulst Ectoderm und unterlagerndes Mesoderm durchschnitten und dann nach ventral von Entoderm abgezogen. — *b)* EpiMesMa ausgebreitet und von innen gesehen. — *c)* EpiMesMa entlang ventraler Mediane zusammengefaltet. (aus Mangold 1954)

des Mundes und des Afters, ferner die ecto-plus-mesodermalen Anlagen der Haftfäden und der Extremitäten, und schliesslich im Entomesoderm die Anlagen des Herzens, der Nieren und mancher Muskeln. Die Mäntel entwickeln im Lauf von 10—20 Tagen spindelförmige oder ellipsoide oder kugelige Blasen, die in der Regel eine Vorderkopfregion mit Haftfäden und schrumpeliger Epidermis, eine Hinterkopfregion mit Herzelementen in Form von Knoten oder Fasern und schliesslich eine Rumpfregion mit Vornieren, Vornierengängen, Muskeln und Blutzellen aufweisen (Abb. 5*a*). Es fehlen aber alle Nerven- und Sinnesorgane, der Mund und die Kiemen (s. MANGOLD 1954, 1957). Diese Befunde entsprechen im ganzen durchaus den Erfahrungen vieler Untersuchungen der Urodelenentwicklung. Überraschend war aber das Vorkommen von Haftfäden, deren Entwicklung in erster Linie auf die Induktion des vom Medullarwulst stammenden Ectomesoderms zurückgeführt wird (s. BALTZER, 1950 und CHEN 1952) und das Vorkommen von Lentoiden in der

Nachbarschaft der Haftfäden, das freilich nur in 2 Fällen (d. h. 4% aller Fälle) beobachtet werden konnte (1933 H 274 und H 277). Von diesen sei H 277 genauer beschrieben.

a) *Experiment: 1933, H 277. Lentoide in der Basis von Haftfaden* (Abb. 5).

Der nach der oben geschilderten Methode (Abb. 4) gewonnene Epidermis-plus Mesoderm-Mantel (EpiMesMa) bildete im Laufe von 8 Tagen eine spindelförmige Blase (Abb. 5*a*). Diese zeigte vorn eine etwas wulstige Epidermis, die der Kopfepidermis entspricht. Auf ihr sitzen 2 Haftfäden jeweils auf kegelförmiger Basis, von denen der eine (Hf 1) terminal ansetzt und in der Mediane nach ventral gerichtet ist, während der 2. (Hf 2) mehr proximal entspringt und nach rechts ventral zeigt. Weiterhin beobachteten wir an der Blase einen vorderen Peri-

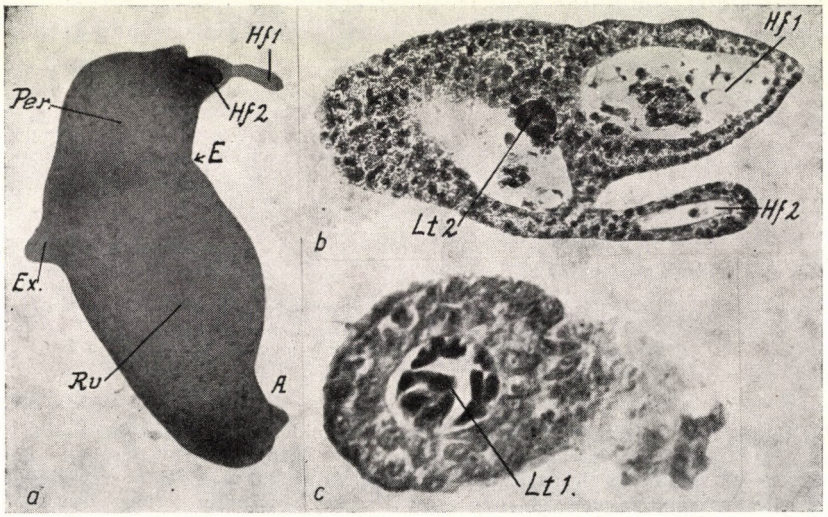


Abb. 5a—c. Experiment 1933, H 277. *a)* Epidermis-plus Mesoderm-Mantel 8 Tage n. d. Oper. von rechts. Vorn 2 Haftfäden (Hf 1 und Hf 2) in Vorderkopfepidermis, dann Pericardregion (Per) und Rumpfregion (Ru) mit Extremitätenknospen (Ex) und After (A). Zwischen Pericard- und Rumpfregion eine seichte Einschnürung (E). — *b)* und *c)* 2 Querschnitte im Bereich der Basis der Haftfäden, *b)* mit Lentoid 2 (Lt 2) und *c)* mit Lentoid 1 (Lt 1)

cardabschnitt (Per.) und einen hinteren Rumpfabschnitt (Ru), die beide durch eine leichte Einschnürung mit Querwand voneinander getrennt waren (E). Dorsal am Anfang des Rumpfabschnitts sassen die Knospen der Vorderextremitäten (Ex.), caudal unter dem Knopf der After (A). Dem EpMesMa fehlten alle nervösen Elemente, alle Sinnesorgane und alle Pigmentzellen (weitere Einzelheiten s. bei MANGOLD 1954).

Bei der Schnittuntersuchung fanden wir in der Basis der beiden Haftfäden 2 Lentoide (Lt. 1 und 2). Lentoid 1 (Abb. 5*c*, Lt. 1) war 7 Schnitte zu 10 μ dick und etwa kugelig. Es bestand nur aus Fasern, die zum Teil kegelförmig angeordnet waren, und war nach aussen anscheinend durch ein Häutchen begrenzt. Das 2. Lentoid (Abb. 5*b*, Lt. 2) war vom ersten nur drei Schnitte entfernt. Es war 5 Schnitte dick, im Umfang kreisförmig und etwas grösser als Lentoid 1. Seine Zellen waren kegelförmig, etwa gleich hoch wie breit, sassen mit der Basis der peripheren Oberfläche an und stiessen im Zentrum zusammen. Ein Lumen fehlte oder war minimal. — Beide Lentoide fielen durch ihre stark gefärbten Kerne auf. Nach der Nomenklatur von BECKER (1959, 1960) kann Lentoid 1 als Faserlentoid, und Lentoid 2 als Bläschenlentoid bezeichnet werden.

Der 2. positive Fall (1933, H 274) zeigte 2 Faserlentoide von beträchtlicher Grösse, das eine wieder im basalen Epithel eines normal ausgebildeten Haftfadens, das andere unter einer Epidermisverdickung, die durch ihren Bau und das unterlagernde Mesenchym sich als Haftfadenrudiment erwies (Näheres s. bei MANGOLD 1954, S. 144, Abb. 7*b*).

3. *Freie Linsen in Köpfen ohne Gehirn und Augen und ohne Evtomesoderm*

Bei diesen Versuchen wurde in frühen Neurulen die Gehirnanlage (= vordere Hälfte bis 1—3. Fünftel der Medullarplatte) mit den benachbarten Medullarwülsten, aber ohne unterlagerndes Entomesoderm und Entoderm entfernt (Abb. 6, hintere Defektgrenze entweder bei *a* oder *b*). Die sehr grosse Wunde konnte sich — wenn die Unterlagerung intakt geblieben war — gut schliessen, und es entstanden Köpfe etwa halber Länge und Breite (s. MANGOLD 1955, S. 149). War die Unterlagerung irgendwie verletzt, so heilte die Wunde nur

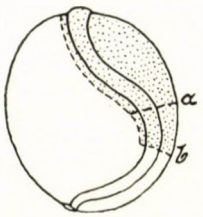


Abb. 6. Schema der Operation 3. Frühe Neurula von links. Aus der Medullarplatte die Gehirnanlage mit den angrenzenden Medullarwülsten ohne Unterlagerung entfernt; hintere Grenze bei *a)* oder *b)* (Defektbezirk punktiert)

mangelhaft, und es entwickelten sich stark missgebildete Köpfe, oft mit blut- oder flüssigkeitserfüllten Blasen. Bei den gut verheilten und bei den missgebildeten Köpfen fehlten stets das Gehirn und die Augen. *Gehörblasen* waren meist, *Nasen* selten vorhanden. Die Visceralknorpel fehlten vollständig, wenn der Defekt die vorderen drei Fünftel der Medullarplatte mit Wülsten umfasste (Abb. 6, Grenze *b*); sie waren aber z. T. vorhanden, wenn nur die vordere Hälfte der Medullarplatte mit den angrenzenden Wülsten entfernt worden war (Abb. 6, Grenze *a*). Der *Mund* war in der Regel vorhanden, lag oft auf einem kleinen Kegel und besass eine enge Öffnung und ein schlauchförmiges ectodermales Mundrohr, das zum entodermalen Kiemendarm führte. — Von den *Augenlinsen* wurde erwartet, dass sie infolge des Fehlens der Augenbecher nicht entwickelt sein würden. Aber schon bei der Beobachtung der sich entwickelnden Larven im Leben wurden einige Linsen festgestellt. Die Larven wurden dann rechtzeitig, d. h. etwa 20 Tage nach der Operation, fixiert, da man bei längerer Aufzucht mit der Degeneration der augenfreien Linsen rechnen musste. Bei der mikroskopischen Untersuchung von 24 Larven zeigte sich dann zu unserer grossen Überraschung, dass von 24 Larven 10 (42%) Linsen besassen, 12 (50%) linsenfrei waren und 2 (8%) unsichere

Verhältnisse aufwiesen. 5 Larven, denen die ganze Medullarplatte mit den benachbarten Wülsten weggenommen worden war und die entsprechende Kopfverhältnisse zeigten, waren alle ohne Linsen (MANGOLD 1960*b*). Das Verhältnis der positiven zu den negativen Fällen ist jedoch fragwürdig, da bei den negativen Larven ev. solche waren, die erst sekundär infolge Degeneration ihrer Linsen negativ geworden sind.

Tabelle I

Linsen Nro. der pos. Fälle		Linsen-Kombinationen			Nasen-Kombinationen		
eine Linse (li., re., med. Lage)	zwei Linsen	Linse + Nase	Linse + Nase + Gehirn	Linse + Nase + Gehörblase	Nase	Nase + Gehirn	Nase + Gehörblase
*174 li. 193 re. 185 med. 195 med. * solitär	*175 *191 *235 *241 186 218	185 193 195?	186 248?	218	244	248	236 240
zus. 4	6	2 (+1)	1 (+1)	1	1	1	2

*Nummern von gehirn- und augenlosen Larven mit Linsen, Nasen, Gehörblasen und Gehirnfragmenten, allein oder in Kombination, induziert vom Urdarmdach. * Linsen allein = solitäre Linsen; — li., re., med. Linse liegt links, rechts oder median; — wenn 2 Linsen vorhanden, liegt 1 links und 1 rechts; 195? Nase unsicher; 248? Linse unsicher. Experimentbezeichnung z. B.: 1953, An 174 usw.*

Die Linsen konnten in Einzahl vorhanden sein, und zwar in linker (li) oder rechter (re) oder medianer (med) Lage. Sie wurden aber häufiger in Zweizahl gefunden, wobei ihre Lage sie als linke und rechte kennzeichnete (Tab. 1). Sie lagen zudem stets weit rostral in der Nachbarschaft der Mundöffnung. Sie konnten mit anderen Sinnesorganen (Nasen, Gehörblasen) und Gehirnfragmenten verbunden sein *(Kombinationen)* oder auch ohne solche vorkommen *(solitäre Linsen* = * Tab. 1). Die verschiedenen Möglichkeiten sollen durch die Beschreibung einiger Fälle charakterisiert werden.

a) *Experiment: 1953 An 185. Mediane Linse und mediane Nase* (Abb. 7).

Dem Keim wurden im frühen Neurulastadium (N 1—2) das 1. und 2. Viertel der Medullarplatte mit den angrenzenden Wülsten und 5 Grüppchen von Entomesodermzellen weggenommen. Die Entodermdecke blieb intakt, und die des Mesoderms war kaum gestört. Der Embryo zeigte nach der Verheilung einen kleinen Porus vor dem Rückenmarkstumpf, der weiterhin nicht mehr beobachtet wurde. Die Larve wurde 39 Tage n. d. Oper. fixiert. Ihr Kopf war kurz und etwa halbkugelig vorgewölbt; ventral rostral hatte er einen kegelförmigen Höcker, anscheinend mit Mundöffnung *(»Mundkegel«)*. Dorsal median über dieser lag 1 Linse. Am Hinterkopf waren beiderseits das 1. Kiemenstämmchen schwach, das 2. und 3. stark entwickelt. Der Rückenmarkstumpf endete über dem 2. Kiemenstämmchen. Der *Nervus lateralis* war beiderseits vorhanden. Der Rumpf war um 160° nach ventral gekrümmt. Die Hinterextremitäten zeigten eine auffallend gute Entwicklung. — Bei der Schnittuntersuchung fehlten dem Kopf das Gehirn und die Augen vollkommen. An *Gehörblasen* war rechts eine grosse, dünnwandige, vielleicht doppelte ohne Macula entstanden. Links fand sich eine kleine

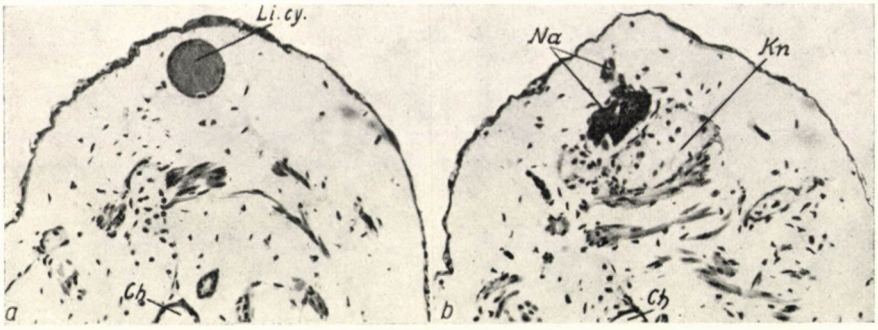


Abb. 7a, b. 1953, An 185. Cyclopische Linse (Li. cy.) und Nase (Na) in Kopf ohne Gehirn und Augen. Frontalschnitte über porusartiger Mundöffnung, *b* 8 Schnitte zu 10 μ über *a*. — Ch. Chorda; Kn. Knorpel

mit einem Sinnesfleck. Beide Gehörblasen lagen wie normal auf Höhe des Hinterkopfes. Beträchtlich vor ihnen lag median unter der Haut die schon im Leben beobachtete *Linse* (Abb. 7*a*, Li). Sie war schön kugelig, 11 Schnitte zu 10 μ dick und besass eine Linsenmembran, ein dünnes Epithel und einen dicken Faserkern. Ihre Polaritätsachse war nicht sicher festzustellen. Ihre dorsalen 2 Drittel waren von lockerem Mesenchym umgeben; das ventrale Drittel war eingebettet in eine kernreiche Zellmasse, die durch einen median verlaufenden Kanal durch die dorsale Haut mit der Oberfläche in Verbindung stand. Lage und Struktur des Gebildes lassen es als verunglückte *Nase* deuten. Einige Schnitte mehr ventral von ihr lag die vordere *Mundhöhle*, beiderseits begleitet von Lippen. Sie zeigte in der Tiefe auch *Zähne*.

Wie bei einer hochgradigen Cyclopie hatte die Larve 1 Nase und 1 mediane Linse. Es fehlte aber der Augenbecher. Die Linse zeigte auffallenderweise 39 Tage n. d. Oper. noch keine Degeneration, war aber auch relativ klein.

b) *Experiment: 1953 An 175. Eine linke und rechte solitäre Linse* (Abb. 8).

Im frühen Neurulastadium waren das 1. und 2. Viertel der Medullarplatte mit Wulst und ziemlich vielem Entomesoderm entfernt worden. Die praechordale Platte und ca. $^3/_4$ des Entomesoderms blieben am Keim. Die Wunde verheilte vollständig. Es entstand eine gute Larve, mit rechtem, aber ohne linken Haftfaden. — 23 Tage n. d. Oper. wurde fixiert. Der Vorderkopf war halbkugelig vorgewölbt und gut geschlossen. Er hatte rostral ventral einen kleinen kugeligen Höcker *(= Mundkegel)*. Am Hinterkopf standen beiderseits 2 lange Kiemenstämmchen. Gehirn, Nasen und Augen fehlten vollständig. Beiderseits war eine kleine *Gehörblase* (Abb. 8*b*, Gbl.) mit je 1 Macula entwickelt. Auch ein Mund mit Lippen, engem Stomo-

Abb. 8a, b. 1953, An 175. Frontalschnitte durch die vordere Kopfregion einer Larve ohne Gehirn und Augen, dicht über dem Mundkegel; 23 Tage n. Oper. fixiert. Gbl. Gehörblase rechts; Li. l. und r. linke und rechte solitäre Linse; Lp. Lippen an Mundkegel; Nz kleine Gruppen von Nervenzellen (Ganglien).

daeum und Zähnen (im Bereich des Vomer) waren vorhanden. *2 grosse Linsen* (Abb. 8*a*, *b*, Li. l., Li. r.), jeweils mit Membran, dünnem Epithel und sehr grossem Faserkern, lagen rechts und links dorsal rostral im Kopf. Ihre Lage entsprach wohl der der normalen Linsen. Ihre Umgebung zeigte nichts Auffälliges; bei beiden waren Muskeln und ein kleiner Komplex von Ganglienzellen (Abb. 8*a*, *b*, Nz) in der Nähe, ohne die Linsen direkt zu berühren. Die linke Linse war oval und 17 Schnitte zu 10 μ dick; sie berührte mit 1 Pol noch die Epidermis; die rechte war über 14 Schnitte zu verfolgen und zeigte kreisförmige Anschnitte.

Bei beiden Linsen ist ihre normale Lage, ihre Grösse, ihr hoher Differenzierungsgrad und ihr Mangel an besonderen Begleitgeweben zu beachten.

c) *Experiment 1953, An 193. Nase + Linse in enger Verbindung, dazu Gruppe von Ganglienzellen* (Abb. 9).

In der frühen Neurula (N2) wurden das 1+2. Viertel der Medullarplatte mit den zugehörigen Wülsten entfernt. Im Kopfbereich ging zudem ziemlich viel Entomesoderm verloren; doch blieb das Entoderm unverletzt. Trotzdem entstand ein sehr stark defekter Kopf, an dem nur die Kiemenregion einigermassen entwickelt war. An Stelle des Vorderkopfes waren

Abb. 9a, b. 1953, An 193. Frontalschnitte durch die stark gestörten Rostralbezirke einer Larve ohne Gehirn und Augen, aber mit einer stark deformierten und etwas degenerierten Linse (Li) und einer anliegenden Nase rechts von Mund (Mu)

nur Spangen und Wülste ausgebildet. Die Larve wurde 26 Tage n. d. Oper. fixiert. Dem Kopf fehlten das Gehirn, die Augen und die Gehörblasen. Einige Ganglien waren vorhanden. Der Mund (Abb. 9, Mu) bildete ventral ein medianes Rohr zum Kiemendarm. Rechts von ihm lagen 1 Linse (Li), 1 Nase (Na) und eine kleine Gruppe von Ganglienzellen (Nz).

Die *Linse* (Abb. 9*a*, Li) war nieren- bis schlauchförmig, mit Epithel und einer dicken Fasermasse, die schon Zersetzungserscheinungen zeigte. Sie war 10 Schnitte zu 10 μ dick. Dicht an sie anschliessend lag die *Nase* mit Eingang, klarer Höhle und dem typischen Nasenepithel (Abb. 9*b*, Na). Sie war 18 Schnitte dick und etwas deformiert. Ausserdem fanden sich dorsocaudal von der Nase noch einige locker gefügte Nervenzellen (Nz).

Der Fall zeigte Nase + Linse in enger Verbindung, dazu eine kleine Gruppe von Ganglienzellen.

d) *Experiment 1953, An 136. Linse, Nase und Gehirnfragment und eine Linse in Degeneration* (Abb. 10).

Dem Keim wurde im frühen Neurulastadium (N 2) das 1. und 2. Viertel der Medullarplatte mit ziemlich viel Entomesoderm und den benachbarten Medullarwülsten weggenommen. — Die Kopfwunde verheilte schlecht; daher blieb der Kopf stark defekt. Er war bei der Fixierung, 24 Tage n. d. Oper., kurz, etwa halbkugelig dem Rumpf aufgesetzt, rechts und links mit kurzen Kiemenstämmchen besetzt, und zeigte rostral einen medianen Spalt, der offenbar zur Mundbildung in Beziehung stand. Der linke Haftfaden war normal entwickelt und resorbiert

worden; der rechte fiel aus. Die Untersuchung der Frontalschnitte (Abb. 10*a*—*c*) zeigte das Fehlen des Gehirnstamms, der Augen und der Gehörblasen. Der Mund (Mu) bildete einen medianen spaltförmigen Schlauch zum Kiemendarm und war rostral mit Lippen (Lp) besetzt. Die Kopfwand beiderseits des Mundrohrs war mit Mesenchym, wenig Muskulatur und kleinen Knorpelelementen erfüllt und von spalten- oder röhrenförmigen Ausbuchtungen des Kiemendarms und Mundrohrs durchsetzt (Dsp., Visceralspalten?). Ventral rostral waren rechts und links vom Mundrohr je eine Linse entwickelt. Die rechte Linse (Li. r.) war kugelig, 18 Schnitte zu 10 μ gross und besass 1 Linsenmembran, 1 flaches Epithel und einen grossen, hochdifferenzierten Faserkern. Sie war gegen den Mund hin, also medianwärts, eng verbunden mit einem kleinen Gehirnteil (= Vorderhirn mit Fasermassen, Abb. 10*a*, VH) und einer grossen Nase mit Lumen und 2 Eingängen (Abb. 10*b*, *c*, Na, E1 und E2). Ihr hinterer Pol lag am caudal-medianen Nasenrand. In ihrer weiteren Umgebung fanden sich 2 Darmspalten (Dsp.), davon die eine dicht median der Nase, die andere caudal von der Linse. — Die linke Linse (Abb. 10*b*, Li. 1*d*) lag ungefähr auf gleicher Höhe wie die rechte. Sie erstreckte sich nur über 7 Schnitte und befand sich in voller Degeneration. Linsenmembran und Epithel fehlten,

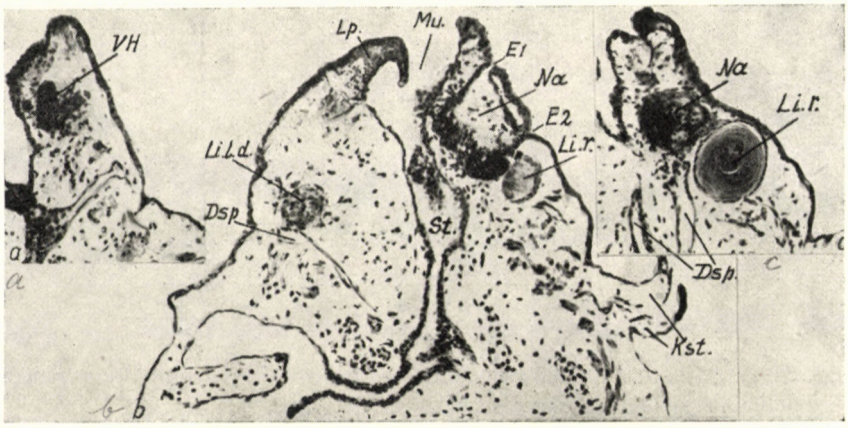


Abb. 10a—c. 1953, An 186. Frontalschnitte durch vordere Kopfregion einer Larve ohne Gehirn und Augen im Bereich des Mundkegels. *a—c* von dorsal nach ventral fortschreitend. — Dsp. vom Darm ausgehende Spalten; E1 und E2 Eingänge in die starke Nase (Na), Kst. Kiemenstämmchen, Li. l. d. linke Linse degeneriert, Li. r. rechte Linse, Lp. Lippen um Mu. Mund; St. Stomodaeum, ectodermales Mundrohr; VH. Gehirnfragment = Vorderhirn

und der dicke Faserkern bildete eine schwammige Masse mit Kernen, die unregelmässig verteilt vom normalen Zustand bis zu der stärksten Pyknose schwankten. Ein kleiner, oberflächlich entspringender und zur Linse ziehender Ectodermzapfen deutete auf ihre Ablösung vom Ectoderm hin. Nahe benachbart fand sich auch eine Darmspalte (Abb. 10*b*, Dsp.). Neurale Elemente fehlten in der Nähe der linken Linse.

Der Fall zeigte rechts Vorderhirn, Nase und Linse als einheitlichen Komplex und links 1 degenerierte solitäre Linse.

c) *Experiment 1953, An 218. Rechte und linke Linse und mediane Nase und Gehörblase* (Abb. 11.)

Dem Keim waren im frühen Neurulastadium (N 2—3) das 1. und 2. Viertel der Medullarplatte mit anliegenden Wülsten und etwas Entomesoderm entnommen worden; Chorda und Entoderm blieben unverletzt. Die Wunde war gut verheilt. 23 Tage n. d. Oper. zeigte die Larve einen etwa halbkugeligen Kopf, beiderseits mit Kiemenstämmchen und einem Mundkegel rostral ventral. Das Gehirn und die Augen fehlten; *Ganglien* waren mehrfach vorhanden, ebenso viele *Sinnesknospen* des Seitenliniensystems. Dorsal median vor dem Gehirnstumpf, also im Hinterkopf, fand sich eine winzige blasenförmige *Gehörblase* mit einem knopfförmigen Sinnesepithel. Weiterhin waren ganz rostral an Hauptsinnesorganen 1 mediane *Nase* (Abb. 11,

Na), 1 mediane *Gehörblase* (Gbl.) und dicht rechts davon 1 *rechte Linse* (Abb. 11*a*, *b*, Li. r.) entwickelt. Eine weitere, *linke Linse* (Abb. 11*c*, Li. l.) lag um 15 Schnitte mehr ventral. — Die rechte Linse lag etwas rechts der Mediane dicht unter der Haut und in geringem Abstand zur Gehörblase (Gbl.). Sie war 16 Schnitte dick, kreisrund im Schnitt, und zeigte eine Membran, ein sehr dünnes Epithel und einen starken Faserkern. Ausser der Gehörblase hatte sie caudal Knorpel und Muskeln zu Nachbarn. Die Nase (Abb. 11*a*, *b*, Na) lag hart links der Mediane, war 19 Schnitte dick und zeigte, sehr typisch, einen dorsocephalen Eingang, ein weites Lumen und ein radiäres hohes Sinnesepithel. In enger Berührung mit der Nase lag median etwas nach dorsal verschoben, die Gehörblase (Gbl.). Sie war über 15 Schnitte zu verfolgen, war zum Teil bohnenförmig und hatte eine Macula. — Die linke Linse (Abb. 11*c*, Li. l.) erstreckte sich über 15 Schnitte, war kreisrund im Schnitt, lag dicht unter der Haut, zeigte ebenfalls Membran, Epithel und einen starken Faserkern, und hatte wahrscheinlich einen caudal gelegenen hinteren Pol. In ihrer Nachbarschaft war nichts Auffälliges. — Ventral von der linken Linse war das enge Mundrohr mit dem Mund.

In dieser Larve ist zweifelhaft, ob die rechte Linse zu der medianen Gruppe Nase + Gehörblase zu rechnen oder als solitäre Linse aufzufassen ist, da sie einen geringen Abstand von diesen besitzt und keine unmittelbare Berührung mit der Nase oder Gehörblase aufweist. Für ihren solitären Charakter spricht auch das Vorhandensein einer solitären linken Linse.

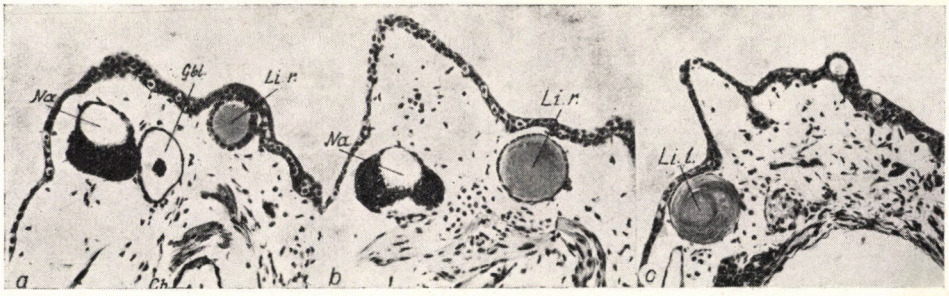


Abb. 11a—c. 1953, An 218. Frontalschnitt durch vordere Kopfregion einer Larve ohne Gehirn und Augen und ohne Ectomesoderm, aber mit einer rechten und linken Linse (Li. r. und Li. l.) und einer medianen Nase (Na) und Gehörblase (Gbl.) — Ch. Chordaspitze

III. Besprechung der Ergebnisse

Die 3 Versuchsarten, die oben beschrieben wurden und die stets zu augenbecherfreien Isolaten (Epidermis-plus-Mesoderm-Mänteln) bezw. Larven führten, *zeigen eindeutig, dass bei* Triturus alpestris *auch Linsen ohne Augenbecher entstehen können.*

Da rostrale reine Epidermisstücke, die die Linsenanlage enthalten, aus der frühen Neurula entnommen und als Isolate gezüchtet, keine Linsen differenzieren (MANGOLD 1933*a* *Triturus alpestris*, RAUNICH 1940 *Amblystoma mexicanum*, JACOBSON 1958 *Taricha torosa [Triturus torosus]* u. v. Autoren für Anuren, Lit. s. JACOBSON 1958, S. 527), können wir annehmen, dass die Linsenanlage in diesem Stadium nur sehr wenig oder noch gar nicht determiniert ist. Jedenfalls ist es sehr wahrscheinlich, dass die oben beschriebenen augenbecherfreien Linsen in ihrer Entwicklung durch andere Elemente ihrer Nachbarschaft bestimmt worden sind. Die Ursachen der Linsendifferenzierung liegen bei den drei verschiedenen Experimenten wahrscheinlich etwas verschieden.

1. *Freie Linsen beim Versuch 1*

Bei den freien Linsen des Experiments 1, die durch ihre Lage dicht neben dem postgenerierten Gehirn charakterisiert sind (Abb. 2 und 3), ist mit grosser Wahrscheinlichkeit anzunehmen, dass die Determination von dem Gehirn ausgegangen ist und auf das Ectoderm wirkte, das nach der Operation die grosse Wunde bedeckte und dabei Zapfen gegen das Gehirn bilden konnte (Abb. 3*a*, Z). Die Variation der 3 positiven Fälle zeigt zudem, dass der determinierende Gehirnabschnitt die Region des Recessus opticus darstellt; denn in einem Fall hatte die linsennahe Gehirnregion kleine Fragmente von Tapetum gebildet und sich damit als Bereich des Augenstiels charakterisiert.

Aus diesem Befund ergibt sich die Frage, welche Gehirnabschnitte die Fähigkeit zur Linsendetermination besitzen. Vermutlich ist es nur ein begrenzter Bezirk, da wir im Vorderhirn mit der Fähigkeit zur Naseninduktion und im Hinterhirn und Nachhirn mit der zur Gehörblaseninduktion rechnen können (für Nase: MANGOLD 1933*b*, HOLTFRETER 1936, 1944, WOERDEMAN 1938, CHUANG 1939, YAMADA 1950 u. a.; — für Gehörblase: HARRISON 1935, 1945, TRAMBUSCH 1941, YNTEMA 1950; Lit.-angabe s. bei HOLTFRETER 1951, DETWILER 1951, YNTEMA 1955 und MANGOLD 1960 *b*).

Die Häufigkeit der Zwischenhirn-nahen Linsen des Versuchs ist freilich gering: nur 3 von etwa 100 Versuchen zeigten dieselben Verhältnisse. Die Ursache für diese Seltenheit liegt vielleicht darin, dass bei der Verheilung der Wunde nur selten Ectodermzapfen gebildet werden, die reaktionsbereites Zellmaterial an die determinierenden Gehirnabschnitte heranbringen. In manchen Fällen konnten aber auch die induktionsfähigen Gehirnabschnitte infolge ungenügender Postgeneration fehlen, oder es konnten bei guter Augenausbildung Linsen durch die Augenblasen induziert werden.

Der Mangel genügenden Kontakts des reaktionsbereiten Ectoderms mit den induktionsfähigen Gehirnabschnitten ist wohl auch dafür verantwortlich, dass nach der Exstirpation der Retinaanlage im Stadium der offenen Medullarplatte oder nach der Entfernung der primären Augenblase ohne bedeckendes Ectoderm bei *Triturus* die überlagernde Linsenanlage nicht durch das Zwischenhirn zur Linsenbildung determiniert wird; denn bei *Triturus* entsteht nach den beiden Operationen keine Linse (MANGOLD 1931*b*, S. 253—255, BECKER 1955 u. a.). Wahrscheinlich ist hierbei das Mesenchym von Bedeutung; denn wir wissen seit den ersten Linsenversuchen von SPEMANN, dass die Isolation der Linsenanlage vom Augenbecher durch Mesenchym (s. Nachtrag. S. 172) die Linsendetermination verhindert. Andererseits ist anzunehmen, dass manche Linsen, die nach der Exstirpation der primären Augenblase entstanden und in nächster Nachbarschaft des Zwischenhirns gefunden worden sind, durch das Zwischenhirn induziert wurden. Dies trifft vielleicht für die von SPEMANN

1912 beschriebene »unabhängige Linse« von *Rana esculenta* zu (auch abgebildet bei MANGOLD 1931, S. 252, Abb. 14). Aber auch Lentoide, die auf der augenbecherfreien Seite am Ectoderm entstanden, könnten vom Zwischenhirn determiniert und durch zuwanderndes Mesenchym secundär vom Zwischenhirn abgedrängt worden sein (s. z. B. v. UBISCH 1924, S. 69). Dafür sprechen auch Versuche von BECKER (1959, S. 213, und unveröffentlicht), bei denen die primäre Augenblase bezw. der embryonale Augenbecher nach Abheben des Linsenectoderms in verschiedenen Stadien entfernt wurde und bei denen nach früher Entfernung nur Lentoide in der bedeckenden Epidermis entstanden. Eine kurzfristige oder ungenügende Induktion führt also zur Bildung von Lentoiden.

Eine andere Erklärung gibt JACOBSON (1955) für eine freie Linse in entsprechender Lage wie unsere Linse von Abb. 3*b* und *c*. Die Linse war bei *Taricha torosa* nach Exstirpation der Retinaanlage im frühen Neurulastadium auf der augenlosen Seite gebildet worden. Ihre Differenzierung ist wesentlich schlechter als die unserer Linsen. JACOBSON glaubt, dass sie vom Urdarmdach induziert worden sei, dessen Fähigkeit Linsen zu induzieren S. 171 besprochen wird. Auch bei unseren freien Linsen des Versuchs 1 muss eine Beteiligung des Urdarmdachs in Rechnung gestellt werden; doch scheint mir ihre so charakteristische Lage mehr für die Induktion durch das Zwischenhirn zu sprechen.

2. *Freie Linsen beim Versuch 3*

Der 3. Versuch, bei dem im frühen Neurulastadium die Gehirnplatte mit der angrenzenden Medullarwulst entfernt wurde, lieferte überraschend viele freie Linsen (42% aller Fälle). Wichtig ist hierbei, dass alle weit rostral und auch dorsal lagen, und dass man ausserdem häufig eine rechte und eine linke unterscheiden konnte. Nur in 2 Fällen war eine mediane Linse vorhanden, wie sie bei der Cyclopia perfecta beobachtet werden kann. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass die Linsen und zwar besonders die rechten und linken, sich aus den normalen Linsenanlagen entwickelt haben, die beim Wundverschluss eine gewisse Verschiebung nach rostral und dorsal erleiden. Da aber, wie oben schon ausgeführt, eine Selbstdifferenzierung dieser Anlagen bei *Triturus* kaum in Betracht kommt, müssen wir nach dem Ausfall der primären Augenblasen und des Gehirns annehmen, *dass die Linsen durch das rostrale Urdarmdach und evtl. Entoderm determiniert worden sind*, — eine Möglichkeit, die von uns schon 1931, S. 257 und 277, ins Auge gefasst wurde.

Entsprechende Ergebnisse erzielte JACOBSON (1955, 1958) bei *Taricha torosa (=Triturus torosus)* durch ein dem unserigen sehr ähnliches Experiment, d. h. bei der Entfernung der vorderen Teile der Gehirnplatte mit der angrenzenden Medullarwulst ohne Unterlage aus der frühen Neurula. 12 von 46 Larven (26%) zeigten linsenähnliche Gebilde, die aber keine so gute Ausbildung wie bei unserem Versuch aufwiesen. JACOBSON konnte weiterhin durch Explantate aus der frühen Neurula, bei denen das Linsenectoderm *a)* allein, oder *b)* mit dem

unterlagernden Entoderm, oder *c)* mit dem mehr caudal liegenden praechordalen Entomesoderm, oder *d)* mit Entoderm plus Entomesoderm gezüchtet wurde, zeigen, dass die Fähigkeit Linsen zu induzieren, sowohl im rostrolateralen Entoderm als auch im praechordalen Entomesoderm enthalten ist. Der Versuch *a* lieferte an positiven Fällen 0%, Versuch *b* 31%, Versuch *c* 14% und Versuch *d* 42%. Auch Entomesoderm der Rumpfseite zeigte mit Linsenectoderm kombiniert schwache Induktionsfähigkeit (10% der Fälle positiv). Ventrale Rumpfepidermis bildete aber mit rostralem Entoderm + Mesoderm zusammen gezüchtet keine Linsen.

Die determinierende Wirkung des vorderen Urdarmdachs, d. h. der praechordalen Platte und des praechordalen Entomesoderms und Entoderms, steht ausser Zweifel; bilden diese doch den vordersten Teil des Organisators, der, unter die praesumptive Rumpfepidermis der jungen Gastrula verpflanzt, Gesichtsorgane mit Haftfäden und auch vordere Gehirnabschnitte mit Nasen, Augen und Gehörblasen induziert (MANGOLD 1933*b*, GALLERA 1949 u. a.). Auch ist die praechordale Platte bei der Determination des Mundes, des Mandibularbogens und der Bilateralität des Vorderkopfes beteiligt (MANGOLD 1957, S. 25). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass das Ectoderm, das sich beim Wundverschluss über das vordere dorsale Urdarmdach schiebt, von diesem determinative Einflüsse erfährt. Die Art der Reaktion wird dann einerseits vom Induktor und andererseits von der Reaktionsfähigkeit des Ectoderms bestimmt.

Die Untersuchung der Induktionsfähigkeit der verschiedenen Abschnitte des Urdarmdachs durch Transplantation unter die praesumptive Rumpfepidermis der frühen Gastrula hat nun ergeben, dass diese in der Regel »*komplexe regionale Induktionen*« hervorbringt, d. h. Induktionen, *die mehrere Organe umfassen und im gesamten eine bestimmte Region des Embryo darstellen*. Vorderköpfe, Hinterköpfe, Rümpfe und Schwänze, von LEHMANN (1945) als archencephale, deuterencephale und spinocaudale Induktionen bezeichnet, sind nach den Untersuchungen von SPEMANN (1931), MANGOLD (1933 *b*) u. v. a. ein vielfach gesichertes Ergebnis der entwicklungsphysiologischen Forschung geworden.

Die Art der Organe und die Mannigfaltigkeit der Zusammensetzung dieser komplexen regionalen Induktionen hängt in hohem Masse von der Reaktionsfähigkeit des dargebotenen Ectoderms, d. h. der »Kompetenz« (LEHMANN 1945) des reagierenden Materials ab. Diese ist von der genetischen Konstitution, vom Alter und von den vorausgegangenen Determinationsschritten abhängig (MANGOLD 1931*a*, S. 911). In unserem Fall hat das die Wunde überziehende Ectoderm die Fähigkeit, eine Medullarplatte und ein Gehirn zu bilden, vollkommen oder nahezu vollkommen verloren; es besitzt aber noch die Fähigkeit zur Differenzierung von sekundären Gebilden, d. h. Nasen, Linsen, Gehörblasen und Placoden der Kopfganglien und der Sinnesorgane des Seitenliniensystems (zur Änderung der Reaktionsfähigkeit s. auch HOLTFRETER 1938, GALLERA 1952, LIEDKE 1951, 1955, JACOBSON 1958 u. a.). Nasen, Linsen, Gehörblasen, Ganglien und Sinnesknospen treten auch in den Köpfen unseres Versuchs 3 regelmässig auf, und zwar in den meisten Fällen nicht als Einzelorgane, sondern als *komplexe Induktionen*, die, wie die

Tab. 1 zeigt, Linse + Nase, oder Linse + Nase + Gehirn, oder Linse + Nase + Gehörblase, oder Nase + Gehirn, oder Nase + Gehörblase aufweisen können.

Entsprechende Kombinationen wurden auch von anderen Forschern beobachtet (OKADA 1949 *a*, *b*, JACOBSON 1958 u. a.). Sie treten auch bei freien Linsen auf, die durch heterogene Induktoren induziert wurden (HOLTFRETER 1934*a*, *b*, TOIVONEN 1940, 1945, ROTMANN 1942 und unveröffentlicht, u. a.). Die von Rotmann und Toivonen erhaltenen freien Linsen wurden von meiner Mitarbeiterin BECKER ausgewertet. Dabei waren von insgesamt 104 Fällen 43 Linsen mit Haftfaden vergesellschaftet, 24 Linsen mit Nasen, und 9 Linsen mit Gehirnteilen. 28 Linsen waren allein, stellten also »solitäre Linsen« dar (Publikation in Vorbereitung. Zum Komplex Linse + Haftfaden s. S. 171)

Verglichen mit den oben erwähnten komplexen Induktionen aus der praesumptiven Rumpfepidermis der frühen Gastrula sind diejenigen aus der Kopfepidermis der frühen Neurula aber sehr viel weniger mannigfaltig, und wir können sie als »*reduziert komplexe Induktionen*« bezeichnen. Es ist auch kaum zweifelhaft, dass diese Induktionen einen *regionalen Charakter* besitzen. Nase, Gehirn (wahrscheinlich Vorderhirn) und Linse, also im Vorderkopf liegende Organe, sind zusammen oder zu zweien kombiniert mehrfach entwickelt. Auch die Gehörblase, die ja kein Vorderkopf-, sondern ein Hinterkopforgan darstellt, widerlegt nicht die Annahme von regionalen Induktionen; denn die Gehörblase ist kein absolut sicheres Kriterium der Hinterkopfinduktionen, da man sie durch alle rostral-caudalen Viertel des Urdarmdachs und der Medullarplatte induzieren kann (s. MANGOLD 1933*b*, S. 765, Tab. 1) und wir auch annehmen müssen, dass in unserem Versuch 3 beim Verschluss der Wunde das Urdarmdach in rostrocaudaler Richtung etwas zusammengeschoben wurde. Die in der Tabelle 1 verzeichneten Gehörblasen gehören aber zum Induktionskomplex; denn sie sind überzählig, und ausser ihnen treten noch Gehörblasen auf, die auf Hinterkopfhöhe lateral oder median liegen (Abb. 8*b*, Gbl.)

Die Organgruppen, welche nach Entfernung der Gehirnplatte mit den angrenzenden Medullarwülsten entstehen, können also als »*reduziert komplexe, regionale Induktionen*« aufgefasst werden. Es ist wahrscheinlich, dass sie vom Urdarmdach gleichzeitig determiniert worden sind, und dass nicht ein bevorzugtes Organ weiterhin für die Induktion der anderen verantwortlich ist. Vermutlich bewirkt der erste Determinationsschritt die Ausbildung einer umfangreichen Plakode, die sich dann in die verschiedenen Organanlagen gliedert. Dabei wird eine primäre Verwandtschaft der verschiedenen Plakoden im Sinne von KUPFFER vorausgesetzt (s. MANGOLD 1931*b*, S. 355), die von meinem früheren Mitarbeiter IKEDA (1938) durch viele Versuche nachgewiesen wurde.

Die gleichzeitige Determination der Organe der komplexen Induktion schliesst natürlich nicht aus, dass die einzelnen Organe sich gegenseitig beeinflussen. Dies kann nach den vielen bis jetzt vorliegenden positiven Daten als gesichert gelten (s. dazu MANGOLD 1931*b*, S. 277, IKEDA 1938, OKADA

und MIKAMI 1937, MIKAMI 1938, 1939, OKADA 1949*a*, *b*, HOLTFRETER 1951, S. 128, TEN CATE 1953, JACOBSON 1958 u. a.) und entspricht auch den Erfahrungen über die gegenseitigen Beziehungen der Organe des Achsensystems, d. h. die Beziehungen zwischen Chorda, Somiten und Neuralrohr (s. MANGOLD 1960*a*, *b*).

Eine Frage ist es, ob man die in den gehirn- und augenlosen Köpfen regelmässig auftretenden Ganglien ebenfalls als Elemente der komplexen Induktionen betrachten soll. Dies scheint mir zum mindesten nicht allgemein notwendig, weil ihnen das Charakteristische der Glieder einer komplexen Induktion fehlt, die enge räumliche Verbundenheit. Die Ganglien liegen nämlich zwischen dem Mesenchym und den anderen Geweben des Kopfes, ohne eine räumliche Verknüpfung mit den Linsen und Nasen zu zeigen. Es ist aber anzunehmen, dass Gehörblasen und bestimmte Gehirnabschnitte mit Ganglien zusammen als komplexe Induktionen auftreten können.

Solitäre Linsen: In der Hälfte aller Fälle sind nun die Linsen bei unseren gehirn- und augenlosen Köpfen ohne Begleitung von Nasen, Gehirnfragmenten und Gehörblasen vorgekommen. Ihre Nachbarschaft zeigte dabei kein typisches Bild; meist wurde sie von Mesenchym und Muskulatur gebildet; auch Knorpel und Ausbuchtungen des Kiemendarms konnten in der Nähe sein. Da diese Gewebe sich nicht vor, sondern eher nach der Linsendetermination differenzieren, ist es nicht wahrscheinlich, dass sie im differenzierten Zustand bei der Determination der Linsen eine besondere Rolle spielen. Auch JACOBSON (1958, S. 536) beobachtete solitäre Linsen.

Bilateralität der Linsenentwicklung. Auffällig ist auch das häufige Vorkommen von 2 Linsen, die als rechte und linke Linsen gedeutet werden müssen. Diese Beobachtung zeigt deutlich, dass das für die Entstehung der Linsen verantwortliche rostrale Urdarmdach eine bilaterale Ordnung aufweist, die durch den starken Ectodermverlust im allgemeinen nicht gestört wird. Diese Bilateralität wird in erster Linie durch die praechordale Platte verursacht, deren Entfernung im frühen Neurulastadium zur Bildung von Cyclopie oder hochgradiger Synophthalmie führt (MANGOLD 1936, '57, '60*a*). — In 2 Fällen waren die freien Linsen median entwickelt (An 185, 195). Dabei lagen offenbar Keime vor, bei denen das rostrale Urdarmdach nach der Operation seine bilaterale Ordnung nicht aufrecht erhalten konnte. Diese Fälle entsprechen den cyclopischen Larven, die experimentell in sehr verschiedener Weise hergestellt werden können (s. dazu die zusammenfassenden Darstellungen von ADELMANN 1936, MANGOLD 1931*b*, '57, '60*a* u. a.).

Besonders eindrucksvoll war die meist sehr gute und starke Entwicklung der Linsen. Diese lässt vermuten, dass die Umgebung nicht nur die erste Determination geleistet hat, sondern dass sie auch Faktoren enthielt, die die Polarität, die Faserdifferenzierung und das Wachstum förderten, wie dies normalerweise durch den Augenbecher geschieht (Lit. s. MANGOLD 1931*b*, S. 267 ff., LE CRON 1906, '07 u. v. a.). Diese Faktoren scheinen freilich zeitlich

begrenzt und nicht in allen Fällen gleich günstig gewesen zu sein; denn es ist kaum zweifelhaft, dass die freien Linsen relativ bald der Degeneration verfallen. Von den 10 linsenführenden Larven war die älteste 39 Tage n. d. Oper. fixiert worden; 3 weitere waren früher als 30 Tage, wiederum 3 weitere früher als 25 Tage, und wiederum 3 früher als 20 Tage n. d. Oper. konserviert worden. Die Degeneration setzte aber zweifellos oft früher als 39 Tage n. d. Oper. ein. Von besonderem Interesse scheint uns dazu die Larve An 186, die 24 Tage n. d. Oper. fixiert wurde. Sie zeigte nämlich (Abb. 10) neben einer gut erhaltenen rechten Linse (Li. r.) eine stark degenerierte linke (Li. l. d.). Da die rechte in enger Verbindung mit einer Doppelnase und einem Gehirnfragment stand und die linke keine markanten Gewebe in ihrer unmittelbaren Umgebung hatte, wird man vermuten, dass die Nase und vorderen Gehirnabschnitte die Erhaltung der Linse begünstigten. Auch die 39 Tage alte Larve zeigte eine Nase in enger Verbindung mit der Linse (Abb. 7). Auch Gehörblasen dürften entsprechend wirken. Diese Vermutung steht in Einklang mit den oben schon erwähnten Versuchen von OKADA und MIKAMI (1937) und MIKAMI (1939), die eine fördernde Wirkung von Nase, Gehörblase, Vorderhirn und anderen Geweben ergaben.

Da die Existenz fördernder Gewebe für Entstehung, Differenzierung und Wachstum der Linse nach allem kaum zweifelhaft ist, wird man auch an *linsenhemmende embryonale Anlagen und Gewebe* denken müssen. Wenn wir zu dieser Frage zwei Grundexperimente bei *Triturus alpestris* (ohne Rücksicht auf Temperatureinflüsse) vergleichen, so ergibt sich: *a)* Larven, denen die Gehirnplatte mit der angrenzenden Medullarwulst, d. h. der Anlage des Ectomesoderms, entnommen worden war, zeigten viele sehr gut differenzierte Linsen; — *b)* Larven, bei denen die primäre Augenblase oder ihre Anlage ohne Linsenanlage entfernt worden war, entwickelten auf der augenlosen Seite keine Linsen. Die Larven von *b)* besassen aber, verglichen mit denen von *a)*: 1. den Gehirnstamm und 2. das gesamte Ectomesoderm. Über den Gehirnstamm wurde schon früher ausgeführt, dass wir bei der Region des Recessus opticus und ihrer Nachbarschaft mit einer positiven Wirkung rechnen müssen; eine negative Wirkung wird aber möglicherweise von Vorderhirn, Hinterhirn und Nachhirn ausgeübt Dies wird noch experimentell zu prüfen sein. — Unser Hauptverdacht für eine linsenhemmende Wirkung fällt aber auf das Ectomesoderm, das in den lateralen Medullarwülsten liegt, im Schwanzknospenstadium unter dem Ectoderm des Kopfes nach lateral und ventral wandert und hier ausser den Visceralknorpeln Kopfmesenchym u. a. bildet (Lit. s. bei MANGOLD 1957). Eine Bestätigung dieses Verdachts könnte unser Verständnis für die mannigfachen Ergebnisse der Experimente zum Linsenproblem in günstiger Weise fördern und auch dazu beitragen, die Frage der gegenseitigen Abgrenzung der Determinationsfelder, d. h. der Bildung des Anlagemusters im Kopf, zu klären. S. dazu Nachtrag S. 172.

3. *Freie Linsen beim Versuch 2*

Beim Versuch 2 konnte festgestellt werden, dass die Epidermis-plus-Mesoderm-Mäntel der frühen Neurula in der Basis der häufig entstandenen Haftfäden in seltenen Fällen auch Lentoide entwickeln (Abb. 4 und 5). In der Normalentwicklung sind Linse und Haftfaden Nachbarorgane, da der Haftfaden dicht ventrocaudal vom Auge sich entwickelt; auch kann man bei Versuchen verschiedener Art beobachten, dass die Haftfäden dem Augenbecher distal aufsitzen. Wir können daher die Haftfäden + Lentoide unserer Epidermis-plus-Mesoderm-Mäntel als *reduziert komplexe regionale Induktionen* auffassen, bei denen aber der Haftfaden einen gewissen Vorrang hat, da er viel häufiger gebildet wird als die Lentoide. Bei den durch heterogene Induktoren induzierten freien Linsen war die Kombination mit Haftfäden am häufigsten (ca. 40% aller Fälle, BECKER s. S. 168).

Der Induktor für die Haftfaden + Lentoid-Entwicklung muss bei unserem Experiment 2 im dorsolateralen Entomesoderm liegen, das vor der Operation seitlich von der Medullarwulst gelegen hat. Dieses Entomesoderm hat eine wesentlich geringere Induktionsfähigkeit als das dorsal unter der Medullarplatte liegende Urdarmdach. Dies mag die Ursache für die seltene Entwicklung einer Linse sein. Dass Haftfäden sehr viel häufiger sind, liegt wohl daran, dass deren Entwicklung überhaupt sehr leicht auszulösen ist. Möglich ist aber auch, dass das Aktionssystem für Linse sich nicht so weit nach lateral erstreckt wie das für Haftfaden. — Erwähnt sei noch, dass als primärer Induktor erster Bedeutung für den Haftfaden das Ectomesoderm angesehen wird (s. dazu BALTZER 1950, CHEN 1952, MANGOLD 1954, S. 155 ff.). — Nicht ganz auszuschliessen ist endlich die Möglichkeit, dass der Haftfaden selbst die Bildung der Lentoide in seiner Basis induziert hat.

4. *Das Problem der Linseninduktion kurz gefasst*

Zur Frage der Linseninduktion können wir nach dem derzeitigen Stand unserer Kenntnisse folgendes kurz feststellen.

Das »Aktionssystem« ist im Neurulastadium in mehreren Organanlagen lokalisiert, nämlich: 1. im vorderen Urdarmdach, d. h. dem praechordalen Entoderm und Entomesoderm, 2. in der primären Augenblase bezw. der Retina, und 3. auch in den Nasen, in Gehirnteilen und in Gehörblasen. Alle diese Organanlagen oder Organe bilden zusammen einen »Bedingungskomplex« (MANGOLD 1954, »Regionalfaktor« BALINSKY 1948), der die Linsenentwicklung in Gang bringt und erhält. Ihre Wirkung ist *synergetisch* (SPEMANN 1936) und bildet eine *kombinative Einheitsleistung* (LEHMANN 1933). Zeit, Ausmass und Art ihrer Wirkung sind wahrscheinlich verschieden, sodass wir *Linseninduktoren 1., 2., 3. . . . Bedeutung* (MANGOLD 1960*a*) unterscheiden können.

Die Mittel ihrer Wirkung sind, wie bei der Determination des Achsensystems, wahrscheinlich chemisch und allgemeiner Art, ob auch gleich, ist fraglich.

Im »Reaktionssystem«, d. h. im Ectoderm mit der Linsenanlage, tritt die Fähigkeit, auf die Induktionsfaktoren mit der Bildung einer Linse zu reagieren, die »*Linsenpotenz*«, erst mit einem bestimmten Alter und mit der Neurulation auf, d. h. mit der determinativen Trennung von praesumptiver Epidermis einerseits und Medullarplatte + Ganglienleiste andererseits im Zuge der Wirkung des Organisators 1. Ordnung (= Entomesoderm). Die Linsenpotenz ist im späten Neurulastadium der ganzen Epidermis eigen, wird aber bald auf die eigentliche Linsenanlage *(materielle Anlage)* beschränkt (MANGOLD 1931, S. 264). Die Entstehung der Linsenpotenz zeigt auch eine gewisse Abhängigkeit von der Temperatur, bei der die Keime vor der Neurulation gehalten werden (s. TEN CATE 1953, JACOBSON 1958 u. a.).

Der nach den grundlegenden Arbeiten von SPEMANN (1901—1912) entstandene Gegensatz von »abhängiger« und »unabhängiger« Linsenentwicklung ist überholt. Es gibt wohl Linsen, die sich »abhängig oder unabhängig von der primären Augenblase« entwickeln; es gibt aber sehr wahrscheinlich keine Linsen, die vollständig ohne determinierende Einflüsse der Umgebung entstehen. Wir müssen daher die Linsenentwicklung allgemein als »abhängige Entwicklung« betrachten (s. dazu HOLTFRETER 1951, TWITTY 1955, JACOBSON 1958 u. a.).

IV. Nachtrag

Die Prüfung der *Bedeutung der Kopfganglienleiste für die Entstehung freier Linsen*, die in der Laichzeit 1960 durch meinen Mitarbeiter Dr. von WOELWARTH in meinem Auftrag durchgeführt wurde, bestätigte in überraschender Weise die Annahme einer Hemmwirkung des Ectomesoderms. Bei den Versuchen wurde *a)* die Entfernung der Gehirnplatte + Medullarwulst (s. Abb. 6) wiederholt und *b)* nur die Anlage des Gehirns und der Augen entfernt, die lateralen Medullarwülste (= Kopfganglienleiste) aber am Keim belassen. Ausserdem wurden, um Temperatureinflüsse auszuschalten, die Keime von Versuch *a)* und *b)* unter gleichen Temperaturen gehalten. Nach den bis jetzt vorliegenden Lebendbeobachtungen zeigten in den 14° C-Serien von 41 Larven ohne Ganglienleiste 36 (88%) freie Linsen, während von 41 Larven mit Ganglienleisten nur 7 (17%) solche aufwiesen. Bei den 18° C-Serien hatten von 49 Larven ohne Ggll. 20 (ca. 40%) und von 52 Larven mit Ggll. 3 (ca. 6%) freie Linsen. Bei den 23° C-Serien entwickelten von 45 Larven ohne Ggll. 21 (47%) und von 50 Larven mit Gggl. 3 (6%) freie Linsen. — Zieht man die Serien mit bzw. ohne Ggll. zusammen, so ergibt sich, daß von 135 Larven ohne Ggll. 77 (57%) und von 143 Larven mit Ggll. 13 (9%) freie Linsen entwickelten. — Die Temperaturversuche einzeln und zusammen betrachtet

zeigen also, daß die Häufigkeit der freien Linsen bei den Larven mit Ganglienleiste sehr viel geringer ist als bei den Larven ohne Ganglienleiste. *Die linsenhemmende Wirkung der Kopfganglienleiste scheint mir nach diesen Befunden von Dr. von* WOELLWARTH *gesichert.*

Zusammenfassung

1. Bei 3 verschiedenen Defektversuchen an der Neurula von *Triturus alpestris*, die Köpfe bezw. Isolate ohne Augen zur Folge hatten, traten sogenannte »freie Linsen« auf.

2. Nach grossen rostralen Ectodermdefekten in der späten Gastrula und frühen Neurula konnten Köpfe mit mehr oder weniger gut postgeneriertem Gehirnstamm, aber ohne Augen, entstehen, die (selten) dicht lateral des Recessus opticus eine freie Linse zeigten, gebildet wahrscheinlich von Ectodermzapfen und induziert vom Zwischenhirn (Abb. 1—3).

3. Die im frühen Neurulastadium abgelöste ganze Epidermis mit dem unterlagernden Entomesoderm bildet kugelige bis spindelförmige Blasen, häufig mit Haftfäden. An der Basis der Haftfäden können (selten) Lentoide entstehen, induziert vom rostrolateralen Entomesoderm (Abb. 4, 5).

4. Die Entfernung der Gehirnplatte mit der angrenzenden Medullarwulst in der Neurula führt zur Bildung von Köpfen ohne Gehirn und Augen und weitgehend ohne Visceralskelett. Vorhanden sind aber Mund, Gehörblasen und Kopfganglien. Weit rostral können Nasen, Linsen, Gehirnfragmente und auch Gehörblasen allein oder in verschiedener Kombination (Tab. 1) auftreten. Sie werden gleichzeitig als *»regionale«* und *»reduziert komplexe Induktionen«* vom rostralen Urdarmdach induziert. Auch Linsen allein treten auf *(»solitäre Linsen«)*, in medianer oder rechter und linker Lage. Ihre Lage verrät eine bilaterale Ordnung des vorderen Urdarmdachs (Abb. 6—11).

5. Die Frage der Linsendetermination wird kurz dargestellt; es werden dabei die Begriffe *»Aktionssystem«*, *»Bedingungskomplex«*, *»synergetische Entwicklung«*, *»kombinative Einheitsleistung«* und *»Reaktionssystem«* in charakteristischer Weise verwendet. (S. 171. Absatz 4). Alle Linsen (der Wirbeltiere) entwickeln sich abhängig von determinativen Einflüssen der Umgebung, und zwar *a)* vom Urdarmdach und seinen Abkömmlingen, *b)* von der primären Augenblase, und *c)* von Nase, Gehirnabschnitten, Gehörblasen u. a. — Die Kopfganglienleiste hemmt die Bildung freier Linsen (s. Nachtrag).

LITERATUR

1. ADELMANN, H. B. (1936): The problem of cyclopia. Quart. Rev. Biol. *2*, 161—184, 284—304. — 2. BALINSKY, B. T. (1948): Korrelationen in der Entwicklung der Mund- und Kiemenregion und des Darmkanals bei Amphibien. Roux' Arch. *143*, 365—395. — 3. BALTZER, F. (1950): Entwicklungsphysiologische Betrachtungen über Probleme der Homologie und Evolution. Revue Suisse Zool. *57*, 451—477. — 4. BECKER, URSULA (1955): Experimentelle Untersuchungen zum Kausalitätsproblem des Linsenbildung bei Triturus. Diss. Universität Köln. — 5. BECKER, URSULA (1959): Die Bedeutung des reagierenden Gewebes für die Ausbildung von freien Linsengebilden bei Triturus vulgaris. Roux' Arch. *151*, 188—217. — 6. BECKER, URSULA (1960): Untersuchungen über die Abhängigkeit der Linsenbildung von der Wirtsregion bei Triturus vulgaris. Roux' Arch. *152*, 339—372. — 7. TEN CATE, G. (1953): The intrinsic development of amphibian embryos. North Holland Publ. Comp. Amsterdam. — 8. CHEN, P. S. (1952): Experimental studies on the induction of the sucker in Bombinator pachypus (homoplastic and xenoplastic transplantation). Roux' Arch. *145*, 462—496. — 9. DETWILER, S. R. (1951): Further experimental observations on the differentiation of the otic vesicle in Amblystoma. J. Exp. Zool. *116*, 415—430. — 10. GALLERA, J. (1949): Transplantation de matériel inducteur céphalique du Triton prélevé durant la gastrulation et les premiers stades de la neurulation. Arch. d'Anat. d'Hist. et d'Embr. *32*, 121—172. — 11. GALLERA, J. (1952): Inductions céphaliques dans l'ectoblaste vieillissant (Triturus alpestris). Roux' Arch. *146*, 21—67. — 12. HOLTFRETER, J. (1934)a: Der Einfluss thermischer, mechanischer und chemischer Eingriffe auf die Induzierfähigkeit von Triton-Keimteilen. Roux' Arch. *132*, 225—306. — 13. HOLTFRETER, J. (1934)b: Über die Verbreitung induzierender Substanzen und ihre Leistungen im Triton-Keim. Roux' Arch. *132*, 307—383. —

14. HOLTFRETER, J. (1935): Morphologische Beeinflussung des Urodelenectoderms bei xenoplastischer Transplantation. Roux' Arch. *133*, 367—426. — 15. HOLTFRETER, J. (1938): Veränderungen der Reaktionsweise im alternden isolierten Gastrulaectoderm. Roux' Arch. *138*, 163—196. — 16. HOLTFRETER, J. (1951): Some aspects of embryonic induction. Growth, Sympos. vol. *10*, 117—152. — 17. JACOBSON, A. G. (1955): The roles of the optic vesicle and other head tissues in lens induction. Proc. Nat. Ac. Sci. *41*, 522—525. — 18. JACOBSON, A. G. (1958): The roles of neural and non-neural tissues in lens induction. J. Exp. Zool. *139*, 525—557. — 19. IKEDA, Y. (1938): Über die wechselseitigen Beziehungen der Sinnesorgane untereinander in ihrer normalen und experimentell bedingten Entwicklung. Anat. Inst. Jap. Univ. Sendai *31*, 1—44. — 20. KUPFFER, C. VON (1893—1900): Studien zur vergleichenden Entwicklungsgeschichte des Kopfes der Kranioten. Heft. 1—4. — 21. LECRON, W. L. (1906): Experiments on the origin and differentiation of the lens in Amblystoma. Amer. J. Anat. *5* (1. p. XI) Proc. Assoc. Amer. Anat. — 22. LECRON, W. L. (1907): Experiments on the origin and differentiation of the lens in Amphibia. Amer. J. Anat. *6*, 245—258. — 23. LEHMANN, F. E. (1933): Das Prinzip der kombinativen Einheitsleistung in der Biologie, im besonderen in der experimentellen Entwicklungsgeschichte, und seine Beziehung zur Gestalttheorie. Biol. Zentralbl. *53*, 471—496. — 24. LEHMANN, F. E. (1945): Einführung in die physiologische Embryologie. Verlag Birkhäuser, Basel. — 25. LIEDKE, KATHE B. (1951): Lens competence in Amblystoma punctatum. J. Exp. Zool. *117*, 573—591. — 26. LIEDKE, KATHE, B. (1955): Studies on lensinduction in Amblystoma punctatum. J. Exp. Zool. *130*, 353—279. — 27. MANGOLD, O. (1931)a: Versuche zur Analyse der Entwicklung des Haftfadens bei Urodelen; ein Beispiel für die Induktion artfremder Organe. Naturwiss. *19*, 905—911. — 28. MANGOLD, O. (1931)b: Das Determinationsproblem. III. Das Wirbeltierauge in der Entwicklung und Regeneration. Erg. d. Biol. *7*, 193—403. — 29. MANGOLD, O. (1933)a: Isolationsversuche zur Analyse der Entwicklung bestimmter Kopforgane. Naturwiss. *21*, 394—397. — 30. MANGOLD, O. (1933)b: Über die Induktionsfähigkeit der verschiedenen Bezirke der Neurula von Urodelen. Naturwiss. *21*, 761—766. — 31. MANGOLD, O. (1936): Experimente zur Analyse der Zusammenarbeit der Keimblätter. Naturwiss. *24*, 753—760. — 32. MANGOLD, O. (1954): Entwicklung und Differenzierung der praesumptiven Epidermis und ihres unterlagernden Entomesoderms aus der Neurula von Triton alpestris als Isolat. Roux' Arch. *147*, 131—170. — 33. MANGOLD, O. (1955): Kopfformen von Triton-Larven nach teilweiser und ganzer Entfernung der Gehirnplatte und des angrenzenden Medullarwulstes im Nerulastadium. Roux' Arch. *148*, 123—178. — 34. MANGOLD, O. (1957): Experimente zur Entwicklungsphysiologie des Urodelenkopfes. Verh. d. Anat. Ges. 54. Vers. Freiburg i. Br. 3—53. — 35. MANGOLD, O. (1960)a: Grundzüge der Entwicklungsphysiologie der Wirbeltiere mit besonderer Berücksichtigung der Missbildungen, auf Grund experimenteller Arbeiten an Urodelen. in: Luigi Gedda, Trattato di Genetica Medica Roma (im Druck). — 36. MANGOLD, O. (1960)b: Molchlarven ohne Zentralnervensystem und ohne Ectomesoderm. Roux' Arch. *152*, 725—769. — 37. MANGOLD, O.—WOELLWARTH, C. v. (1950): Das Gehirn von Triton. Ein experimenteller Beitrag zur Analyse seiner Determination. Naturwiss. *37*, 365—372, 390—395. — 38. MIKAMI, Y. (1938): Experiments on the formation of free lenses in Triturus pyrrhogaster, with special reference to Harrison's experimental results in Amblystoma. Proc. Imp. Acad. Tokyo *14*, 195—197. — 39. MIKAMI, Y. (1939): Lens induction in the urodelan Triturus with special reference to the free formation of the lens. Mem. Coll. Sci. Kyoto, Ser. B, *15*, 136—157. — 40. OKADA, YO K. (1949)a: The factors responsible for the so-called free lens. I. Limitations on the capacity of the nose to induce lens. Proc. Japan. Acad. *25*, 45—50. — 41. OKADA, YO K. (1949)b: The factors responsible for the so-called free lens. II. Significance of the implanted tissue in the abnormal induction of lens. Proc. Jap. Acad. *25*, 51—57. — 42. OKADA, YO K.—MIKAMI, Y. (1937): Inductive effects of tissues other than retina on the presumptive lens epithelium. Proc. Imp. Acad. Tokyo *13*, 283—285. — 43. RAUNICH, L. (1940): Espianti di territorio lentogeno da neurule di Axolotl. Analisi critica di risultati. Monitore Zool. Ital. *51*, 155—161. — 44. ROTMANN, E. (1942): Zur Frage der Leistungsspezifität abnormer Induktoren. Naturwiss. *30*, 60—62. — 45. SPEMANN, H. (1901)a: Demonstration einiger Präparate von Experimenten über Korrelationen bei der Entwicklung des Auges. Sitzgber. physik.-med. Ges. Würzburg vom 2. Mai 1901. — 46. SPEMANN, H. (1901)b: Über Korrelationen in der Entwicklung des Auges. Verh. Anat. Ges. 15. Vers. Bonn. 61—79. — 47. SPEMANN, H. (1912): Zur Entwicklung des Wirbeltierauges. Zool. Jahrb. *32*, 1—98. — 48. SPEMANN, H. (1931): Neue Arbeiten über Organisatoren in der tierischen Entwicklung. Naturwiss. *15*, 946—951. — 49. SPEMANN, H. (1936): Experimentelle Beiträge zu einer Theorie der Entwicklung. Verl. J. Springer, Berlin. — 50. TOIVONEN, S. (1940): Über die Leistungsspezifität der abnormen Induktoren im Implantatversuch bei Triton. Ann. Acad. Sci. Fenn. Ser. A, *55*, 1—150. — 51. TOIVONEN, S. (1945): Zur Frage der Induktion selbständiger Linsen durch abnorme Induktoren im Implantatversuch. Ann. Zool. Soc., Zool. Bot. Fenn. Vanamo. *11*,

1—28. — 52. Twitty, V. C. (1928): Experimental studies on the ciliary action of amphibian embryos. J. Exp. Zool. *50*, 319—344. — 53. Twitty, V. C. (1955): Eye. in: Analysis of Development by Willier, Weiss and Hamburger. 202—214. W. B. Saunders Comp. Philadelphia. — 54. Yntema, C. L. (1955): Ear and Nose. in: Willier, Weiss and Hamburger, Analysis of Development. 415—428. W. B. Saunders Comp. Philadelphia.

СВОБОДНЫЕ ХРУСТАЛИКИ В БЕЗГЛАЗНЫХ ГОЛОВАХ И ИЗОЛИРОВАННЫХ ЧАСТЯХ АЛЬПИЙСКОГО ТРИТОНА (TRITURUS ALPESTRIS

О. МАНГОЛЬД

1. При 3 различных экспериментах по нанесению повреждения на нейрулы альпийского тритона (**Triturus alpestris**) в результате которых были получены головы или же изолированные части без глаз, появились так наз. «свободные хрусталики».

2. После нанесения крупных ростральных повреждений эктодермы в поздней стадии гаструлы и в ранней стадии нейрулы возникали головы с послезарожденным, более или менее хорошим стволом мозга, однако, без глаз, которые (в редких случаях) непосредственно латерально от зрительного углубления имели свободный хрусталик, образованный предположительно из эктодермальной колбочки, и индуцированный межуточным мозгом.

3. Весь эпидермис, отслоенный в ранней стадии нейрулы, вместе с нижлежащей энтомезодермой образует шарообразные до веретенообразные пузырьки, часто с прикрепляющими нитями. На основании прикрепляющих нитей могут (редко) образовываться лентоиды, индуцированные ростро-латеральной энтомезодермой.

4. Удаление мозговой пластинки вместе с прилегающим медуллярным валиком в стадии нейрулы приводит к образованию голов без мозга и глаз, и часто без висцерального скелета, причем, однако, налицо рот, слуховые пузырьки и головные ганглии. Ростральнo могут появляться носы, хрусталики, фрагменты мозга, как и слуховые пузырьки отдельно или в различных комбинациях. Они индуцируются одновременно как «региональные» или «редуцированно комплексные индукции» ростральной крышы зародышевой кишки. Хрусталики появляются также отдельно («одиночный хрусталик»), в медиальном, правом или левом положениях. Их положение указывает на двухстороннее распределение крышы зародышевой кишки.

5. Дается краткое изложение вопроса определения хрусталиков, причем характерным образом применяются понятия «система активности», «условный комплекс», «синергетическое развитие», «комбинативная единичная функция», и «система реакций» (см. абзац 4.). Все хрусталики (позвоночных) развиваются в зависимости от определительных влияний окружающей среды, а именно: а) из крышы зародышевой кишки и ее потомков, б) из первичного глазного пузыря, и в) из носа, участков мозга, слуховых пузырьков и т. д.

FREE LENSES IN EYELESS HEADS AND ISOLATES OF TRITURUS ALPESTRIS

O. MANGOLD

(1) The appearance of so-called free lenses was observed in three different defect experiments on the neurula of *Triturus alpestris* in which eyeless heads and other isolates were obtained.

(2) Large rostral ectodermal defects in the late gastrula or early neurula were sometimes followed by the appearance of heads which had a more or less developed postgenetic brain stem but no eyes. Occasionally, these heads displayed a free lens close to the optic recess which was probably of ectodermal origin and induced by the diencephalon.

(3) Detached in the early neurula stage, the whole epidermis together with the underlying entomesoderm forms spherical or spindle-shaped vesicles which are often provided with threadlike processes. Induced by the rostrolateral entomesoderm, lentoids are occasionally formed at the base of the threads.

(4) A removal of the brain plate and the adjacent medullary ridge from the neurula leads to the formation of heads without brain and eyes, and mostly without visceral skeleton, but with mouth, auditory vesicles and head ganglia. Rostrally, noses, lenses, cerebral frag-

ments and auditory vesicles may appear either separately or in different combinations. Induced by the rostral archenteric roof, they are both "regional" and "reduced complex inductions". There appear also solitary lenses in the middle, on the right or on the left side. Their position points to a bilateral arrangement of the anterior archenteric roof.

(5) The problem of lenticular determination is briefly presented. The concepts "action system", "condition complex", "synergetic development", "combinative unit performance" and "reaction system" are applied and defined. The evolution of lenses in vertebrates depends on determinative influences of the environment, namely on *(a)* the archenteric roof and its derivatives; *(b)* the primitive optic vesicle; *(c)* the nose, brain fragments, auditory vesicles, etc

Prof. Dr. Otto MANGOLD, Heiligenberg, Kreis Überlingen (Bodensee), Deutschland

Institut d'Histologie et d'Embryologie de l'Université de Lausanne, Suisse
(Directeur: Professeur Dr. OTTO BUCHER)

A PROPOS DU RYTHME FONCTIONNEL CELLULAIRE DANS LES REINS

O. BUCHER

(Reçu le 20. juin 1960)

Pour bien des auteurs, la conception selon laquelle — dans un rein qu n'est pas trop chargé — une partie seulement des néphrons travaillerait en même temps, a perdu son caractère d'hypothèse. Mais s'agit-il vraiment d'une notion dûment acquise?

A la base de cette théorie se trouvent des observations épiscopiques sur des reins de grenouilles vivantes. A. N. RICHARDS et C. F. SCHMIDT (1924) avaient constaté une certaine intermittence dans la circulation glomérulaire. Selon ces chercheurs, les glomérules qui sont traversés par le sang et qui, en conséquence, fonctionnent à un moment donné, ne représenteraient qu'une fraction du nombre total des glomérules. Des indications analogues, après injection de fluorescéine à des grenouilles également, ont été publiées par PH. ELLINGER et A. HIRT (1929, 1930). Ensuite, malgré des avis opposés (cf. H. L. WHITE, 1939, par exemple), ces observations ont petit à petit été généralisées, ainsi, entre autres, par C. CHAMPY (1947): «Le fonctionnement des tubes rénaux ne paraît pas synchrone. Normalement 50—60% seulement des glomérules paraissent déployés et bien gonflés de sang; les autres ont leur peloton vasculaire ratatiné».

A première vue, les expériences avec des colorants vitaux électronégatifs, comme le bleu trypan, semblaient confirmer l'hypothèse en question, puisque l'on peut voir dans une préparation, au moins au début de l'essai, une partie des coupes des segments initiaux fortement colorée, une autre partie qui l'est faiblement ou éventuellement pas du tout. Cependant, grâce à l'isolation des néphrons, on a appris que ceux-ci ont tous fonctionné, mais que l'athrocytose commence dans la partie proximale du segment pour s'étendre lentement plus loin — et dans tous les néphrons parallèlement — si l'élimination du colorant par l'urine se prolonge (W. VON MÖLLENDORFF, 1930, et autres). Les résultats de la coloration vitale n'appuient donc pas, contrairement à ce qu'avait pensé R. HEIDENHAIN en 1874 déjà, la conception d'un fonctionnement alternant, mais montrent plutôt que tous les néphrons travaillent uniformément. On pourrait éventuellement objecter à cela que l'injection d'un colorant vital

provoque aussi une certaine diurèse qui, elle, serait la cause d'une activation temporaire de tous les néphrons (W. VON MÖLLENDORFF 1941).

De temps à autre, depuis bientôt un siècle, ont paru des publications qui affirment l'existence d'anastomoses artério-veineuses dans les reins. Les travaux de R. SPANNER (1937, 1938) surtout ont eu un grand retentissement. Se fondant sur des préparations avec injection des vaisseaux, cet auteur avait décrit des anastomoses dans le sinus rénal, dans la région corticale (entre les artères et les veines corticales radiées), et dans la capsule rénale. La présence de telles anastomoses artério-veineuses, par la suite beaucoup plus souvent contestée que confirmée (pour la littérature cf. H. W. SMITH 1951 et M. CLARA 1956), cadrait bien avec l'interprétation de l'appareil juxtaglomérulaire comme dispositif réglant l'irrigation sanguine du glomérule et l'ultrafiltration glomérulaire (cf. par exemple N. GOORMAGHTIGH 1937, W. VON MÖLLENDORFF 1941, H. BECHER 1949. O. BUCHER et E. ZIMMERMANN 1960) ainsi qu'avec la conception de l'activité intermittente des néphrons. Néanmoins, selon l'opinion actuelle des experts, l'existence d'anastomoses artério-veineuses dans les reins n'est pas irréfutablement prouvée (M. CLARA 1956, A. VON KÜGELGEN, K. J. OTTO, B. KUHLO und W. KUHLO 1959) ou, s'il y en avait, elles ne seraient que de moindre signification. Les résultats de la clearance démontrent que le 8% du sang rénal au maximum peut atteindre directement le système veineux sans passage glomérulaire, et dans ce 8% est compris le sang traversant les vaisseaux des capsules fibreuse et adipeuse du rein, du sinus rénal ainsi que du bassinet (H. W. SMITH 1951).

Prenant en considération les faits que nous venons de résumer, très succinctement il est vrai, on n'est donc pas étonné que l'un des plus éminents spécialistes de la physiologie rénale, H. W. SMITH (1951 et 1957), ait abandonné la théorie de l'intermittence fonctionnelle des néphrons, précisant que tous les néphrons travaillent simultanément et uniformément, bien que ce ne soit pas nécessairement à leur rendement maximal (voir aussi D. D. THOMPSON et collaborateurs 1951 ainsi que B. OCHWADT 1959).

*

Nous sommes arrivés à la même conclusion, mais pour de toutes autres raisons (cf. aussi O. BUCHER 1960). En effet, lors de nos *recherches caryométriques*, nous avons constaté que, dans les segments initiaux (tubes contournés proximaux) et dans les segments intermédiaires (tubes contournés distaux), les différences des tailles nucléaires étaient sensiblement plus grandes *entre les diverses cellules* des néphrons envisagés qu'*entre les différents néphrons*. De toute une série d'expérience (voir thèse J.-A. ANTONIOLI 1960), nous avons pris, à titre d'exemple, quelques résultats obtenus des reins de 4 rats afin d'illustrer notre observation (tableau 1). Pour mettre en relief la dispersion

Tableau 1

Dispersion (intervalle de variation et variance) des tailles nucléaires de néphrons donnés ainsi que des tailles nucléaires moyennes de néphrons différents. Segments initiaux et intermédiaires de reins de rats; 2 animaux témoins (numéros 5 et 6) et 2 animaux soumis à une diurèse expérimentale (numéros 11 et 12)

Partie des néphrons	Essai (et numéro de l'animal)		Tailles nucléaires dans néphrons donnés				Tailles nucléaires moyennes de néphrons différents				Taille nucléaire moyenne[4] $\bar{x}$		Nombre des noyaux évalués N
			intervalle de variation[1]		variance[1] s^2		intervalle de variation[2]		variance[3] s^2				
Segments initiaux	témoin	(5)	36,7	*37,0*	221,3	*221,9*	24,0	*20,4*	133,7	*93,2*	132,5	*131,5*	100
		(6)	37,3		222,5		16,9		52,7		130,5		100
	diurèse	(11)	29,5	*27,9*	167,0	*151,7*	34,5	*30,9*	188,8	*153,5*	140,0	*139,7*	100
		(12)	26,3		136,5		27,3		118,2		139,4		100
Segments intermédiaires	témoin	(5)	31,1	*33,0*	186,3	*217,3*	13,4	*11,9*	37,7	*30,2*	108,7	*108,0*	100
		(6)	35,0		248,4		10,4		25,6		107,4		100
	diurèse	(11)	23,5	*24,0*	101,7	*98,6*	21,0	*19,0*	97,9	*76,6*	118,5	*117,4*	100
		(12)	24,5		95,5		17,0		55,3		116,3		100

1. Chaque chiffre représente la moyenne de respectivement 20 et 40 néphrons pour chacun desquels on a mesuré 5 noyaux dans la même coupe du segment indiqué.
2. Chaque chiffre est la moyenne de respectivement 4 et 8 groupes de 5 néphrons.
3. Chaque chiffre indique, pour les segments en question, la variance des tailles nucléaires moyennes de respectivement 20 et 40 néphrons.
4. La taille nucléaire moyenne est indiquée en mm^2, les noyaux ayant été dessinés à un agrandissement linéaire de 2300 fois et ensuite planimétrés.

des tailles nucléaires, nous avons calculé l'intervalle de variation et la variance pour chaque animal et pour les deux tubes urinaires en question.

La caractéristique la plus simple pour exprimer la dispersion est l'intervalle de variation, c'est-à-dire la différence entre les valeurs extrêmes de la variable étudiée (en l'occurrence la grandeur nucléaire). L'intervalle de variation présente cependant l'inconvénient de se baser uniquement sur les valeurs extrêmes qui, pour une raison ou une autre, peuvent une fois être exceptionnelles voire accidentelles. C'est pourquoi nous avons aussi calculé la variance s^2 selon la formule:

$$s^2 = \frac{\Sigma (f \cdot x^2) - \bar{x} \cdot \Sigma (f \cdot x)}{N - 1}$$

dans laquelle f représente la fréquence et x les tailles nucléaires mesurées dont $\bar{x}$ est la moyenne arithmétique; N indique le nombre des mesure individuelles considérées. Ajoutons encore que, en tirant la racine carrée de la variance s^2, on arrivera à un autre paramètre, appelé écart-type.

Or, le tableau 1 nous démontre nettement que l'on trouve une dispersion des tailles nucléaires beaucoup plus grande en les comparant dans un tube donné qu'en faisant la comparaison entre des néphrons différents. Cette constatation parle contre la conception d'un fonctionnement intermittent d'une certaine importance des néphrons. En revanche, la variation considérable des grandeurs nucléaires au sein des néphrons fait penser à un rythme fonctionnel de leurs cellules; des observations morphologiques, sur lesquelles nous reviendrons tout à l'heure, nous semblent également appuyer cette nouvelle hypothèse de travail.

Si la variation volumétrique des noyaux dans les segments initiaux et intermédiaires est due au fait que leurs cellules ne travaillent pas simultanément et uniformément dans un rein, dont on ne demande pas un plein rendement, il faudra admettre que la dispersion des tailles nucléaires sera réduite dans l'organe surchargé, où une mise en train de toutes les cellules est nécessaire. Un coup d'oeil sur le tableau 1 nous confirme que cela est effectivement le cas: dans les reins soumis à une diurèse expérimentale, l'intervalle de variation et la variance des grandeurs nucléaires dans les néphrons étudiés ont diminué de façon significative par rapport aux reins des animaux témoins.

La diurèse a été provoquée par des injections sous-cutanées de solution de Tyrode sans glucose, diluée dans le rapport de 1 à 3. Les animaux en question ont reçu quatre injections entre 9 et 17 heures et ont été tués, comme les animaux témoins, à 18 heures; le total de la solution saline injectée équivalait à 10% du poids corporel. Pour avoir de plus amples détails sur ces essais, on lira la thèse de J.-A. ANTONIOLI.

Il n'est pas surprenant de constater un agrandissement de la taille nucléaire moyenne (gonflement nucléaire fonctionnel) dans les segments initiaux et intermédiaires des reins surchargés (cf. O. BUCHER et CL. GAILLOUD 1958). Par contre, nous avons été frappés par le fait que la dispersion des grandeurs nucléaires moyennes des divers néphrons y est augmentée. A propos de ce résultat plutôt inattendu, que nous aimerions encore vérifier par des expériences à plus grande échelle, nous n'oserions encore tenter une interprétation.

En outre, nous sommes convaincus que le rythme fonctionnel cellulaire est fortement influencé par un rythme diurne, — problème qui est actuellement aussi en voie d'étude dans notre institut.

*

Les *études morphologiques et histochimiques* des tubes rénaux produisent également des résultats qui parlent en faveur de la thèse d'un rythme fonctionnel cellulaire. Aussi, dans des préparations ordinaires colorées à l'hématoxyline-éosine ou à l'azan, trouve-t-on souvent, dans les mêmes coupes de tubes,

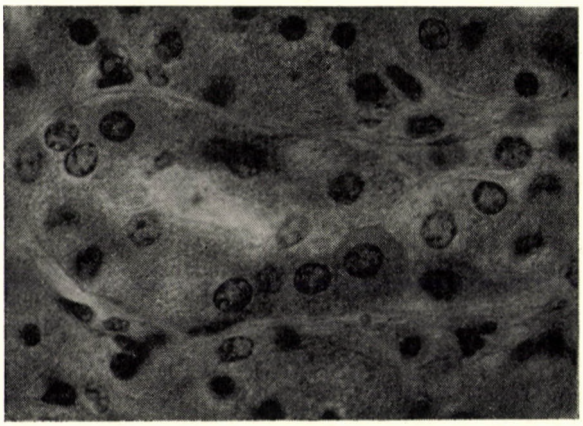


Fig. 1. Segment initial (partie contournée) d'un rein humain. Cellules d'aspect inégal représentant des stades fonctionnels différents. Fixation: «Susa» d'après Heidenhain, 10 μ, coloration: hématoxyline-éosine

des cellules d'aspect différent, par exemple quant à la structure et à la coloration du cytoplasme, comme le montre la figure 1 (rein humain). Des observations analogues se font sur des reins qui ont été soumis à toutes sortes de réactions histochimiques.

R. Bachmann et U. Bölke (1955), qui ont avant tout travaillé sur des cobayes et avec la réaction au PAS (acide périodique-Schiff), ont également vu des images de comportement alternatif des cellules épithéliales dans les mêmes coupes de segments initiaux. Les différences structurales en question concernent la bordure en brosse et les granulations PAS-positives du corps cellulaire, et ces auteurs pensent avoir affaire à des stades fonctionnels différents. Nous partageons cette opinion, qui correspond à nos propres constatations, et nous ne pensons pas qu'il soit justifié de distinguer un ou plusieurs types cellulaires dans une même coupe d'un segment donné.

En revanche, nous savons naturellement qu'un segment initial, par exemple, peut être subdivisé en plusieurs portions de différenciation cellulaire spécifique, comme cela a déjà été avancé par W. VON MÖLLENDORFF (1930) et confirmé par bien des travaux histochimiques (cf. F. S. SJÖSTRAND 1944, J. B. LONGLEY et E. R. FISCHER 1954, P. VAN WETTER 1955, G. MÜLLER 1956, et autres). Aussi peut-on trouver, dans la substance corticale du rein, des coupes de segments initiaux d'aspect inégal, sans que ce fait ait la moindre corrélation avec une activité intermittente des néphrons.

Nous sommes en train de compléter nos travaux sur le rein par des recherches faites au microscope électronique dont nous relaterons les résultats ultérieurement. Toutefois, nous pouvons mentionner dès maintenant que les photographies prises au microscope électronique montrent de temps en temps des différences structurales notables entre des parties comparables de cellules voisines, le plus souvent des différences de densité de la structure protoplasmique.

Dans une publication, qui traite en premier lieu du pancréas du cobaye et de la névroglie médullaire de la souris blanche, mais qui mentionne également, entre autres organes, les tubes contournés proximaux du rein humain, E. WÜSTENFELD (1955) a insisté sur un certain dimorphisme nucléaire, une partie des noyaux étant plus claire, une partie plus foncée. D'après cet auteur, dans un organe «au repos», les noyaux sombres sont plus grands et se trouvent plus fréquemment que les noyaux clairs, tandis que, lors d'une stimulation fonctionnelle, la taille et le pourcentage des noyaux clairs augmentent et finissent par dépasser ceux des noyaux foncés. Les différences de coloration des noyaux seraient donc en rapport avec l'état fonctionnel des cellules.

A ce point de vue, nous avons également étudié quelques reins humains ainsi qu'un grand nombre de reins animaux (rats et souris), en partie surchargés expérimentalement. Toutefois, en ce qui concerne cet organe, nous n'avons pas eu de résultat concluants, permettant de confirmer l'opinion de WÜSTENFELD à propos des noyaux foncés. Dans les segments surchargés des néphrons, les noyaux sont bel et bien agrandis; cependant, dans tous les reins, les noyaux foncés sont rares à condition que l'organe ait été fixé immédiatement après la mort (cf. O. BUCHER 1959).

En revanche, nous avons constaté dans le comportement des nucléoles des variations qui pourraient fort bien être en relation avec le rythme fonctionnel cellulaire, mais cette question n'a pas encore été examinée systématiquement.

Résumé

L'auteur discute l'hypothèse de l'intermittence de l'irrigation glomérulaire et du travail intermittent des néphrons. Il ne croit pas que cette conception soit suffisamment étayée par des faits dûment acquis. Des recherches caryométriques ainsi que des études morphologiques et histochimiques font plutôt penser à un certain rythme fonctionnel des cellules au sein des néphrons. De plus, il existe sans doute aussi un rythme diurne.

BIBLIOGRAPHIE

1. ANTONIOLI, J.—A.: (1960) Recherches caryométriques sur l'histophysiologie du rein. II. Le comportement des segments initiaux et intermédiaires du rein de rat lors de surcharge hydrique (Thèse de doctorat, Lausanne 1959). Biol. lat. *13*, 369—388. — 2. BACHMANN, R., und BÖLKE, U.: (1955) Die mit Perjodsäure-Leukofuchsin-Reaktion darstellbaren Strukturen der Niere von Meerschweinchen und Kaninchen (speziell Sphäroidkörperchen). Z. Zellforsch. *42*, 423—438. — 3. BECHER, H.: (1949) Die gestaltlichen Grundlagen der Strombahnsteuerung am Gefässpol der Malpighischen Körperchen in der menschlichen Niere. Aerztl. Forsch. *3*, 351—367. — 4. BUCHER, O.: (1959) Karyometrische Untersuchungen an menschlichen Nieren sowie einige allgemeine Bemerkungen über Kernmessungen an Nieren. Z. mikr.-anat. Forsch *65*, 180—199. — 5. BUCHER, O.: (1960) Beitrag zu den karyometrischen Untersuchungen an Nieren. Z. mikr.-anat. Forsch. *66* (sous presse). — 6. BUCHER, O., und GAILLOUD, CL.: (1958) Zum Verhalten der Zellkerne bei verschiedenen Funktionszuständen der Nierenkanälchen. Bull. schweiz. Akad. med. Wiss. *14*, 254—272. — 7. BUCHER, O., et ZIMMERMANN, E.: (1960 A propos de la macula densa du rein. Acta anat. *42*, 352—371. — 8. CHAMPY, C.: (1947) Histologie de l'appareil urinaire. Encyclopédie médico-chirurgicale, 18000 B. — 9. CLARA, M.: (1956) Die arterio-venösen Anastomosen. Springer, Wien. — 10. ELLINGER, PH., und HIRT, A.: (1929, 1930) Mikroskopische Untersuchungen an lebenden Organen. II. und III. Zur Funktion der Froschniere. Arch. exper. Path. *145*, 193—210, und *150*, 285—297. — 11. GOORMAGHTIGH, N.: (1937) L'appareil neuro-myo-artériel juxtaglomérulaire du rein; ses réactions en pathologie et ses rapports avec le tube urinifère. C. R. Soc. Biol. (Paris) *124*, 293—296. — 12. HEIDENHAIN, R.: (1874) Mikroskopische Beiträge zur Anatomie und Physiologie der Nieren. Arch. mikr. Anat. *10*, 1—50. — 13. LONGLEY, J. B., and FISHER, E. R.: (1954) Alkaline phosphatase and the Periodic Acid Schiff reaction in the proximal tubule of the vertebrate kidney. Anat. Rec. *120*, 1—21. — 14. MÖLLENDORFF, W. VON: (1930) Der Exkretionsapparat. II. Die Niere. Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen VII/1. — 15. MÖLLENDORFF, W. VON: (1941) Ueber lokale Arbeitsregulatoren in der Niere des Menschen. Jahreskurse Aerztl. Fortbildung *32*. XII/37—44. — 16. MÜLLER, G.: (1956) Die mit der Hale-PAS-Reaktion nachweisbare Differenzierung des Nephrons. Acta histochem. *2*, 279–285. — 17. RICHARDS, A. N., and SCHMIDT, C. F.: (1924) A description of the glomerular circulation in the frog's kidney and observations concerning the action of adrenalin and various other substances upon it. Am. J. Physiol. *71*, 178—208. — 18. SJÖSTRAND, F. S.: (1944) Ueber die Eigenfluoreszenz tierischer Gewebe mit besonderer Berücksichtigung der Säugetierniere. Acta anat., *Suppl. 1*, 1—163. — 19. SPANNER, R.: (1937) Der Abkürzungskreislauf der menschlichen Niere; Beitrag zur Kenntnis der Leistungszweiteilung ihres Gefässsystems. Klin. Wschr. *16*, 1421—1423. — 20. SPANNER, R.: (1938) Ueber Gefässkurzschlüsse in der Niere. Anat. Anz. *85*, Erg.—Bd., 81—90. — 21. SMITH, H. W.: (1951) The kidney. Oxford University Press, New York. — 22. SMITH, H. W.: (1957) Principles of renal physiology. Oxford University Press, New York. — 23. WETTER, P. VAN: (1955) Différenciation de trois zones dans le tube contourné du rein de la souris mâle par la réaction de Gomori pour la phosphatase alcaline. Ann. Endocrinol. *16*, 386—389. — 24. WHITE, H. L: (1939) Observations indicating absence of glomerular intermittence in normal dogs and rabbits. Am. J. Physiol. *128*, 159—168. — 25. WÜSTENFELD, E.: (1955) Variationsstatistische Untersuchungen über bemerkenswerte Grössenunterschiede «heller» und «dunkler» Zellkerne. Z. Zellforsch. *41*, 361—371. — 26. KÜGELGEN, A. VON, OTTO, K. J., KUHLO, B., und KUHLO, W.: (1959) Die Gefässarchitektur der Niere. G. Thieme, Stuttgart. — 27. OCHWADT, B.: (1959) Nierendurchblutung und Diurese. In »Diurese und Diuretica«. Springer, Berlin. — 28. THOMPSON, D. D. BARRETT, M. J. and PITTS, R. F.: (1951) Significance of Glomerular Perfusion in Relation to Variability of Filtration Rate. Am. J. Physiol. *167*, 546—552.

О ФУНКЦИОНАЛЬНОМ КЛЕТОЧНОМ РИТМЕ В ПОЧКАХ

О. БУХЕР

Обсуждается гипотеза о переменном протекании крови через клубочки и о рабочем ритме нефронов. По мнению автора это воззрение недостаточно подкрепляется неопровержимыми фактами. Кариометрические, как и морфологические и гистохимические исследования указывают скорее на определенный клеточный ритм функции в рамках нефронов. Впрочем, несомненно существует также суточный ритм.

ÜBER DEN ZELLULÄREN ARBEITSRHYTHMUS IN DEN NIEREN

O. BUCHER

Der Verfasser diskutiert die Hypothese der abwechslungsweisen Durchströmung der Glomeruli und des Arbeitsrhythmus der Nephrone. Er glaubt nicht, daß diese Auffassung durch unumstössliche Tatsachen genügend gesichert ist. Karyometrische sowie morphologische und histochemische Untersuchungen lassen eher an einen gewissen zellulären Funktionsrhythmus im Rahmen der Nephrone denken. Im übrigen besteht zweifellos auch ein 24-Stunden Rhythmus.

Prof. Dr. Otto BUCHER, Rue du Bugnon 9, Lausanne, Suisse

Лаборатория эмбриологии Ленинградского Университета и лаборатория экспериментальной и сравнительной эмбриологии Мурманского Морского Биологического Ин-та АН СССР (зав.: проф. Б. П. Токин)

РЕГЕНЕРАЦИЯ, СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ И СОПУТСТВУЮЩИЕ ИМ ЯВЛЕНИЯ У LAOMEDEA FLEXUOSA И У НЕКОТОРЫХ ДРУГИХ НИЗШИХ COELENTERATA

Б. П. ТОКИН, Ф. Н. ЕРИЧЕВА и Е. И. КАЛИНИНА

(Поступило в редакцию: 22 июня, 1960 г.)

I. Регенерация и соматический эмбриогенез у Laomedea flexuosa Hincks

Токиным Б. П. (1959) дано обоснование необходимости разграничения явлений восстановления организмами утраченных частей (регенерация) и явлений развития целых организмов из соматических клеток (соматический эмбриогенез).

Как по своему генезису, так и по характеру протекания, процессы соматического эмбриогенеза и процессы регенерации принципиально различны. Необходимой морфо-физиологической основой соматического эмбриогенеза является дезинтеграция соответствующих тканей, радикальная перестройка исходных клеточных систем. Для нормальных процессов регенерации требуется сохранение остатка регенерирующего органа с типичной интеграцией тканевых систем, с сохранением нормальных «замков корреляций» между клетками.

Распространенное представление об исключительных «регенерационных» способностях губок и кишечнополостных должно быть пересмотрено, так как эту способность обычно иллюстрируют не явлениями регенерации, а процессами соматического эмбриогенеза: известные опыты по развитию губок после их диссоциации на клетки (после протирания сквозь «сито»), развитие гидр из 1/200 части их тела и т. д.

Токин обосновал положение о том, что наименее интегрированным организмам в большей степени свойственны явления бесполого размножения и что соматический эмбриогенез легче вызвать у организмов, коим свойственно бесполое размножение. Необходимо с этой точки зрения дать анализ имеющихся литературных данных и провести исследования, которые дали бы возможность (в пределах отдельных типов и для всех животных) сопоставить регенераторные возможности, а также способность к соматическому эмбриогенезу с уровнем интеграции организмов.

Кажется парадоксальным, что явления собственно регенерации у морских кишечнополостных крайне мало изучены. Имеются лишь единичные работы. Берилл и Давидсон (**Berill H. Y. and Davidson M. E.** 1948).

сообщили с способности к регенерации дистальных и проксимальных щупалец у гидроида **Tubularia crocea**. Из работы Кемп (**Kemp N**, 1952) можно сделать заключение о возможности регенерации гидроризы у **Clava leptostyla**. Большинство литературных данных о гидрополипах свидетельствует о том, что им свойственны в большей степени явления соматического эмбриогенеза: развитие гидрантов на месте удаленных, развитие целых организмов из небольших участков столона, из диссоциированных клеток и т. д.

Мы изучали регенерационную способность и соматический эмбриогенез у гидроида **Laomedea flexuosa** (Баренцово море). Прижизненные наблюдения и фиксация объектов (для гистологических исследований) проводились через 5 час., 12 час., 1 сутки, 2 суток, 3 суток и т. д. после операции. Объекты фиксировались горячей смесью Буэна в течение 10—15 мин., либо сулемой с уксусной кислотой в течение 30—60 мин. Заливка производилась в парафин. Срезы 6—8 μ. Окраска гематоксилином по Бёмеру, Караччи, Ганзену и Вейгерту.

А. *Регенерационные явления*

1. О регенерации гидроризы

У 70 только что собранных колоний были отрезаны гидроризы либо ниже перетяжек столона, либо с несколькими перетяжками (рис. 1). Не описывая детально последовательный ход регенерации гидроризы (о чем можно создать представление по схематическому рис. 2) и не излагая результатов всех гистологических наблюдений, остановимся на важнейших фактах.

После отрезания гидроризы концевой участок несколько сжимался в результате чего часть перисарка оказывалась пустой (рис. 2а). Уже через 5 часов на месте бывшей раны мы видим пласты экто- и энтодермальных клеток. Разрастающийся ценосарк заполняет опустевший перисарк и через сутки после операции (рис. 2в) выходит из него. Наружная поверхность, регенерирующего участка неровная, диаметр (в связи с необыкновенной, толщиной эктодермального слоя клеток) приблизительно в 2,5 раза больший, чем диаметр оставшегося ценосарка. Эктодермальные клетки сильно удлинены, с хорошо выраженными ядрами и ядрышками. Клетки энтодермы вакуолизированы; полости в регенерирующем участке ценосарка нет. Весьма интересно, что делящихся клеток (митотическим или амитотическим путем) наблюдать не удалось. Интерстициальных клеток оказывается гораздо меньше, чем в остальном ценосарке. Много книдобластов. На гистологических препаратах видно формирование клетками эктодермы нового перисарка, всегда без перетяжек, весьма тонкого по сравнению с остальным перисарком. По особенностям образующегося перисарка можно безошибочно определить, где был произведен разрез. Через двое суток (рис. 2г) продол-

жается удлинение попрежнему (или даже еще более) утолщенного регенерата, причем в нем появляется полость. Энтодермальные клетки сильно вакуолизированы и приблизительно в 2 раза большего, по сравнению с

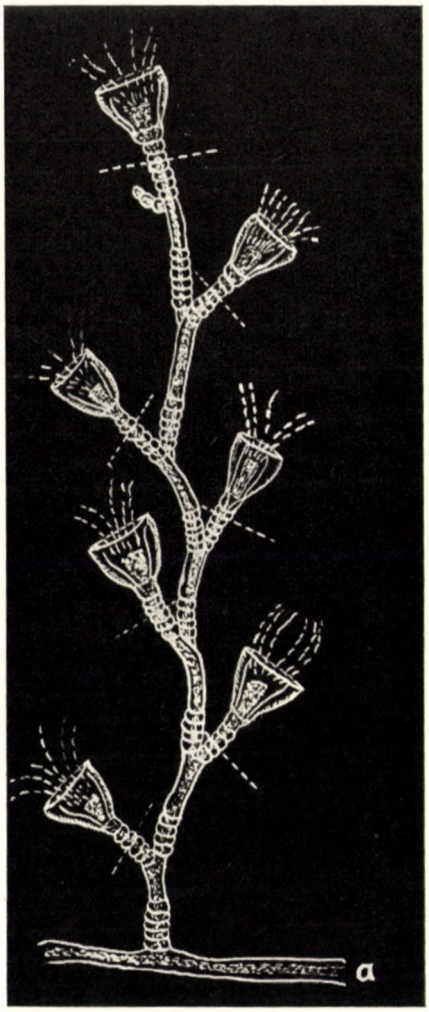


Рис. 1. Схема колонии ***Laomedea flexuosa*** (Пунктиром обозначены линии отреза)
а) Гидрориза

нормальными, размера. Интерстициальных клеток попрежнему немного. Весь регенерат, за исключением концевого участка, покрыт тонким новым перисарком, заметным лишь на препаратах (рис. 3).

Через 3 суток (рис. 2д) можно наблюдать на живом объекте новый перисарк. К этому времени впервые удается (при этом отчетливо) обнаружить

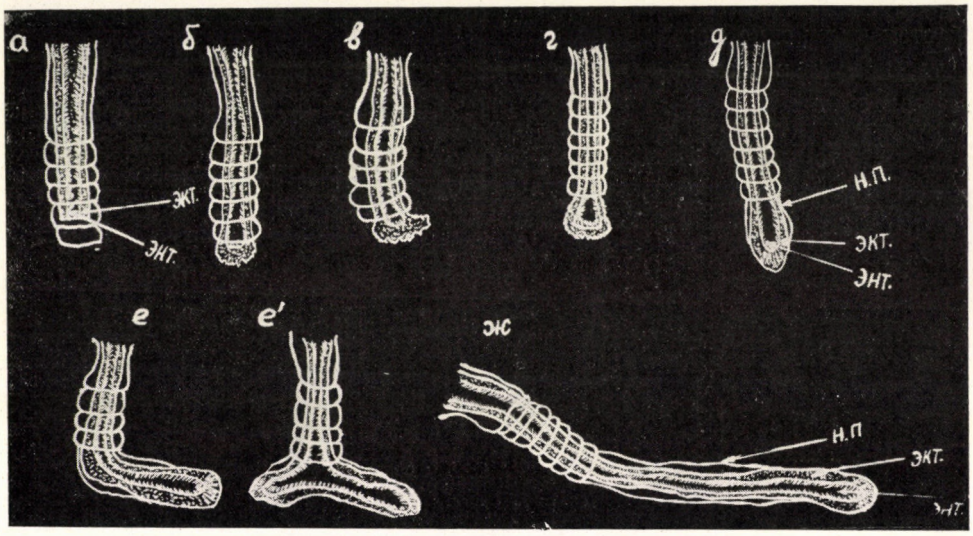


Рис. 2. Регенерация гидроризы ***Laomedea flexuosa*** *(схема).* а) Гидрориза только что отрезана; б) Через 12 часов после операции; в) Через 1 сутки после операции; г) Через 2 суток после операции; д) Через 3 суток после операции; е) Через 4 суток после операции; ж) Через 5 суток после операции. Экт. — эктодерма. Энт. — энтодерма. Н. п. — новый перисарк

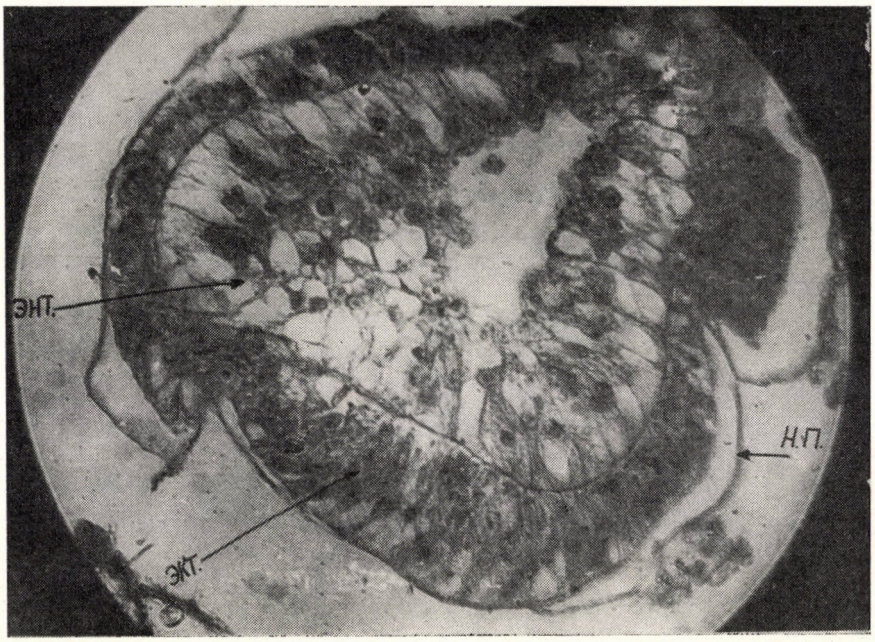


Рис. 3. Продольный срез через регенерирующую гидроризу через 2 суток после операции (микрофотография). Экт. — эктодерма. Энт. — энтодерма. Н. п. — новый перисарк

амитотические деления как эктодермальных, так и энтодермальных клеток. Интерстициальных клеток на этой стадии оказывается гораздо больше, чем на предыдущих. Регенерирующая гидриза может иметь также двухлпастное строение (рис. 2е). На 6 сутки самая большая гидриза была длиной 3,5 мм. К этому времени новые части перисарка продолжают оставаться гораздо более тонкими, чем весь перисарк. По степени продвинувшейся дифференцировки разные части формирующейся гидризы к этому времени различны. Гистологическое строение концевого отдела формирующейся гидризы весьма сходно со строением описанного ранее двухсуточного регенерата. Эктодермальные клетки в 3—4 раза большего размера, эндодермальные клетки сильно вакуолизированы, полость отсутствует. В то же время участки, расположенные ближе к столону, имеют почти сходное с ним строение. В эктодерме большое количество стрекательных и интерстициальных клеток. Через 9 дней самая крупная гидриза была 4,2 мм длиной, а через 18 дней — 8 мм. Мы наблюдали прикрепление нескольких колоний ко дну сосуда уже на 5-е сутки после операции. В наших опытах гидриза регенерировала у всех колоний. Гибели колоний не наблюдалось. На регенерировавших гидризах возникали новые гидранты.

2. О регенерационной способности гидрантов

Было изучено поведение 180 гидрантов, отрезанных от колоний (с оставлением участков ножек гидрантов с 2—4 перетяжками. См. рис. 1). Через сутки раневой поверхности не видно. На ее месте (вероятно путем наползания и слипания клеток) оказываются нормального строения экто- и энтодермальные слои. Через 48 часов ценосарк выходит из старой гидротеки, вокруг регенерата образуется новая тека. Видны амитозы. Таким образом, имеет место заживление ран, однако, неизбежно на 9—10 сутки происходит полная дегенерация гидрантов. При разрезании гидрантов в поперечном и продольном направлениях нам не удавалось обнаружить регенераторные явления. На третьи сутки обычно происходит распад фрагментов.

Опыты на 40 колониях с отрезанием гипостома со щупальцами у гидрантов (не отделенных от колонии) показали, что восстановление утраченных частей не имеет места. Вначале происходят процессы, которые можно назвать заживлением раны: через сутки на месте бывшей раны мы видим слои эктодермальных и энтодермальных клеток. Через двое суток оставшаяся часть гидранта значительно уменьшается, втягивается внутрь, постепенно дегенерирует, как это имеет место и при нормальном отмирании гидрантов. На пятые сутки можно наблюдать развитие новых гидрантов. Вероятно, травма вызывает ускорение тех же процессов бесполого размножения, какие происходят и в норме.

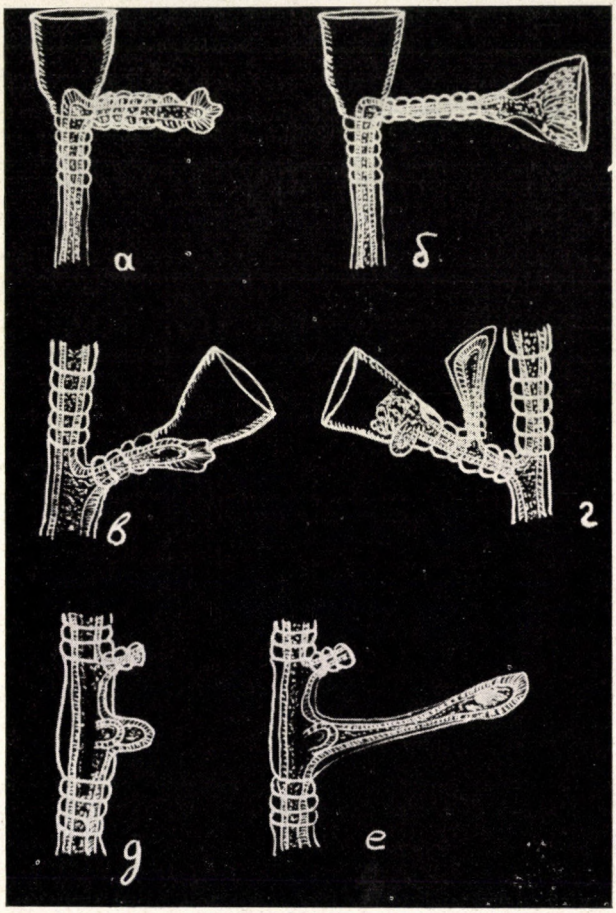


Рис. 4. Соматический эмбриогенез в результате точечных ожогов. а, б — Ожог тела гидрантов. в, г — Ожог ножки гидрантов. д, е — Ожог столона

Б. *Явления соматического эмбриогенеза*

1. Ампутация гидрантов

У 80 колоний были отрезаны все гидранты примерно посредине их ножек (рис. 1). Через 5 часов на месте раневых поверхностей ясно видны слои эктодермы и энтодермы, которые, конечно, не могли возникнуть иначе, как в результате смыкания краев раны, а не путем деления клеток. Энтодермальные клетки в районе бывшей раны не отличаются от энтодермальных клеток ножки гидранта. Отчетливо видна мезоглея. Ни на одном из гистологических препаратов нам не удалось видеть митотических фигур. В единичных случаях обнаружены амитозы.

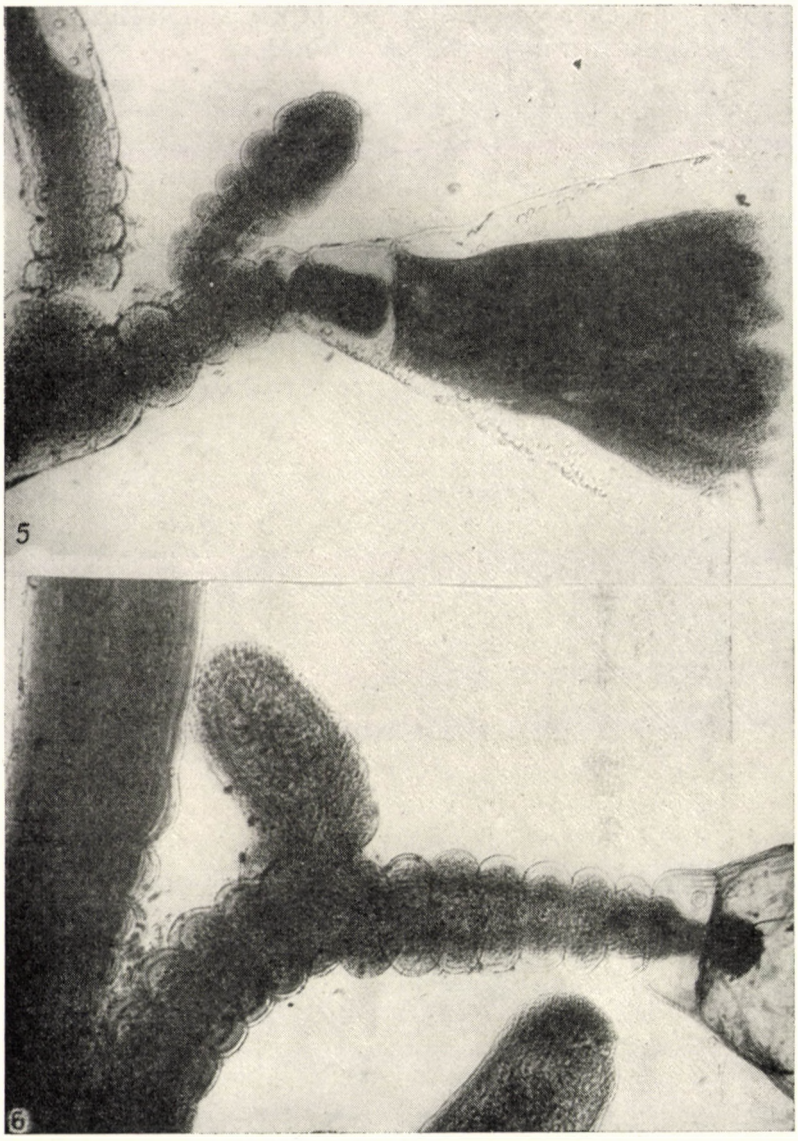


Рис. 5. Развитие гидранта на необычном месте в районе ожога (микрофотография)

Рис. 6. Формирование столоноподобного образования в районе ожога (микрофотография).

Через сутки после операции можно обнаружить резкие изменения в клетках в районе бывшей раны, являющиеся подготовительными процессами к формированию новых полипов, т. е. к явлениям соматического эмбриогенеза. Эктодермальные клетки на этой стадии в 3 раза больше, чем

клетки того же слоя в оставшейся ножке гидранта. Интерстициальные клетки обнаруживаются в незначительном количестве.

На вторые сутки мы видим почку, выходящую из старого перисарка; начинает формироваться ножка нового гидранта. Эктодермальные клетки энергично выделяют новый перисарк. Количество образующихся перетяжек редко соответствует числу отрезанных.

На третьи сутки происходит формирование тела гидранта и соответствующая гистологическая дифференцировка. Видно много эктодермальных и энтодермальных клеток, находящихся в амитотическом делении. Размеры

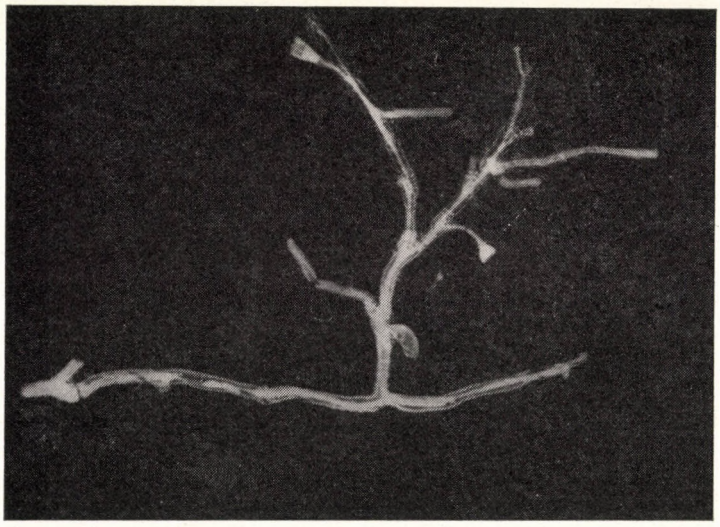


Рис. 7. Образование столоноподобных выростов после ожогов между междоузлиями (фотография)

клеток становятся обычными. Митотическое деление нам удалось видеть всего 1 раз при изучении всех препаратов. На четвертые сутки происходит формирование полноценных новых особей-гидрантов.

Итак, перед нами картины типического развития новых полипов, а не явления регенерации.

Согласно гипотезе Токина (1959) бесполое размножение (например, почкование у гидр) связано с дезинтеграцией клеточных систем, без чего соматические клетки не могут проявить свойственные им потенции к развитию целого организма.

В только что описанных опытах дезинтеграция тканей неизбежно вызывается травмой, связанной с ампутацией гидрантов. Гистологическое

исследование показывает, что развитию новых гидрантов предшествуют резкие морфологические изменения клеток, особенно клеток эктодермального слоя.

2. Развитие гидрантов в районе ожога

Особый интерес представляют опыты вызывания соматического эмбриогенеза путем ожогов в тех участках колонии, где в норме никогда не наблюдается почкования.

Подобные опыты, исходя из указанной выше гипотезы Токина, проводились Тепляковой (1937) на гидре, а также Стрелиным в связи с анализом физиологических градиентов (1936).

Мы производили ожоги горячей иглой, как уже сказано, в такие участки *Laomedea flexuosa*, где заведомо не происходят процессы почкования, а именно: на теле гидрантов, на их ножках, на столонах между двумя уже сформированными гидрантами.

После ожогов всегда было видно небольшое отверстие соответственно в гидротеке или перисарке, а также разрушенные, отторгающиеся клетки.

На 20 колониях с общим числом в 177 гидрантов производился ожог в участках тела гидрантов, расположенных выше диафрагмы. Через трое суток была очевидна дегенерация гидрантов и начало формирования новых особей. Происходит в сущности то же, что и при механической травме, связанной с отрезанием части тела гидранта, о чем мы писали ранее. В других случаях ожог производился в участках тела гидрантов, расположенных ниже диафрагмы. У одного гидранта мы наблюдали появление почки на пятые, сутки, состоявшей из пластов эктодермы и энтодермы. Через семь суток можно было наблюдать образование перетяжек на почке (рис. 4а), а через девять суток после ожога был вполне сформированный гидрант. Любопытно, что старая опустевшая гидротека при этом сохранилась (рис. 4б).

На 20 колониях были произведены ожоги всех ножек гидрантов. Результаты опытов таковы. В одних случаях происходит дегенерация гидрантов, а из ножки развивается новый полип (рис. 4в), причем старая опустевшая гидротека может оставаться. Новый гидрант образуется либо сбоку, либо ножка удлиняется, проходит через старую гидротеку и только тогда формируется новый гидрант.

В пяти случаях мы обнаружили новые гидранты на ножке, где они никогда не возникают в норме (рис. 5). Имели место случаи формирования почки на гидранте в районе ниже диафрагмы в связи, очевидно, с ускоренной дегенерацией гидранта и одновременного развития нового полипа непосредственно в районе ожога (рис. 4г).

В некоторых случаях в результате ожогов ножек развитие нового гидранта не происходило, а возникали столоноподобные образования (рис. 6).

Эти выросты состояли из слоев экто- и энтодермы, однако поперечные перетяжки, обычно сопровождающие развитие гидранта, отсутствовали.

Мы производили ожоги столонов в междоузлиях, между уже сформированными гидрантами. Из 25 бывших под опытом колоний на трех в районе ожога образовались столоноподобные выросты (рис. 7). На месте ожога на 3—4 сутки появляются почки с ясно различимой типичной дифференцировкой на эктодерму и энтодерму (рис. 4д). На пятые сутки проксимальные участки почки уже покрываются текой (рис. 4е). На 18 сутки наибольший столоноподобный вырост достиг 7 мм в длину.

В одном случае мы были свидетелями своеобразного «уродства». Через 10 суток после ожога на проксимальном конце колонии вместо гидроризы возникла почка гидранта, развившаяся вскоре во вполне нормальный полип. При этом все гидранты на колонии, кроме апикального, дегенерировали.

II. О фагоцитарных реакциях в ходе процессов соматического эмбриогенеза у низших кишечнополостных

Возникновение и смена в ходе развития организма различных иммунологических свойств (фагоцитарных реакций, антигенной реактивности, продукции антибиотических субстанций и др.) не могут быть явлениями, обособленными от процессов формообразования (Токин, 1955). Эта гипотеза находит экспериментальное подтверждение при анализе различных формообразовательных процессов. Так выясняется значение фагоцитарных и воспалительных реакций, а также антибиотических свойств яиц млекопитающих в процессах имплантации зародыша в стенку матки (Зыбина 1955, 1958; Михайлова, 1959; Токин и Филатова, 1953). Токин И. Б. (1955) убедился в значении фагоцитарных реакций в процессах овогенеза у **Hydra oligactis**. Интересные данные получены Дондуа (1955), Кричинской (1955, 1959) и др. при изучении динамики фагоцитарных реакций в ходе эмбрионального развития птиц и млекопитающих.

В дальнейшем мы излагаем материалы о значении фагоцитарных реакций в ходе процессов соматического эмбриогенеза (Токин,1959) некоторых кишечно-полостных животных. Был и специальный повод к настоящему исследованию: желание выяснить неясные вопросы питания в ходе процессов регенерации и соматического эмбриогенеза у гидр и морских нисших **Coelenterata**.

В предыдущей статье (Токин и Еричева, 1959) сообщалось, что крайне редко удается обнаружить фагоцитоз у клеток целых, нетравмированных гидр, в случаях помещения последних в суспензию частиц туши, кармина или бактерий. Однако, отчетливый фагоцитоз обнаруживается в ходе развития маленьких кусочков, вырезанных из гастрального отдела, в целую

гидру. Фагоцитоз обнаружен спустя два часа после помещения только что вырезанных из гастрального отдела маленьких кусочков в соответствующую суспензию инородных тел. Отмечена «вспышка» фагоцитоза в тот период развития, когда уже начинают формироваться щупальцы, но ротовое отверстие еще отсутствует.

Ниже сообщаются новые материалы, полученные в исследованиях отчасти так же на **Hydra oligactis**, но главным образом на морских гидроидных полипах.

Еще Мессинг (**Messing**) в 1903 году наблюдал в своих экспериментах на кишечнополостных **Anthea cereus** и **Sagartia parasitica** интенсивный фагоцитоз в ходе процессов регенерации.

Для анализа приводимых ниже материалов следует отметить, что Мечников (1884) обнаружил фагоцитоз частиц туши и кармина не только клетками энтодермы колониальных гидрополипов, принимающих участие в пищеварении, но и клетками эктодермы. Мечников говорил об «эктодермальных фагоцитах». Так же весьма важно для анализа всех сообщаемых материалов указать на следующее: рядом наблюдений подтверждается правильность предположения (Токин 1955) о том, что при дезинтеграции тканей, при нарушении нормальных «замков корреляций» между клетками, проявляется фагоцитарная способность многих клеток, которым, казалось бы она не свойственна. В нашей лаборатории Бизюкова (1959) убедилась, что в связи с дезинтеграцией эпителия, наступающей при ампутации конечности тритонов, сочетаемой с экспериментально вызываемым асептическим воспалением (введение в ткани остатка органа инородных тел), — наблюдается весьма энергичный фагоцитоз эпителиальными клетками частиц кармина, кизельгура и умирающих клеток. Иде—Розас (**Ide—Rozas**, 1936) отметила фагоцитарную способность клеток кожного эпителия амфибий в ходе регенерации органов. Михайлов (1954) описал фагоцитоз эпителиальными клетками гибнущих элементов в ходе регенерации конечности бесхвостых амфибий.

Нами проводились прижизненные наблюдения и гистологические исследования у **Laomedea flexuosa**, **Coryne loveni** и **Clava multicornis**. В качестве фиксатора использовалась жидкость Буэна. Заливка в парафин. Серийные срезы толщиной 7—9 μ. Окраска гематоксилином Эрлиха и Бёмера. Прибегали мы также и к окраске лихтгрюном.

А. *О фагоцитарных реакциях у* ***Laomedea flexuosa***

Нетравмированные колонии (рис. 1) помещались во взвесь туши на $4^1/_2$ часа и, в других случаях, на 5 часов, после чего подвергались гистологическому исследованию. Мы были удивлены тем, что в отличие от пресноводной гидры, имеет место интенсивный фагоцитоз частиц туши клетками

нетравмированного организма. Многие клетки энтодермы гастрального отдела гидрантов оказываются «нафаршированными» частицами туши; это относится в особенности к клеткам в начале гастрального отдела: десятки и сотни частиц туши обнаруживаются в одной клетке. Встречаются внутри клеток глыбки туши размером более $^1/_3$ самой клетки. Фагоцитируют и клетки гипостома (рис. 8). И на всем протяжении ценосарка колонии можно встретить, хотя и редко, клетки, фагоцитировавшие частицы туши. Так как речь идет о нормальных, нетравмированных колониях, следует предположить,

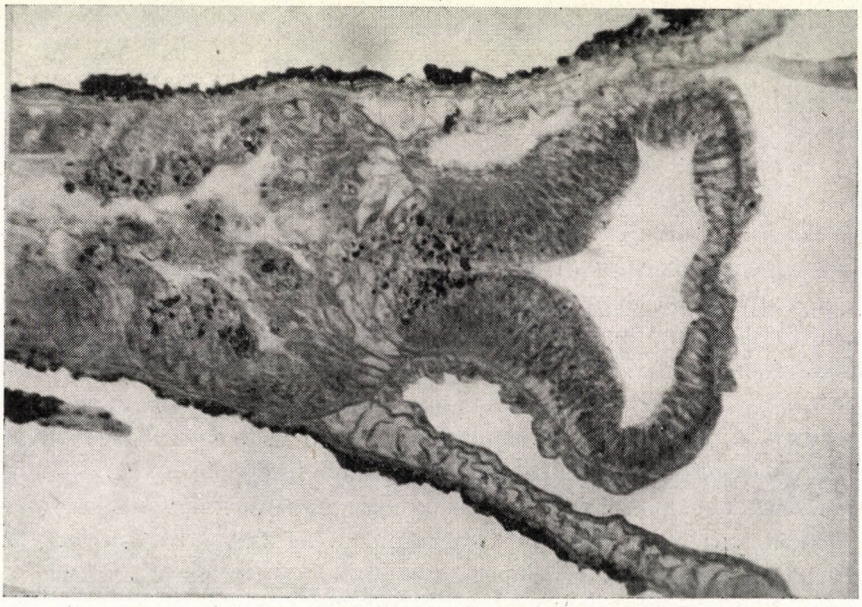


Рис. 8. Нетравмированная колония ***Laomedea fl.*** после $4^1/_2$ час. пребывания во взвеси туши. Интенсивный фазоцитоз туши клетками энтодермы гастрального отдела и гипостома

что частицы туши проникали в различные участки ценосарка вместе с током воды. Что особенно интересно, фагоцитарными свойствами обладают и клетки *эктодермы* гастрального отдела.

В следующей серии опытов у только что найденных колоний отрезались все гидранты и помещались на $4^1/_2$ часа в суспензию туши в морской воде. Мы констатировали энергичный фагоцитоз туши, особенно клетками энтодермы гастрального отдела, а также гипостома (рис. 9а). Клетки эктодермы гипостома тоже фагоцитируют. Эти материалы не дают чего-либо принципиально нового по сравнению с фагоцитарными реакциями у нетравмированных колоний. Мы не обнаружили более энергичной фагоцитарной

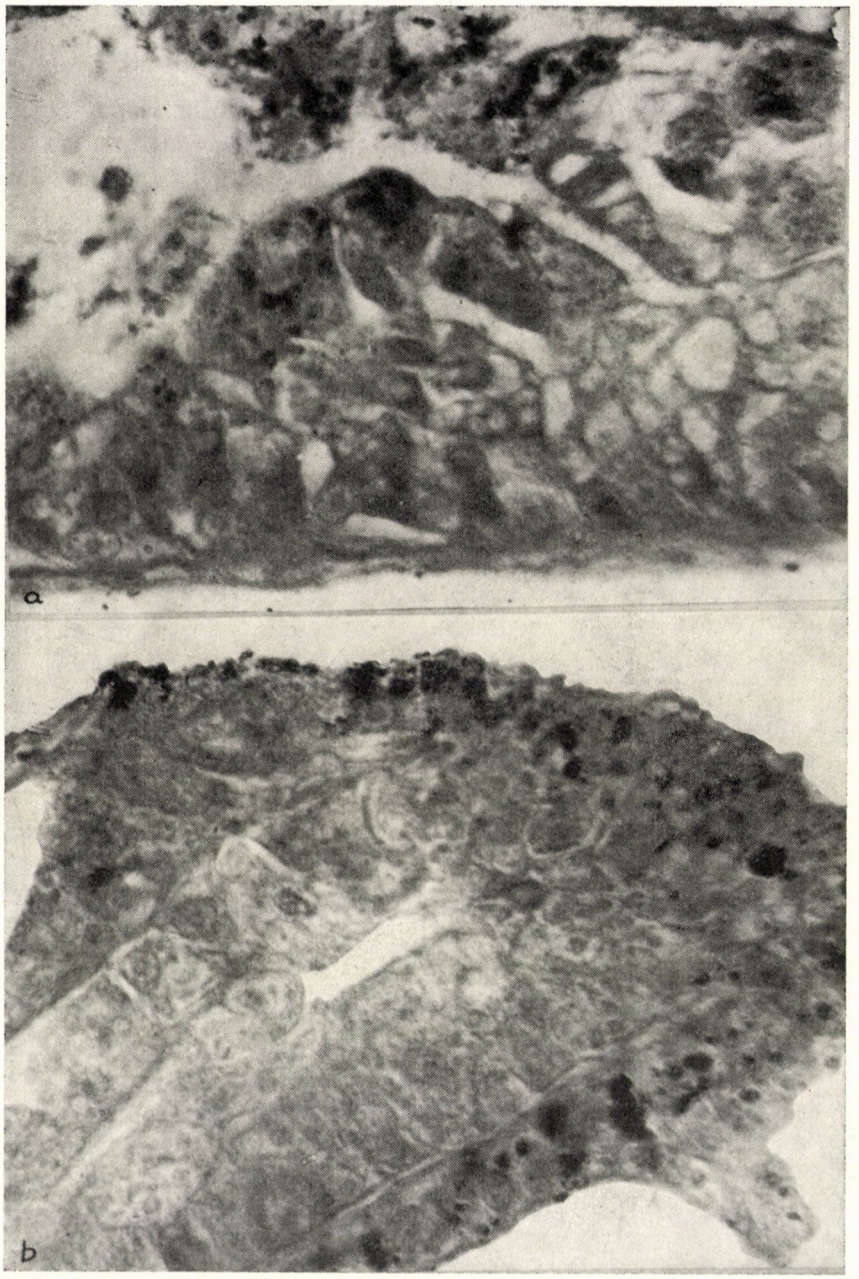


Рис. 9. Травмированная колония ***Laomedea fl.*** после $4^1/_2$ час. пребывания во взвеси туши
a) Фагоцитоз клетками энтодермы гастрального отдела (отрезанных гидрантов). *b*) Фагоцитоз клетками эктодермы столонов, у которых отрезаны все гидранты

активности клеток у отрезанных гидрантов, которые, как об этом мы писали в первой части настоящей статьи, не обладают регенерационной способностью. Что же касается столонов, у которых были удалены все гидранты, то мы без труда констатировали у них более энергичный фагоцитоз, чем у столонов нетравмированных колоний (рис. 9b). Большинство клеток эктодермы ценосарка оказываются с поглощенными частичками туши. Особенно энергичен фагоцитоз в районе ампутации гидрантов. Кстати сказать, при окраске лихтгрюн частицы туши в протоплазме столь отчетливо видны, что легко осуществимы и количественные исследования фагоцитарных реакций. Для оценки только что изложенных фактов и тех, которые мы опишем впоследствии, следует вспомнить, что через 5 часов после отрезания гидрантов, в районе ампутации отмечаются процессы, являющиеся закономерным звеном соматического эмбриогенеза и которые описаны в первой части этой статьи.

На третьи сутки начинает развиваться тело гидранта или уже оказывается сформированным, но щупалец и гипостома еще нет. Соматический эмбриогенез завершается на четвертые сутки.

Итак в отличие от отрезанных гидрантов, неспособных ни к регенерации, ни к соматическому эмбриогенезу, мы обнаружили более энергичный фагоцитоз по сравнению с клетками нетравмированных колоний у клеток ценосарка уже в первые часы процесса соматического эмбриогенеза. Посмотрим теперь, что происходит на дальнейших этапах этого процесса, а именно через 25—26 часов пребывания в суспензии туши и в суспензии бактерий нетравмированных колоний **Laomedea**, отрезанных гидрантов, а также у столонов, у которых все гидранты удалены. Конечно, картины, наблюдаемые у «нетравмированных» колоний через 25—26 часов, не являются идеальным контролем, так как в этих случаях состояние животных, длительно пробывших в суспензии туши или бактерий,не является вполне нормальным, а вследствие неизбежной, хотя бы и незначительной дезинтеграции может повышаться фагоцитарная активность клеток. Мы обратили внимание на то, что в разных опытах, при одних и тех же условиях, интенсивность фагоцитоза была неодинаковой, что, вероятно, связано с различным физиологическим состоянием взятых в опыт колоний. Мы отметили активный фагоцитоз туши клетками экто- и энтодермы, в особенности в области гипостома. Не высокая активность оказалась у клеток ценосарка нетравмированных колоний.

Что же обнаружено к этому времени у колоний с отрезанными гидрантами? У отрезанных гидрантов мы обнаружили совершенно исключительную фагоцитарную активность клеток эктодермы, а в особенности энтодермы гастрального отдела и гипостома (рис. 10). Особенно интересно, что и некоторые клетки щупалец, несмотря на их высокую специализацию, оказались способными к фагоцитозу.

Чем объяснить столь высокую фагоцитарную активность клеток гидрантов через 25—26 часов после их ампутации по сравнению с тем, что мы видели спустя $4^1/_2$—5 часов пребывания отрезанных гидрантов в суспензии туши? Это связано несомненно со все усиливающейся дезинтеграцией гидрантов, доживающих, так сказать, свой век, неспособных ни к регенерации, ни к соматическому эмбриогенезу.

Рис. 10. Фагоцитоз клетками энтодермы гипостома отрезанных гидрантов **Laomedea fl.** спустя 26 час, пребывания во взвеси туши

Что касается соотношения процессов соматического эмбриогенеза и фагоцитарной активности клеток, то большой интерес представляет усиливающаяся к этому времени фагоцитарная активность клеток ценосарка столонов, лишенных гидрантов, и совершенно исключительная активность, наблюдающаяся в районе бывшей ампутации гидрантов, т. е. в районе, в котором протекают процессы соматического эмбриогенеза. Мы провели спе-

циальную серию экспериментов с **B. subtilis**, помещая на 25—26 часов отрезанные гидранты и обезгидрантненные столоны в суспензию убитых бактерий. Гистологическое исследование показало, что в районах процессов соматического эмбриогенеза в ценосарке, а также и в гипостомах отрезанных гидрантов многие клетки фагоцитировали убитых бактерий. На некоторых препаратах можно изучать различные этапы переваривания поглощенных бактерий: отчетливо контурированы вакуоли, в одних случаях видны палочки, в других остатки бактерий в виде зернышек.

В следующих сериях опытов мы помещали нетравмированные и оперированные колонии (отрезание гидрантов) в суспензию туши на 48—50 часов и на 70 часов. К этому времени происходит резкая дегенерация отделенных гидрантов, распад многих из них, и не удивительно, что мы лишь изредка могли увидеть у них в районе ампутации фагоцитирующие клетки. У нетравмированных колоний, пробывших 50 часов во взвеси туши, мы наблюдали фагоцитоз преимущественно у клеток энтодермы гастрального отдела. Таким образом, в опытах с **Laomedea flexuosa**, мы убедились в следующем. Клетки нормальных, нетравмированных **Laomedea flexuosa** обладают выраженной фагоцитарной активностью в отношении частиц туши. Особенно энергичный фагоцитоз отмечается у клеток энтодермы гастрального отдела. Фагоцитоз свойственен не только клеткам энтодермы, но и клеткам эктодермы. В редких случаях, вероятно, в условиях дезинтеграции, можно наблюдать фагоцитоз и клетками щупалец. Дезинтеграция клеточных систем гидрантов, отъединенных от столонов, создает основу более яркого проявления фагоцитарной способности клеток. Фагоцитарная активность клеток ценосарка столонов, у которых отрезаны гидранты, выше по сравнению с нетравмированными колониями. По ходу развития процессов соматического эмбриогенеза у столонов (гидранты которых удалены) имеет место усиление фагоцитарной активности клеток. Наибольшая фагоцитарная активность как в отношении туши, так и в отношении бактерий наблюдается в районе ампутации гидрантов.

Б. *О фагоцитарных реакциях у* **Coryne loveni** *M. Sars.*

Напомним морфологию колоний **Coryne loveni** M. Sars. (рис. 11). Мы ставили те же серии опытов, что и с **Laomedea flexuosa**. Неожиданным для нас оказалось, что в одних и тех же условиях опыты дали в некоторых отношениях совершенно иные результаты. Так у нормальных, нетравмированных колоний **Coryne loveni**, пробывших 5 часов в суспензии туши, а в других случаях — в суспензии бактерий, мы не обнаружили фагоцитарных реакций. Не отметили мы фагоцитоза также у отрезанных гидрантов и у столонов (лишенных вследствие операции гидрантов), помещенных на

5 часов в суспензию туши, что нельзя объяснить недостатком инородного материала, так как в этих опытах на эктодерме животных и на ампутационной поверхности частицы туши прилипали в большом количестве. Безуспешными оказались и наши поиски фагоцитирующих клеток у не травмированных колоний, пробывших в суспензии туши в течение 25 часов.

Обратимся теперь к результатам опытов по регенерации и соматическому эмбриогенезу.

В произвольных направлениях разрезались гидранты, предварительно отъединенные от столонов и помещались на 25 часов в суспензию туши. Лишь в единичных клетках, при том только в районах ампутации мы обнаружи-

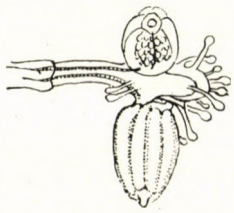


Рис. 11. Coryne loveni — полип с двумя гонофорами

вали поглощенные частицы туши. Объяснением этого, вероятно, является тот бесспорный факт, что гидранты не способны к регенерации. Совершенно иную картину мы увидели при изучении гистологических препаратов столонов, у которых были отрезаны гидранты, и пробывших то же время (25 часов) во взвеси туши: имел место интенсивный фагоцитоз. Эти данные естественно ассоциируются с прекрасной способностью к соматическому эмбриогенезу столонов **Coryne loveni**. По нашим наблюдениям возникновение новых гидрантов на месте отреза их происходит уже через трое суток.

Исключительный интерес представляют результаты опытов, в которых лишенные гидрантов столоны помещались на 25 часов в суспензию убитых **B. subtilis**, окрашенных карболовым фуксином. В местах отрезания гидрантов, где к этому времени развертываются процессы соматического эмбриогенеза, мы отметили исключительную фагоцитарную активность: буквально в каждой клетке формирующейся эктодермы можно увидеть фагоцитированные бактерии, при этом нередко в одной клетке оказывается до десяти и более бактерий на разных этапах переваривания. Мы видим бактерии почти нормальной величины и формы, но видим и распавшиеся на зернышки и т. п. (рис. 12). Столь энергичный фагоцитоз бактерий несомненно связан с местной временной дезинтеграцией клеточных систем, закономерно наступающей в связи с процессами соматического эмбриогенеза. В этих условиях проявляется потенциально присущая большинству клеток фагоцитарная способность. В этом убеждает тот факт, что у нетравмированных колоний **Coryne**

loveni, пробывших такое же время в суспензии бактерий, фагоцитарных реакций отметить не удается. Мы можем сделать следующие выводы из всех опытов с **Coryne loveni**. Клетки **Coryne loveni**, при нормальной интеграции организма, в условиях наших опытов не фагоцитируют частиц туши, а также по-видимому, и бактерий. Эта особенность (по сравнению с **Laomedea flexuosa**), сближающая **Corine loveni** с **Hydra oligactis**, вероятно, связана не со свойствами клеток, а с тем, что при одних и тех же неблагоприятных условиях у **Coryne loveni**, менее нарушаются тканевые закономерности.

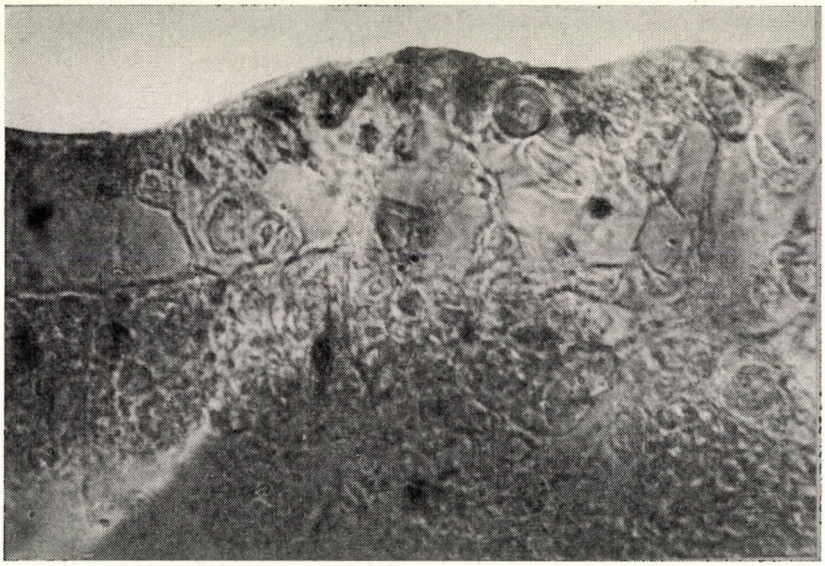


Рис. 12. Фагоцитоз эктодермальными клетками **Coryne loveni** бактериальных клеток — **B. subtilis** спустя 25 час, пребывания травмированных столонов во взвеси бактерий, Активный фагоцитоз непосредственно в районе травмы

В районе травм, где разыгрываются процессы соматического эмбриогенеза, отмечается, как и у **Laomedea flexuosa** бурная фагоцитарная активность.

В. *О фагоцитарных реакциях у* ***Clava multicornis Forscal***

Как известно, стебелек у **Clava** без перисарка. Образуются стелющиеся колонии (рис. 13). После 26-ти часового пребывания во взвеси туши или бактерий нетравмированных колоний, можно найти лишь единичные клетки, фагоцитирующие тушь. Однако, в случае перерезания пополам организма **Clava** и после пребывания в течение такого же времени в суспензии инород-

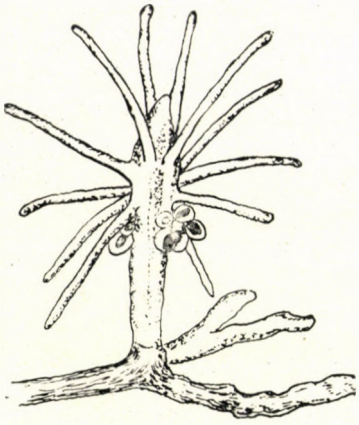


Рис. 13. Clava multicornis

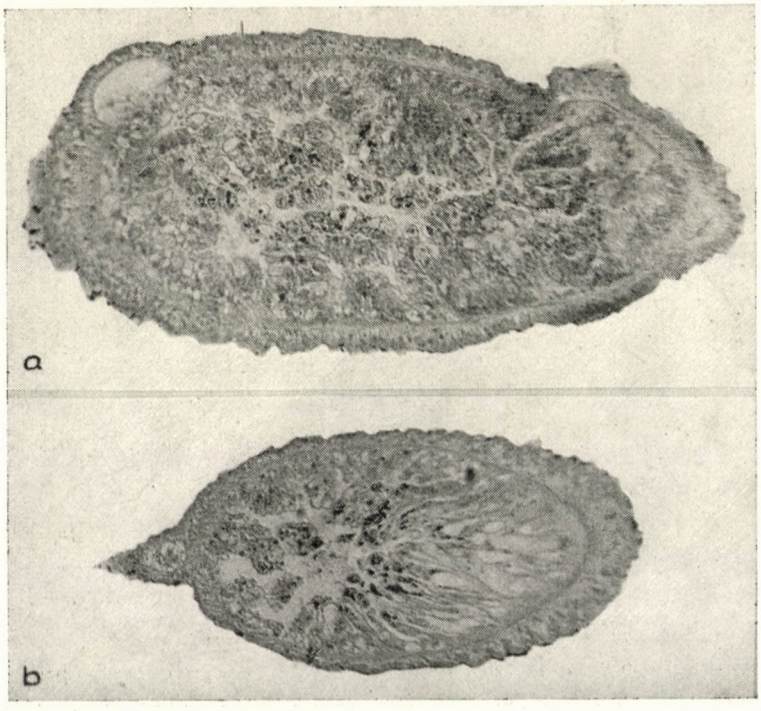


Рис. 14 a, b. Энергичный фагоцитоз частиц туши клетками **Clava** через 26 часов пребывания перерезанных пополам организмов во взвеси туши

ных тел, многие энтодермальные клетки гастрального отдела оказываются «нафаршированными» десятками «аггрегатов» туши. Отчетливо видны вакуоли (рис. 14a, b). Фагоцитированные частицы туши видны также в клетках основания щупалец. Таким образом при травмировании организма **Clava**, при дезинтеграции клеточных систем наступает энергичный фагоцитоз.

Г. *Имеют ли место воспалительные процессы у низших Coelenterata?*

1. Явления, наблюдаемые при введении занозы в тело ***Coryne loveni M. Sars.***

В своих опытах мы отрезали гидранты. Волос (с головы человека) около 0,5 мм. в диаметре предварительно смоченный во взвеси туши, вводился в тело гидранта в произвольном месте и в произвольном направлении с таким, однако, расчетом, чтобы проколотыми оказались и экто- и энтодерма. Для удобства введения волоска он заострялся путем разрезания вкось. Чтобы частицы туши лучше прикреплялись, волосок многократно слегка надрезался бритвой и поэтому делался шероховатым. Фиксация смесью Буэна через 4 часа после введения занозы, и через 22 часа. Заливка в парафин. Окраска гематоксилином Эрлиха и гематоксилином Бёмера.

Во время резки на микротоме волоски выпали. При изучении серийных срезов оказалось, что через 4 часа лишь в одиночных клетках эктодермы удается обнаружить фагоцитоз, хотя большое количество частиц туши находилось в контакте с эктодермой. Но и эти редкие случаи представляют некоторый интерес, если вспомнить, что после помещения в суспензию туши на те же сроки нетравмированной **Coryne loveni** обнаружить фагоцитоз не удалось. При резкой дезинтеграции клеточных систем, сопровождающей введение и пребывание в теле гидрантов занозы, клетки, в норме не фагоцитирующие, проявляют способность к захвату инородных частиц. Следует отметить, что клетки, находящиеся в районе раны в относительной изоляции от тела, фагоцитируют более энергично. Каких-либо особенностей в поведении клеток около волоска, например, деформации их, какой-либо ориентировки в отношении инородных тел и т. п., обнаружить не удалось. Через 22 часа после введения занозы отмечен интенсивный фагоцитоз почти всеми клетками эктодермы ножек гидрантов, при чем в каждой клетке оказались десятки частиц туши. Энергичный фагоцитоз обнаруживается и у клеток в районе «канала», образованного волоском (у краев раны). Вспомним, что у клеток нетравмированных колоний, помещенных на 25 часов в суспензию туши, фагоцитарные реакции обнаружить не удается.

Можно ли, однако, говорить о воспалении при введении занозы? В районе травмы можно увидеть мертвые клетки, в некоторых участках эктодермы имеет место интенсивное размножение i-клеток, однако, нам не удалось увидеть такого поведения клеточных элементов, которые позволили

бы говорить о явлении воспаления, если, конечно, не принимать в расчет отмеченных выше фагоцитарных реакций, являющихся важнейшим звеном комплекса процессов, именуемого воспалением.

2. Имеют ли место явления воспаления при введении заноз в тело *Hydra oligactis*

В произвольное место стенки гастрального отдела вводилась целлуидиновая иголочка толщиной 0,1 мм, длиной около 0,75 см. Через 4,5 часа гидры фиксировались. Уже к моменту фиксации гидра освобождалась от занозы, она оказывалась вне ее тела. Гистологическое исследование (фиксация смесью Буэна, окраска в разных случаях лихтгрюном, гематоксилином Эрлиха, по Селлеру, генцианвиолетом) не дало возможности обнаружить никаких особенностей в поведении клеточных элементов по сравнению с нормой.

В других случаях вкалывался в произвольном месте стенки гастрального отдела, предварительно смоченный во взвеси туши, волосок (с головы человека) около $^1/_5$—$^1/_8$ мм в диаметре, с прикрепленной канадским бальзамом тончайшей шелковинкой. В большинстве случаев через 19 часов волоски оказываются вытолкнутыми, однако, в некоторых случаях они сохраняются, как занозы. Эти случаи и явились предметом гистологических исследований. Фиксация — смесь Буэна, заливка в парафин, окраска гематоксилином по Бёмеру. Серийные срезы делались продольные, поперечные и косые.

Оказалось, что гидра реагирует на введение занозы энергичным размножением i-клеток. Видны митозы. Гистологическая картина эктодермы в целом удивительно напоминает состояние эктодермы, наблюдаемое при процессах овогенеза, хотя эти опыты были осуществлены в марте, когда обычно не имеет места формирование гонад.

Анархизирование эктодермы, ее возбужденное состояние не было, однако, локальным; никаких выступов, характерных для процессов овогенеза или сперматогенеза, не наблюдалось. Ненормальное изменение эктодермы происходило почти на всем ее протяжении, за исключением стебельков и щупалец, хотя у основания щупалец эктодерма также оказывалась измененной. Гистологическая картина весьма сходна с той, которая описана для состояния эктодермы при овогенезе (Токин, И. Б., 1955). Видны некротизирующиеся клетки, слияние i-клеток, «взаимный фагоцитоз» их.

Говорить о воспалении в этом случае не представляется возможным, так как отсутствуют (за исключением явлений фагоцитоза) признаки, характеризующие этот процесс: нет ничего специфического в ориентации клеток, нет явлений, напоминающих «групповой фагоцитоз», признаков инкапсуляции инородного тела и т. п. Фагоцитарная активность клеток очень высокая.

Следует вспомнить, что у нормальных, нетравмированных гидр, помещенных на те же сроки во взвесь туши, фагоцитарные реакции не имеют места.

Результаты этих разведывательного характера опытов дают основание провести систематическое исследование, касающееся явлений воспалений у кишечнополостных, как низших, так и высших представителей этого типа.

Резюме

В настоящем исследовании авторов интересовали вопросы о способностях низших *Coelenterata* к регенерации (восстановлению утраченных частей) и к процессам соматического эмбриогенеза т. е. к развитию целых организмов из соматических клеток (Токин, 1959).

Настоящее исследование проведено также в связи с гипотезой о соотношении иммунологических реакций (фагоцитоз, воспаление, продукция антибиотических субстанций, антигенная реактивность) и формообразовательных процессов (Токин, 1955). Основные результаты исследования таковы.

1. **Laomedea flexuosa** свойственны процессы регенерации (восстановление утраченных частей). Так при ампутации гидроризы у нормальных жизнедеятельных колоний, она регенерирует с типичной структурой и нормальным физиологическим значением. У отрезанных от колонии гидрантов регенерационные явления ограничиваются процессами, которые могут быть названы заживлением ран. Изолированные гидранты, однако, вскоре дегенерируют. При отрезании гипостома со щупальцами у гидрантов, не отделенных от колонии, регенерации не наблюдается. Регенерационные процессы у **Laomedea flexuosa** выражены в весьма ограниченной степени и уступают таковым у пресноводной гидры, хотя и у последних явления соматического эмбриогенеза превалируют над регенераторными.

2. При слабо выраженной регенерационной способности, **Laomedea flexuosa** обладает весьма высокой способностью к соматическому эмбриогенезу. Он может быть вызван отрезанием гидрантов и точечными ожогами столонов и ножек гидрантов. Развитие новых индвидуумов-полипов может происходить и в тех участках колонии **Laomedea flexuosa**, в которых в норме никогда не происходит бесполое размножение.

3. Авторы анализируют изложенные факты в свете теории Токина (1959) о соотношении способности к регенерации и соматическому эмбриогенезу с уровнем интеграции тканей и организмов. Подтверждается и на **Laomedea flexuosa** предположение о том, что соматическому эмбриогенезу предшествует дезинтеграция клеточных систем.

4. Необходимы дальнейшие более тщательные гистологические и цитологические исследования явлений регенерации и соматического эмбриогенеза у **Laomedea flexuosa** и у низших кишечнополостных вообще.

5. Исследовались фагоцитарные реакции клеток энто- и эктодермы **Laomedea flexuosa**. **Coryne loveni** и **Clava multicornis** в ходе процессов соматического эмбриогенеза (Токин, 1959), т. е. в ходе развития новых гидрантов из соматических клеток. Клетки энто- и эктодермы нетравмированных **Laomedea fl.** (в отличие от клеток **Hydra oligactis** и **Coryne lov.**) обладают явно выраженной фагоцитарной активностью.

6. По ходу процессов соматического эмбриогенеза имеет место усиление фагоцитарной активности клеток. Наибольшая фагоцитарная активность у клеток **Laomedea fl.** как в отношении частиц туши, так и в отношении бактерий наблюдается непосредственно в районе ампутации гидрантов.

7. В районе травм **Coryne loveni**, где разыгрываются процессы соматического эмбриогенеза, отмечается, как и у **Laomedea fl.**, энергичная фагоцитарная активность.

8. Дезинтеграция клеточных систем **Clava**, происходящая в результате травм, вызывает энергичный фагоцитоз.

9. Эксперименты по введению заноз (целлуидиновой иголочки или кусочков волос с головы человека, смоченных взвесью туши) и гистологическое исследование дают возможность утверждать, что у **Hydra oligactis** и **Coryne loveni** имеют место выраженные фагоцитарные реакции в районе травм, однако, нет основания говорить о других компонентах процессов воспаления. Отсутствуют явления инкапсуляции инородных тел и т. п.

10. Изложенные предварительные опыты по воспалению дают основание для проведения более обширных сравнительных исследований явлений фагоцитарых и воспалительных реакций в пределах типа Coelenterata.

ЛИТЕРАТУРА

Бизюкова В. С. (1959): Воспаление и фагоцитоз в ходе регенерации конечности тритона. Научные доклады высшей школы, № 2, 47—49. — Berill H. Y. a Davidson M. E. (1948): Regeneration of primordia and developing hydranths of Tubularia. Journ. exper. zool., *107*, 465—477. — Дондуа А. К. (1955): Фагоцитарная и воспалительная реакции на разных этапах онтогенеза. Эксперименты на курином зародыше. ДАН СССР, т. 104, № 6, 941—944. — Зыбина Е. В. (1955): Морфологические наблюдения над имплантацией яйца в связи с проблемой иммунитета зародышей. Бюллетень эксперим. биологии и медицины, № 8, 53—56. — Зыбина Е. В. (1958): О «механизме» имплантации бластоцист у крысы. Архив АГЭ, № 4, 63—69. — Ide—Rozas A.: (1936) Die Cytologischen Verhältnisse bei der Regeneration von Kaulquappen extremitäten. Roux'Arch., *135*, 135. — Kemp N. (1952): Regeneration in isolated and fused pieces of Clava leptostyla. Biol. Bull. Woods Hole, *2*, 141—148. — Кричинская Е. Б. (1955): Фагоцитарная активность эндотелия некоторых органов куриного эмбриона на разных стадиях развития. Бюллетень эксперим. биологии и медицины. № 8, 57—59. — Кричинская Е. Б. (1959): Фагоцитарные реакции по отношению к туши и микроорганизмам в ходе развития куриного и утиного зародышей. Научные доклады высшей школы. № 1, 48—50. — Messing S., 1903. Ueber Entzündung bei der niederen wirbellosen Tieren. Zentralblatt für Allgemeine Pathologie u. Pathologische Anatomie. XIV B., *22*, 915—920. — Мечников И. И. (1892): Лекции о сравнительной патологии воспаления. С.-Петербург. — Metschnikoff, E. (1892). Lecons sur la pathologie comparée de l'inflammation. Paris. — Михайлов В. П. (1954): Образование клеток при регенерации конечности (о развитии регенерационной бластемы). Бюллетень эксперим. биологии и медицины. Т. 38, № 8, 52—56. — Михайлова И. Г. (1959): О фагоцитарных реакциях в плаценте белой мыши. Труды Петергофского Биолог Ин-та Ленингр. Гос. Ун-та, № 18, 223—231. — Стрелин Г. С. (1936): О физиологическом градиенте. Реактивное образование почек у Pelmatohydra oligactis и подавление этой реакции влиянием головного конца. Арх. анат., гист., эмбр., XV, 3, 47—56. — Теплякова М. Я. (1937): Онтогения клетки. Сообщ. 8. Об явлении возникновения целого организма на месте травмы (ожога) у Pelmatohydra oligactis. Биологический журнал, т. 6, № 3, 565—580. — Токин И. Б. (1955): Неясные вопросы овогенеза Hydra oligactis. ДАН СССР, т. 102, № 1, 197—200. — Токин Б. П. и Филатова А. Г. (1953): О бактерицидных свойствах яиц кролика. ДАН СССР. Т. 91, № 4, 985—988. — Токин Б. П. и Филатова А. Г. (1953): Яйцо кролика и бактерии (Материалы к проблеме иммунитета зародышей) ДАН СССР, 90, № 6, 1195—1198. — Токин Б. П. и Филатова А. Г. (1953): О жидкости полости бластоцисты. ДАН СССР, т. 90, № 5, 941—944. — Токин Б. П. (1955): Иммунитет зародышей. Изд-во Ленингр. Ун-та. — Токин Б. П. (1959): Регенерация и соматический эмбриогенез. Изд-во Ленинградск. Университета. — Токин Б. П. и Еричева Ф. Н. (1959): О фагоцитарных свойствах клеток Hydra oligactis. Научные доклады высшей школы, № 2, 43—46.

REGENERATION, SOMATIC EMBRYOGENESIS AND RELATED PHENOMENA IN LAOMEDEA FLEXUOSA AND OTHER PRIMITIVE COELENTERATA

B. P. TOKIN, F. N. ERITCHEWA and J. KALININA

Authors have investigated the regenerative capacity (*i. e.* the new-formation of lost parts), as well as processes of the somatic embryogenesis (*i. e.* formation of whole organisms from so matic cells; Tokin, 1959) in primitive Coelenterata. Their present investigations have been performed on the basis of Tokin's hypothesis on interrelations between immunological reactions (*e. g.* phagocytosis, inflammation, production of antibiotics, antigen-reactivity) and morphogenetic processes (Tokin, 1955). The investigations have led to the following results.

1. *Laomedea flexuosa* has the capacity to regenerate, *i. e.* to re-form lost parts. Having cut off the hydrorhiza of normal colonies, it regenerates its typical structure which functions normally. Hydranths cut off from the colony show only phenomena of the wound-healing. However hydranths isolated from the colony will degenerate shortly after. When cutting off

the hypostoma with its tentacles of hydranths left in the colony, no regeneration takes place. Consequently, regenerative capacities of *Laomedea flexuosa* are very restricted in comparison with those of the fresh-water hydras, however, processes of the somatic embryogenesis are predominating in the latter too. 2. Having low regenerative capacities *Laomedea flexuosa* is capable of developing by somatic embryogenesis. This can be provoked by cutting off the hydranths or by puncturing burns into the stolons and pedal region of the hydranths. Moreover, such parts of the colony of *Laomedea flexuosa* can develop new polyp-individuals which normally reproduce only sexually. 3. These facts are discussed by the authors on the basis of TOKIN's theory about interrelations between regenerative power and the capacity for somatic embryogenesis on a given level of integration (TOKIN, 1959). Further the case of *Laomedea flexuosa* demonstrates that disintegration of the cell-systems always precedes the somatic embryogenesis. 4. Phenomena of regeneration and somatic embryogenesis of *Laomedea flexuosa* and, in general, of the lower Coelenterata need further and more thorough-going histological and cytological investigations. 5. Phagocytic reactions of cells of the ectoderm and entoderm of *Laomedea flexuosa*, *Coryne loveni* and *Clava multicornis* were investigated in the course of the somatic embryogenesis (TOKIN, 1959), *i. e.* when new hydranths are developing from somatic cells. Ectodermal and entodermal cells of *Laomedea flexuosa* show, in contrast to those of *Hydra oligactis* and *Coryne loveni*, well expressed phagocytic activity. 6. In the course of the somatic embryogenesis this phagocytic activity of the cells increases. Highest phagocytic activity of the cells of *Laomedea flexuosa*, (intake of India-ink granules as well as bacteria) can be seen in the cut regions of the hydranths. 7. In cut regions of *Coryne loveni* showing phenomena of the somatic embryogenesis similar to *Laomedea flexuosa*, one can see energetic phagocytic activity. 8. Disintegration of cell-systems of *Clava* by means of traumata causes energetic phagocytosis. 9. Experiments by means of introducing celluloid spinules or pieces of human hair immersed in India-ink followed by histological examinations prove that in traumatic regions of *Hydra oligactis* and *Coryne loveni* well expressed phagocytic reactions take place, however, no other signs of an inflammatory process (*e. g.* incapsulation of the foreign bodies) can be observed. 10. Preliminary experiments on the inflammatory phenomena can serve as basis for more extensive comparative investigations of phagocytic phenomena as well as inflammatory reactions in the phylum of the Coelenterata.

Проф. Б. П. Токин, Ленинград, Кировски пр. 69—71. СССР

Laboratorium für experimentelle Zytologie der Slowakischen Akademie der Wissenschaften, und Histologisch-embryologisches Institut der Comenius-Universität in Bratislava
(Vorstand: Prof. I. Stanek)

MIKROKINEMATOGRAPHISCHER BEITRAG ZUR PROBLEMATIK DER ENTSTEHUNG UND VERMEHRUNG DER MAKROPHAGEN IN NERVENGEWEBEKULTUREN

I. Stanek

(Eingegangen am 25. Juni 1960)

Freie phagocytierende Elemente, Makrophagen im Gewebe des Zentralnervensystems entstehen, wie bekannt, vor allem aus Mikrogliazellen (Hortega del Rio, 1919—1922; Penfield, 1928 u. a.), es wird aber ziemlich allgemein auch eine Möglichkeit ihrer Entstehung aus Endothelzellen der Kapillaren anerkannt, besonders im Verlaufe gewisser Phasen einiger pathologischen, mit Gewebszerfall verbundenen Prozesse. Viele Autoren sind ausserdem der Meinung, dass man die Fähigkeit der Phagocytose auch anderen Gliazellarten, insbesondere den Astrocyten zuschreiben muss (Scholz, 1957; Snessarev, 1946; u. a.). Doch ist die Frage, ob sich solche fixe Astrocyten in freie Makrophagen umwandeln können, bis heute strittig und die Mehrzahl der klassischen Histopathologen lehnt solche Umwandlung ab.

Unsere früheren Arbeiten haben unter anderem eine Aufmerksamkeit dem vergleichenden Studium der verschiedenen Zellarten in Wachstumszonen der Kulturen von normalem und pathologisch verändertem Nervengewebe verschiedener Provenienz gewidmet. In diesen Kulturen hatten wir eine Möglichkeit, die Anwesenheit grosser, of sternartig verzweigten flachen Zellen mit blassem Cytoplasma und ovalem, an Chromatin armen Kern, als eine der Grundstrukturen der Wachstumszone dieser Explantate zu beschreiben [4, 5, 6, 7]. Über diese Zellen äusserten wir damals (1950, 1951) die Ansicht, dass es beim Beurteilen aller morphologischen Merkmale und biologischen Eigenschaften im Vergleich mit anderen, in Explantaten anwesenden Zellen möglich sei, diese Elemente als Zellen astrocytären Ursprungs zu identifizieren; diese Ansicht wurde später durch die Arbeiten von Pomerat [10] bekräftigt.

In solchen Explantaten (z. B. aus der Kleinhirnrinde von 6 Mon. alten menschlichen Fötussen), deren Rand bei Umpflanzung durch Quetschen oder Umschneiden stärker traumatisiert wurde, konnte man diese astrocytären Elemente öfters beobachten, indem sie eine intensive Phagocytose der Zelltrümmer zutage brachten. Etliche dieser grossen flachen Randzellen zeigten ein deutliches Bestreben zum Freimachen von den umgebenden fixen Zellen, zum Einziehen ihrer Ausläufer und zur Auswanderung ins umgebende Medium.

(S. z. B. die Abb. 30, 31, 32 in unserer Arbeit 6, oder die Abb. 16, 17, 18 in der Arbeit 8). Diese Beobachtungen führten zur Annahme, dass unter gewissen Bedingungen, bei gesteigerten Ansprüchen auf Abbau und Entfernung der Zerfallsprodukte im beschädigten Gewebe, die Aufgabe der Makrophagen auch durch die Tätigkeit der astrocytären Elemente übernommen werden kann.

Im Bestreben, eine Möglichkeit solcher direkten Umwandlung der grossen flachen Randzellen in freie Makrophagen zu beweisen, haben wir diese Zellen mit Hilfe der Mikrokinematographie systematisch untersucht. Es ist gelungen, den erwähnten Prozess zu verfilmen.

Unsere früheren Arbeiten [6, 7, 8, 9] befassten sich ausserdem auch mit der Frage der Vermehrung von Makrophagen in Kulturen des Zentralnervengewebes. Es konnte festgestellt werden, dass ausser der Neubildung der Makrophagen aus fixen Zellen (besonders in den ersten Phasen der Kultivation) sich die freien Elemente auch durch Teilung vermehren können. Wir haben dabei auf die Tatsache aufmerksam gemacht, dass eine mitotische Teilung in diesem Zusammenhang eine relativ sehr seltene Erscheinung ist, während die für eine direkte Teilung der Gliamakrophagen zeugenden Merkmale öfters zu sehen sind. Da wir bisher in der Literatur keine Angaben über eine direkte mikrokinematographische Darstellung der Amitose des Gliamakrophagen gefunden haben, versuchen wir sie kurz zu beschreiben.

Material und Methodik

Als Kultivationsmaterial wurde teils die Hirnrinde junger Kaninchen und Ratten benutzt, teils Gehirnfragmente von 10—12 Tage alten Hühnerembryonen. Etwa 1—2 mm grosse Gewebsstückchen explantierten wir entweder im hängenden Tropfen, oder wurden mehrere Fragmente im Hühnerplasmakoagulum auf länglichen Deckgläser in flüssigem Medium in rotierenden Röhrchen kultiviert. Die Methodik war im allgemeinen unserem in früheren Arbeiten benutzten Verfahren ähnlich.

Für die Beobachtung im Phasenkontrast und besonders für die mikrokinematographische Registration bei starken Vergrösserungen wurden die geeigneten Kulturen in eine improvisierte planparalelle, etwa 0,2—0,3 mm hohe Kammer umgepflanzt. Die Kammer bestand aus zwei durch eine feine auf die Ränder angestrichene Paraffinschicht zusammengeklebten Deckgläser. Dieses Verfahren hat sich für unsere kurzfristige (höchstens 24stündige) Beobachtung, bzw. für die mikrokinematographische Aufnahmen als befriedigend erwiesen und ermöglichte bequemes Filmen auch bei Benützung einer homogenen Immersion (Phasenkontrast, Zeiss, Jena). Die Beobachtung und Verfilmung erfolgte im Thermostaten eigener Konstruktion oder auf einem heizbaren Tisch (Reichert, Wien) bei 37° C ab.

Für die Mikrokinematographie haben wir eine Zeitrafferapparatur mit Elektronenlampen benützt (Konstruktion der Fa. Tesla, Pardubice), die Aufnahmen wurden mit einer 16 mm Agfa-Movicon Kamera gemacht. Intervalle zwischen den einzelnen Aufnahmen betrugen 8—10 Sek. Als Material diente der 16 mm Inversionsfilm Agfa Isopan F. Technische Zusammenarbeit: Dr. M. Rapoš und J. Uher.

Eigene Beobachtungen

1. Verlauf der Umwandlung der fixen Randzelle in einen freien Makrophag. Explantat aus der Hirnrinde eines jungen Kaninchens (Abb. 1 und 2):

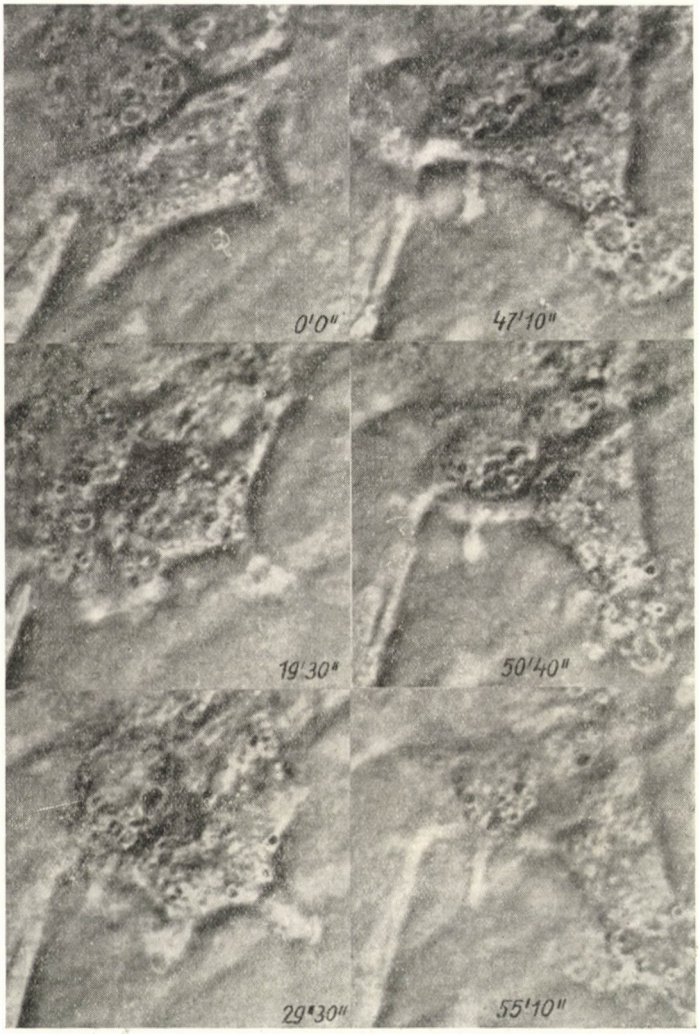


Abb. 1. Mikrokinematographische Darstellung der Entstehung eines Makrophagen aus fixer Randzelle einer Kultur von Kaninchenhirnrinde. Ausgewählte Bilderreihe aus einem 16 mm Filmstreifen. (Homogene Immersion, Phasenkontrast. — Negative Kopie. — Die Zeitabstände ab Ausgangsstadium sind in Minuten und Sekunden angegeben)

Die flachen verzweigten Zellen am Rande des Mutterstückes stellen hier eine öfters vorkommende Zellart dar. Ihre dicken Ausläufer hängen mit anderen Zellen der Umgebung zusammen. Das Cytoplasma enthält phagocytierte Zellfragmente und Bestandteile des Zelldetritus aus dem Rande der Kultur. Nach etwa 20 Minuten beginnt sich ein ins Medium hervorragender Ausläufer der Zelle allmählich zu verlängern, unter starker Aktivität des Oberflächencytoplasmas der Zelle. Dieser Ausläufer wird nach weiteren 25 Minuten ziem-

Abb. 2. Mikrokinematographische Darstellung der Entstehung eines Makrophagen aus fixer Randzelle einer Kultur von Kaninchenhirnrinde. (Fortsetzung der Abb. 1)

lich dick und sein Ende verbreitert sich in flächenhafte membranartige Gebilde, die sich nach der Art der undulierenden Membranen lebhaft bewegen. Gleichzeitig kommt es zur allmählichen Loslösung der übrigen Ausläufer der Zelle, die sich verkürzen und einziehen, so dass die Zelle nach etwa insgesamt 55 Minuten nur noch mit zwei Ausläufern mit dem Gewebe des Explantates zusammenhängt. Der ganze Zell-leib schiebt sich nach und nach aus dem Explantat ins umgebende Medium und wird allmählich birnenförmig. In weiteren etwa 10 Minuten löst sich dann der Zusammenhang mit dem Rande

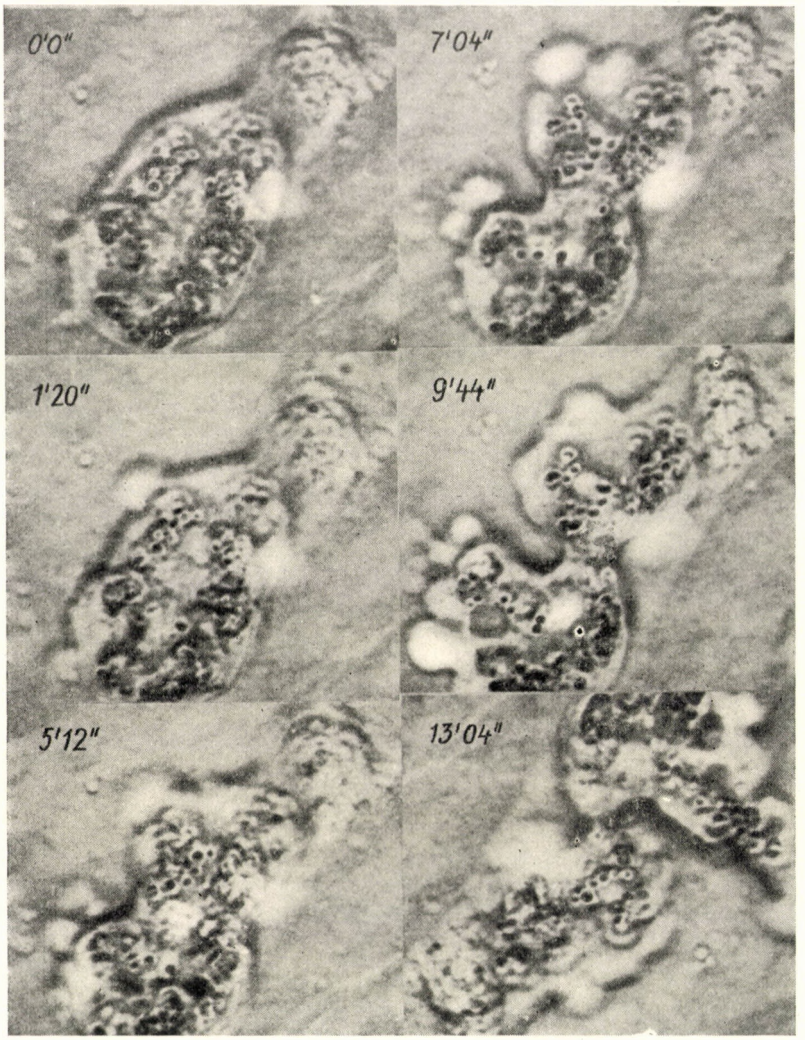


Abb. 3. Verlauf der amitotischen Teilung eines Makrophagen aus der Kultur vom Gehirngewebe des Hühnerembryos. Ausgewählte Bilderreihe aus einem 16 mm Filmstreifen. (Homogene Immersion, Phasenkontrast. — Negative Kopie. — Die Zeitabstände ab Anfangsstadium sind in Minuten und Sekunden angegeben)

des Mutterstückes völlig ab, beschränkt sich zuerst auf einen einzigen dicken Ausläufer, der sich rasch verdünnt, bis endlich nach etwa 77 Minuten auch diese dünne Verbindung bricht und die Zelle vollkommen frei wird. Während der letzten Periode der Ablösung weist das Cytoplasma der Zelloberfläche eine intensive Aktivität im Sinne der Entsendung kurzer keilförmiger Ausläufer und undulierenden Membranen auf. Nach völliger Ablösung benimmt sich die

freigewordene abgerundete Zelle wie ein normalerweise in diesen Kulturen vorkommender Makrophag.

2. Verlauf der amitotischen Teilung in einem Makrophagen in Kultur aus dem Gehirngewebe des Hühnerembryos (Abb. 3 und 4).

Ein Makrophag mit annähernd ovoidem Kern, einer Anhäufung von Fettvakuolen und phagocytierten Zelltrümmer im Zellkörper, weist eine starke Oberflächenaktivität im Sinne der Entsendung und Wiedereinziehung kurzer, dicker und keilförmiger Ausläufer auf, die von Zeit zu Zeit auch eine flächenhafte Verbreiterung zeigen. Schon nach 1 Min. 20 Sek. erscheinen die ersten Zeichen der Zerschnürung am Kern und Zellkörper, was nach etwa 5 Minuten deutlich ausgeprägt wird. Unter starker Oberflächenaktivität, die aber nicht

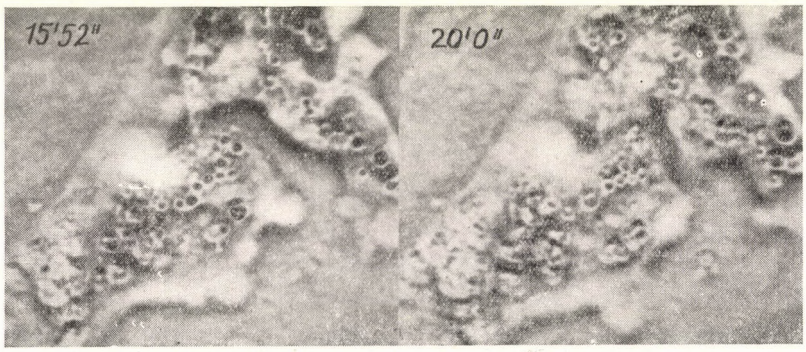


Abb. 4. Verlauf der amitotischen Teilung eines Makrophagen aus der Kultur vom Gehirngewebe des Hühnerembryos. (Fortsetzung der Abbildung 3)

stärker erscheint als bei einem gewöhnlichen Makrophagen, schreitet der Prozess der Zellzerschnürung weiter, so dass nach etwa 10 Minuten die beiden Tochterzellen bereits ausgebildet sind und zwischen ihren Zellkörpern nur noch eine kurze Cytoplasmabrücke besteht. Dieser Zusammenhang verengt sich nach weiteren 5 Minuten auf eine sehr kurze fadenförmige Verbindung, die dann rasch bricht, so dass nach etwa 20 Minuten die Zellteilung beendet ist. Die beiden Tochterzellen entfernen sich dann langsam voneinander, können aber auch längere Zeit beisammen bleiben. Im weiteren benehmen sich die beiden neugebildeten Zellen wie normale Makrophagen.

Zusammenfassung

Mit Hilfe einer mikrokinematographischen Einrichtung und Phasenkontrast wurde die Entstehung der Gliamakrophagen aus grossen flachen Randzellen im Explantat von der Gehirnrinde eines jungen Kaninchens dargestellt, kurz beschrieben und dokumentiert. Da die erwähnten Randzellen des Mutterstückes vom Autor schon in früheren Arbeiten als Zellen astrocytären Ursprungs betrachtet wurden, glaubt der Autor bewiesen zu haben, dass sich unter gewissen Bedingungen (z. B. stärkere Ansprüche an phagocytäre Reinigungstätigkeit

im beschädigten Gewebe der Kultur und vielleicht auch in vivo) auch die Astrocyten in freie phagocytierende Zellen umwandeln können.

Als zweiter Beitrag wird der Verlauf einer amitotischen Teilung eines Makrophagen in Nervengewebekultur beschrieben und mikrokinematographisch registriert.

LITERATUR

1. Penfield, W. (1928): Neuroglia and Microglia, the Interstitial Tissue of the Central Nervous System. In Cowdry's Special Cytology, New York. Vol. II. — 2. Scholz, W. (1957): Für die allgemeine Histopathologie degenerativer Prozesse bedeutsame morphologische, histochemische und struktur-physiologische Daten. In Lubarsch—Henke—Rössle: Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie. Springer, Berlin, Bd. 13., Teil I/A. — 3. Снесарев, P. E. (1946): Общая гистопатология мозговой Павмы, Мозква — 4. Slabeyciusová, M.—Stanek, I. (1950): Das Gewebe einiger Geschwülste des Zentralnervensystems, kultiviert in vitro. Biol. Listy, Suppl. II. — 5. Slabeyciusová, M.—Stanek, I. (1951): Einige Bemerkungen zur Kultivation des normalen Zentralnervensystemgewebe in vitro, auf Grund eigener Experimente. Brat. lekár. Listy, *31*, 60. — 6. Stanek, I.—Mungyerová, G. (1953): Über die Zytophysiologie des Gliamakrophagen. Biologia, *8*, 375. — 7. Stanek, I. (1955): Contribution à l'étude sur la cytologie de la névroglie in vitro. Referat am VI. internationalen Anatomenkongress, Paris. — 8. Stanek, I. (1959): Makrophagen im Zentralnervensystem. Referat und Beitrag zur Problematik am II. internationalen Histologensymposium, Budapest. — 9. Stanek, I. (1960): Interaktion der Gliamakrophagen mit umgebenden Gewebe und Zelldetritus in vitro. Biologia (im Druck). — 10. Pomerat, C. M. (1952): Dynamic Neurogliology. Texas Rep. Biol. Med. *10*, 885.

МИКРОКИНЕМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ К ПРОБЛЕМАТИКЕ ВОЗНИКНОВЕНИЯ МАКРОФАГОВ В КУЛЬТУРАХ НЕРВНЫХ ТКАНЕЙ

И. СТАНЕК

При помощи микрокинематографического приспособления и фазового контраста автор изобразил возникновение глиомакрофагов из крупных плоских краевых клеток в тканевой культуре коры головного мозга молодого кролика; в работе даются краткое описание развития макрофагов. Ввиду того, что упомянутые краевые клетки материнского куска уже в прежних работах автора были опредлены как клетки астроцитарного происхождения, автор считает, что он установлением непосредственного преобразования этих клеток в макрофаги предосавил дальнейшие данные о том, что в определенных условиях (напр. повышенные требования относительно фагоцитарной очистительной деятельности в поврежденной ткани культуры и, быть может, также in vivo) астроциты также могут преобразовываться в свободные фагоцитарные клетк.

В дальнейшем дается описание процесса прямого деления макрофагов в культурах нервной ткани.

MICROCINEMATOGRAPHY OF MACROPHAGES IN EXPLANTED NERVOUS TISSUE

I. STANEK

Phase-contrast microcinematography of the formation of glial macrophages from large, flat marginal cells in the explanted cerebral cortex of a young rabbit is presented. The said marginal cells have already been claimed to be of astrocytic origin in earlier publications of the author; the finding that these cells undergo a direct metamorphosis into macrophages furnishes a further support of the theory that, under certain conditions (*e. g.* stronger demands for phagocytic activity in the impaired explant, and probably *in vivo*), astrocytes may also develop into free phagocytes.

The amitotic division of a macrophage in explanted nervous tissue is also demonstrated.

Prof. Dr. Ivan Stanek, Bratislava, Sasnikova 4. CSR

Department of Histology and Embryology of the University Medical School, Budapest
(Director: Prof. I. Törő)

EPENDYMAL NEUROSECRETION. I.
GOMORI-POSITIVE SECRETION IN THE SUBCOMMISSURAL ORGAN OF DIFFERENT VERTEBRATES

B. Vigh, B. Aros, P. Zaránd, I. Törk and T. Wenger

(Received June 27, 1960)

The posterior commissure in the vertebrates is situated caudally above the third cerebral ventricle. The ventricular portion underneath is lined by multiple ependymal cell-rows differing in structure from the surrounding epithelium, and by the hypendyma containing capillaries and fibres. Reissner's fibre, a threadlike structure, emanates from this ependymal cell surface and extends freely across the ventricular cavities to the termination of the central canal of the spinal cord. The structure underneath the posterior commissure has been described in the mouse by Stieda in 1870 and has been given the name subcommissural organ by Dendy and Nicols in 1910 (Figs. 1, 2, 3).

The physiological function of the subcommissural organ, in spite of numerous studies (Legait 17, Bargmann 5, Oksche 23, Steyn 28), is still not clear.

An important step was reached when in 1950 Stutinsky [29] succeeded in demonstrating the Gomori-positivity of the subcommissural ependyma in the Anura, thereby bringing the organ within the scope of neurosecretory investigations.

Adam [1], Barry [6], Mazzi [21, 22], Oksche [23, 24, 25], and Steyn [28] studied the subcommissural organ for its function in fish and amphibians and Bargmann and Schiebler [5] in birds and mammals. According to the results, in the vertebrates the organ is either rudimentary or actively secreting. The secreted substance is produced in the ependymal cells from where it is probably released either into the cerebrospinal fluid (apical secretion) or *via* the cell processes into the arachnoidal capillaries (basal secretion). The substance resembles the hypothalamic neurosecrete and is believed to play a significant role in the fluid household of the organism (Gilbert 11, 12, 13).

The present paper reports on our studies concerning the ependymal cells of the subcommissural organ and their comparison in different vertebrates.

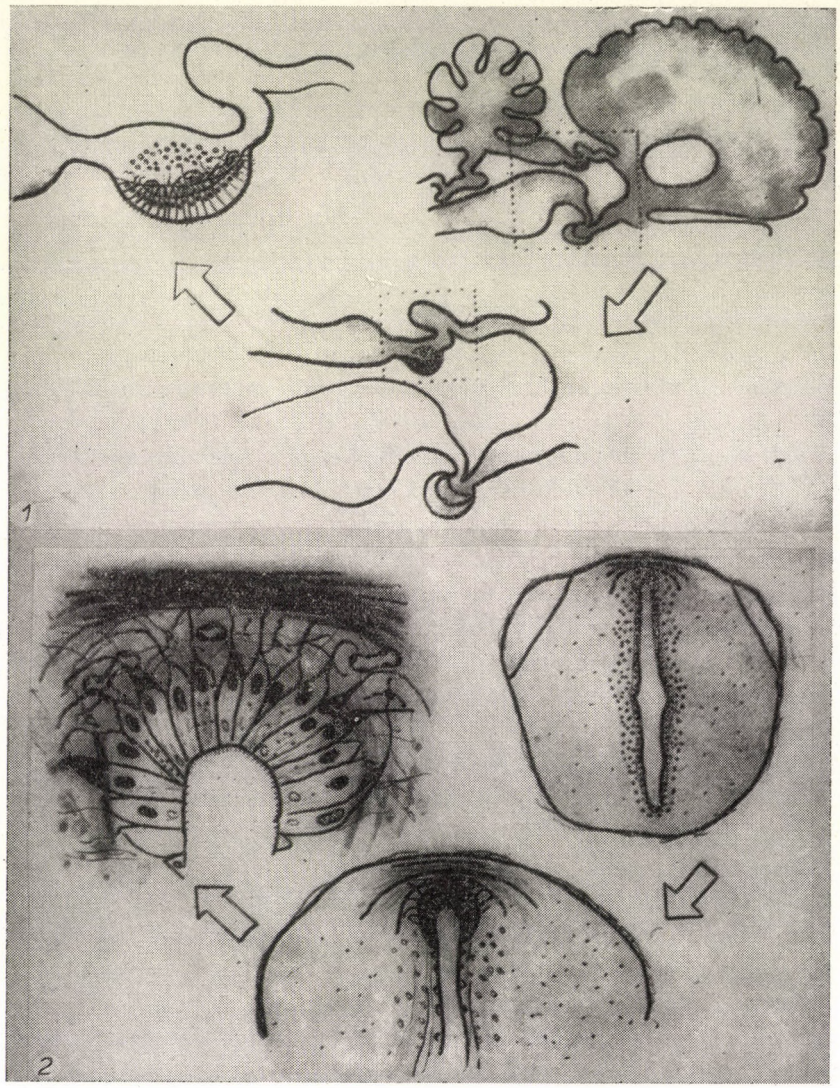


Fig. 1. Variously magnified schematic representation of the subcommissural organ in a sagittal section of the mammalian brain

Fig. 2. Transversal sections in various scales demonstrating situation of the subcommissural organ

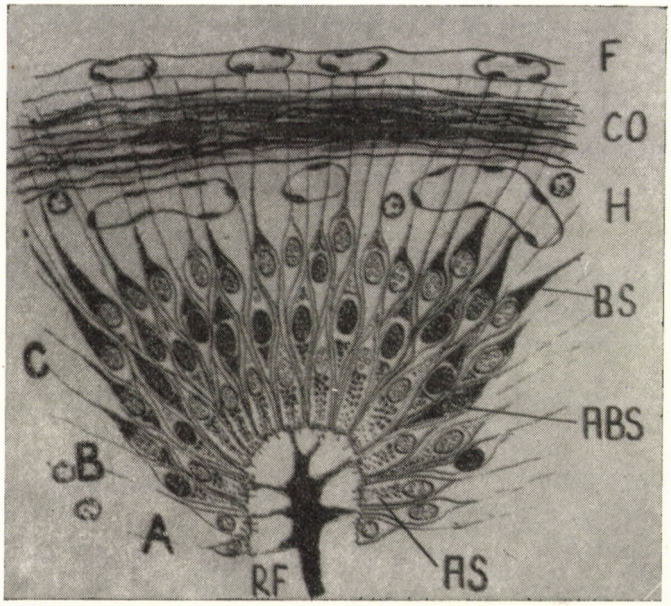


Fig. 3. Schematic frontal section of the subcommissural organ. A—B—C: Superficial, median and deep cell-rows. F: Brain surface; CO: Posterior commissure; H: Hypendyma; BS: Basal secrete in the deep layer; ABS: Apical and basal secretion in the median layer; AS: Apical secretion in the superficial cells; RF: Reissner's fibre

Material and methods

The following species were studied:

Fish.	Lebistes reticulatus.
	Brachydanio rerio.
Urodela.	Triturus vulgaris.
	Triturus cristatus.
	Pleurodeles waltlii.
	Amblystoma mexicanum.
Anura.	Rana esculenta.
	Bufo bufo.
	Bombina bombina.
	Pelobates fuscus.
Birds.	Passer domesticus.
	Columba domestica.
Mammals.	Myotis myotis.
	Rhynolophus hipposideros.
	Epimys norvegicus.

A total of 165 animals of both sexes was used. All examinations were carried out in the autumn.

The animals were decapitated and the materials were fixed in Bouin's fluid, embedded in Péterfi's methylbenzoate-celloidin-paraffin, 6 microns thick serial frontal, sagittal and horizontal sections were prepared and stained with Gomori's chromhaematoxylin-phloxin modified according to Bargmann or with Gabe's paraldehyde-fuchsin.

Results

The species studied were found to agree in the following points.

The subcommissural organ was not limited to the area underneath the posterior commissure but extended beyond it forward and backward in a measure varying from species to species. In view of certain structural dif-

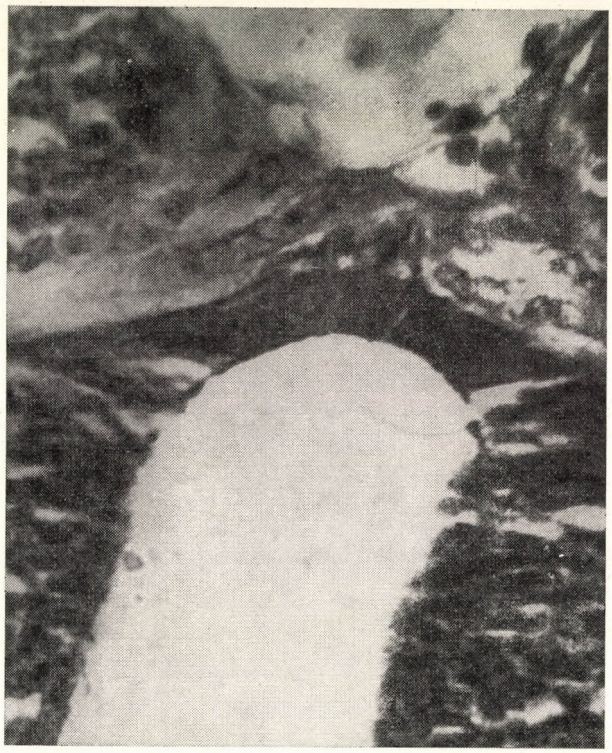


Fig. 4. Lebistes reticulatus. Frontal section through the subcommissural organ, stained with Gomori's chrome haematoxylin

ferences we divided the organ in species where it is considerably developed into three separate regions and described them as the rostral, commissural and caudal portions.

The ependymal part of the subcommissural organ in the more advanced forms of vertebrates upward of and including amphibians was found to be made up of three layers, each comprising cells arranged in rows and peculiar in shape to the layer they occur in. The superficial and the deep layers consisted of one or two rows, the intermediate in birds and mammals of five to ten. The

conical cells of the superficial layer (Fig. 3/A) were seen to terminate each in an ependymal process which traversed the superimposed layers, the majority extending across the hypendyma and the posterior commissure as far as to the outer brain surface, the rest ending in the neighbourhood of the hypendymal capillaries. The symmetrical spindle-like cells in the intermediate layer (Fig. 3/B) whose nuclei frequently stained with Orange G had a process at both ends, extending to the ventricle and to the outer brain surface. The spindle-like cells of the deep layer (Fig. 3/C) were asymmetrical in shape, with the longer portion pointing towards the hypendyma and the shorter towards the intermediate cell rows.

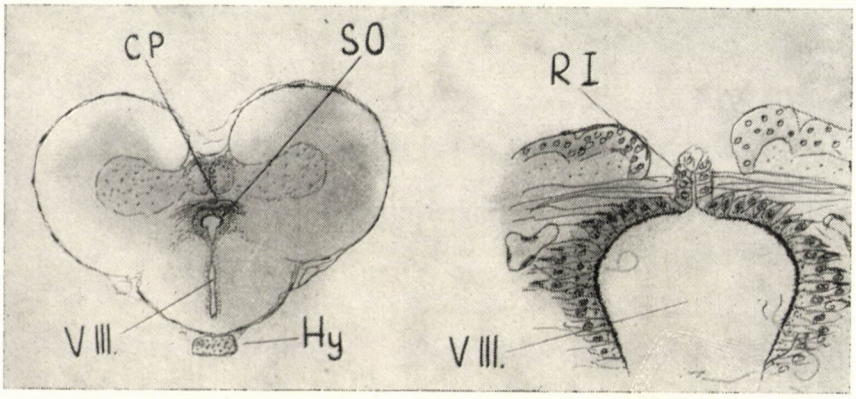


Fig. 5. Lebistes reticulatus

Left: Section at the level of the posterior commissure. CP: Posterior commissure; SO: Subcommissural organ; V III: Third ventricle; Hy: Hypophysis
Right: The subcommissural organ in the area of the intrapineal recess. RI: Intrapineal recess; V III: 3rd ventricle

In each of the three layers the Gomori positive granules may be present either in the apical portion at the ventricular side of the cells or in the basal portion at the side facing the exterior brain surface (Fig. 3). Each of these areas presented a different amount of the secreted substance, but the quantity appearing at one and the same place was invariably the same and could be regarded as a distinctive feature of the particular species.

Investigated separately, the individual species gave the following results.

In *Lebistes reticulatus* the subcommissural organ consisted of a thin hypendymal and a thicker ependymal portion (Fig. 4). The latter was made up of a superficial and a deep layer, with the constituent cells differing in shape (Fig. 5).

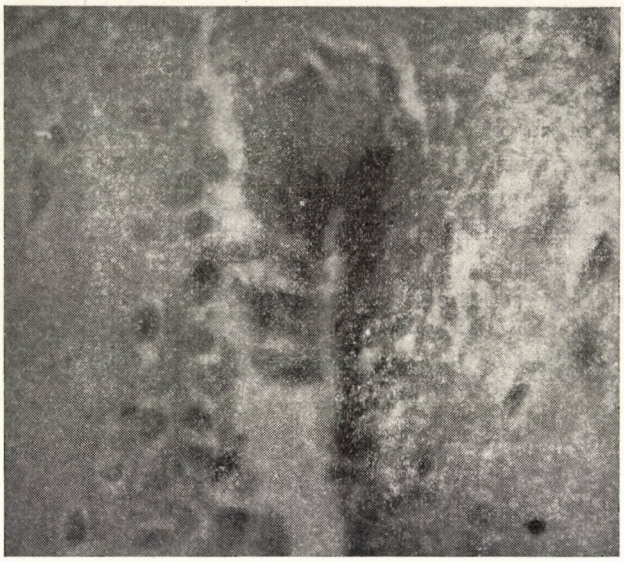


Fig. 6. Rana esculenta. Rostral portion of the subcommissural organ. Abundant apical secretion. Stained with paraldehyde-fuchsin

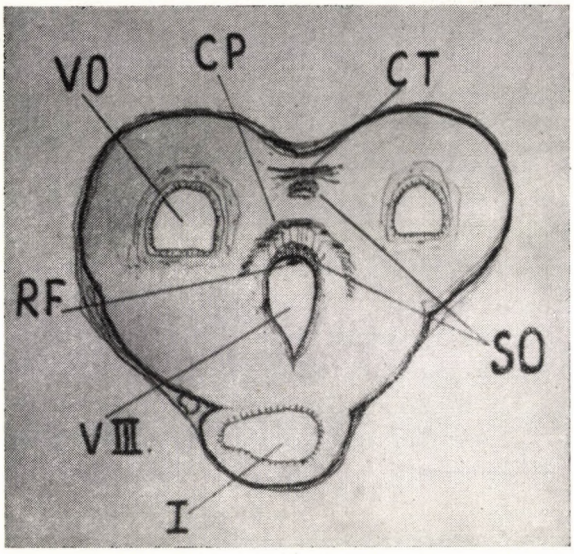


Fig. 7. Rana esculenta. Section at the level of the subcommissural organ. VO: Ventriculus opticus; CP: Posterior commissure: CT: Commissura tecti: SO: Subcommissural organ; RF: Reissner's fibre; V III: 3rd ventricle; I: Infundibulum

The superficial cells were conical, their broad ciliated sides facing the ventricle. Their ends facing the cerebral substance tapered off and terminated in thin processes which passed among the cells of the superimposed row and approached the posterior commissure. The oval nuclei were situated in the narrowing conical cell portions.

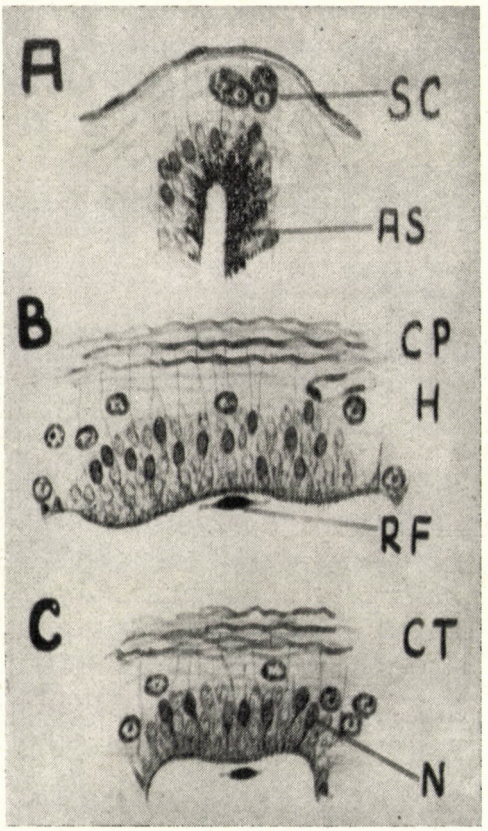


Fig. 8. Schematic representation of the subcommissural organ in the frog. A—B—C: Portions before and below the posterior commissure and below the commissura tecti; SC: Secretory nerve cells; AS: Apical secrete; CP: Posterior commissure; H: Hypendyma; RF: Reissner's fibre; CT: Commissura tecti; N: Median cell nuclei staining orange, with Orange G

The deeper situated spindle-like cells were connected with the ventricle by a cytoplasmic processe which passed through the superficial layer. Their opposite end tapered off to form the processes which extended, along with the homologous threads of the superficial cells, partly to the hypendymal blood vessels and partly across the fibres of the posterior commissure to the exterior brain surface. The oval nuclei, considerable in size as compared with

the cytoplasm, occupied the centre of the cells, dividing them into apical and basal portions.

Not only the cell forms were different but also the appearance of the secrete in the different rows. In the superficial layer, the Gomori-positive granules appeared as a fine powder settled apically between the cell nucleus and the ventricular surface, whereas in the basal thread-like process of the cytoplasm they had a wedge-like appearance. In the deeper rows the granules appeared apically and basally as a homogeneous wedge-shaped aggregation situated on either side of the nucleus. The amount of the secrete was everywhere less than in the corresponding parts of the other species.

Fig. 9. Triturus vulgaris. Section through the subcommissural organ. Paraldehyde-fuchsin stain. Arrows indicate massive cuneiform basal secrete traceable far into the ependymal process

The picture in *Branchydanio rerio* showed much resemblance to the one just described.

In *Triturus vulgaris* (Figs. 9 and 10) the subcommissural organ, reaching beyond the superposed posterior commissure, was traceable rostrally beyond the intrapineal recess and caudally a long way into the cerebral aqueduct.

The ependymal cells were arranged in several rows forming a superficial, a median and a deep layer (Fig. 11). In structure the superficial layer resembled that in the subcommissural organ of *Lebistes reticulatus* with the difference that at the basal side its cells were more abruptly tapering towards the process. The median layer consisted of several rows of symmetrical spindle-like cells in the commissural portion of the organ; the nuclei frequently stained red

with Orange G. In the deep layer the apical portions of the symmetrical spindle-like cells were rounded off, with rapidly tapering processes extending to the ventricle.

There were considerable differences in the intensity of the secretion between the cell-rows themselves and the rostral, commissural and caudal portions of the organ.

a) The rostral part (Fig. 11/A) was poor in cells. The superficial layer presented little apical granules, the intermediate and deep ones hardly any.

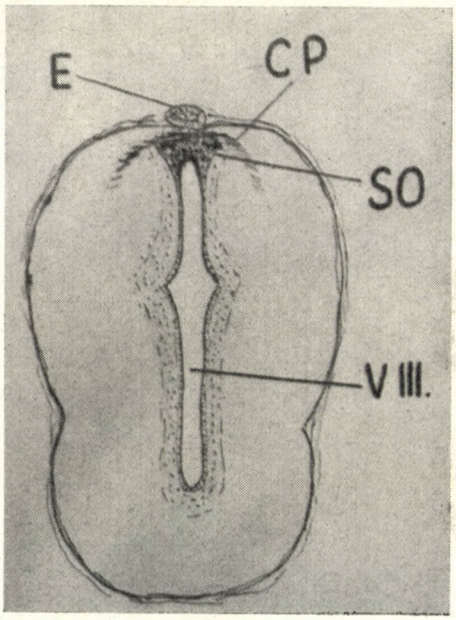


Fig. 10. Triturus vulgaris. Section at the level of the posterior commissure. E: Epiphyseal stalk; CP: Posterior commissure; SO: Subcommissural organ; V III: 3rd ventricle

b) The portion situated below the posterior commissure (Fig. 11/B) was unique for an abundance of secrete in each layer. The secrete appeared apically and in explicitly diffuse form in the superficial layer, apically and basally in the intermediate layer where it assumed a conical shape, and again basally in conical shape in the innermost layer which exceeded the other two in respect of secretory activity. Basal granules were traceable a fairly long distance inside the fibrils spreading across the hypendyma in which there were cells reminiscent of ganglion cells, similar to those observed in *Rana esculanta* (see further). Ependymal processes leading towards the brain surface and replete with secretory substance were seen to pass between these

cells. The colloid particles about the ganglion cell nuclei gave a strong Gomori-positivity.

Additional features of the commissural portion were that the median layer was made up of three to four cell-rows and that most of the cell nuclei stained an orange red with paraldehyde-fuchsin.

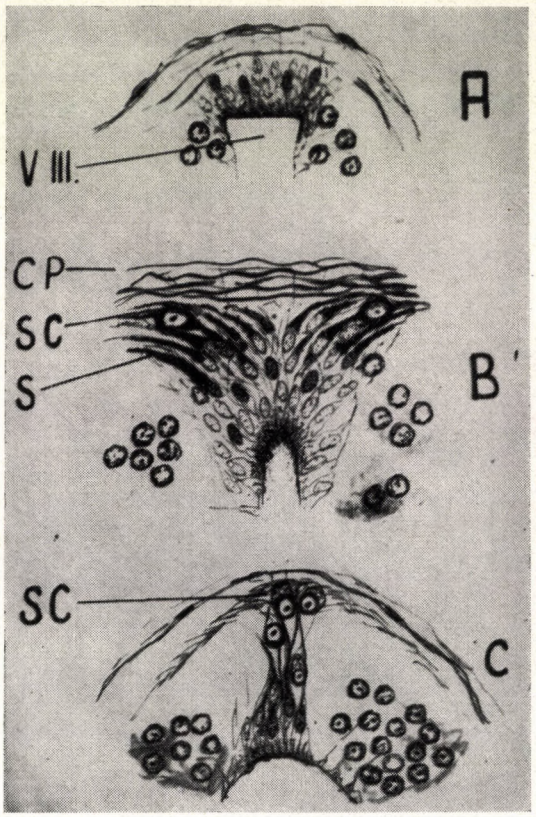


Fig. 11. Triturus vulgaris. Schematic illustration of the subcommissural organ in the rostral commissural and caudal portions. V III: 3rd ventricle; CP: Posterior commissure; SC: Secretory nerve cells; S: Basal secrete

c) In the caudal portion, the apical secretion of the superficial, and the basal secretion of the lowermost, cells were the most intensive.

The subcommissural organ of *Triturus cristatus* essentially agreed with that of *Triturus vulgaris*.

Different from the preceding were the pictures of all the three portions in the subcommissural organ of *Pleurodeles waltlii*, presenting a finely powdered

apical secrete stronger even than observed in the *Triturus* genus, in fact exceeding in intensity all the other examined species (Fig. 12).

In the caudal portion underneath the ependyma there was a ganglion consisting of a few cells with Gomori-positive granules in them (Fig. 13). The ependymal cell processes filled with secrete and extending towards the brain surface were observed to entwine the ganglion cells very closely.

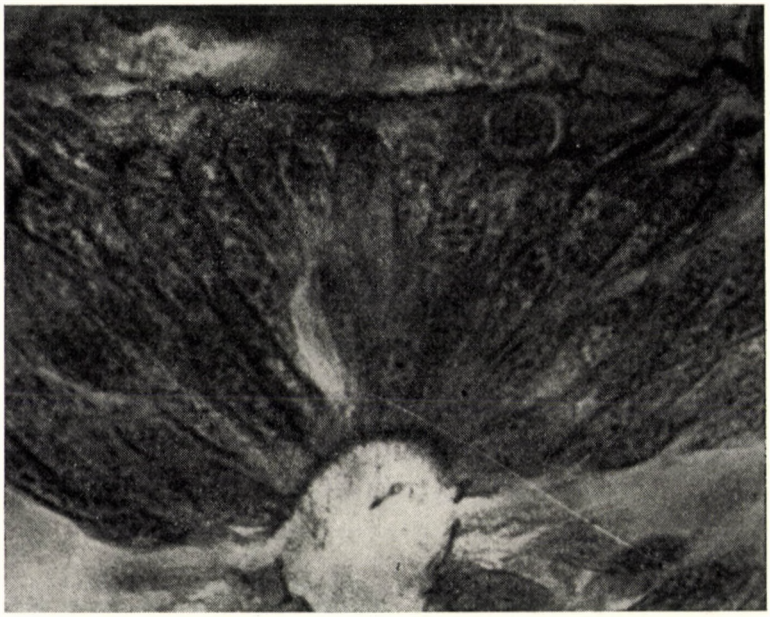


Fig. 12. Pleurodeles waltlii. Subcommissural organ in cross-section. Paraldehyde-fuchsin stain. Abundant basal secrete

The subcommissural organ in *Amblystoma mexicanum* was similar to that of *Pleurodeles waltlii.*

Rana esculenta (Figs. 6 and 7) agreed with the Urodela in the triple stratification of the subcommissural organ but differed in the behaviour of the individual layers. In view of these differences as also of the size of the organ we again summarized our findings in three groups separately for the portions in front of, underneath and behind, the posterior commissure.

a) In the rostral portion (Figs. 6 and 8/A) intensive apical secretory activity of the superficial and median rows gave rise on the ventricular surface to a multitude of massive, colloidal Gomori-positive granules. Basal secretion was feeble in every layer. A further conspicuous feature of this portion was the presence of ganglion cells with copious cytoplasm underneath the ependy-

mal layer and exhibiting, as a sign of their neurosecretory activity, intensely staining Gomori-positive granules interspersed with vacuoles.

b) In the commissural portion (Fig. 8/B) the secretory activity seemed to have greatly diminished. The intermediate layer consisted here of three to four rows, with a moderate amount of secrete present at the apical sides of the cells. It was at this level that Reissner's fibre appeared, giving Gomori-positivity.

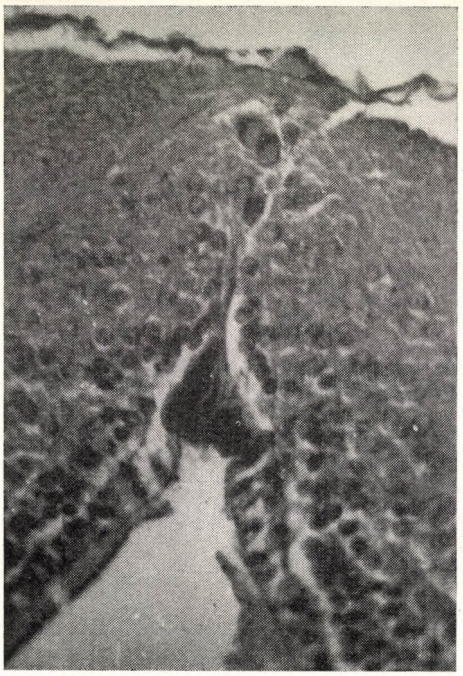


Fig. 13. Pleurodeles waltlii. Caudal portion of subcommissural organ. Paraldehyde-fuchsin stain

c) The caudal portion of the organ, situated below the commissura tecti (Fig. 8/C), contained less cells, with secretion apically, on the ventricular surfaces of the median and superficial rows.

Similar conditions were found in *Bufo bufo*, *Bombina bombina* and *Pelobates fuscus*.

In *Columba domestica* (Fig. 14) the organ was situated almost exactly under the posterior commissure, extending just a little beyond it front and rearwards. The intermediate layer consisted of five to ten rows (Fig. 15/*b*) with the cells closely compressed. There was little perinuclear cytoplasm;

Fig. 14. Columba domestica. Subcommissural organ in cross-section. Gomori's chrome-haematoxylin-phloxin stain

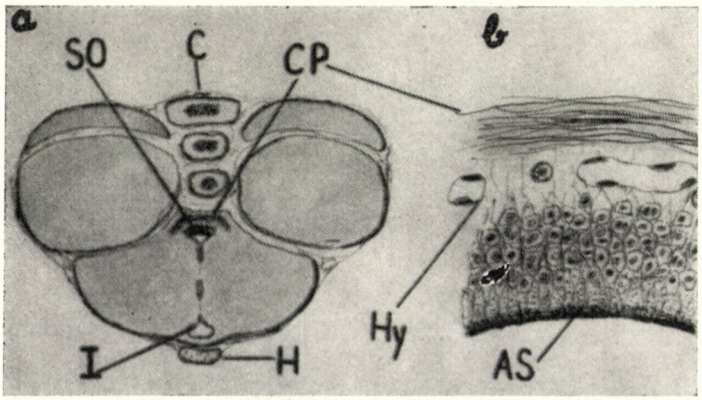


Fig. 15. Columba domestica

Left: Brain
Right: Enlarged schematic representation of subcommissural organ. SO: Subcommissural organ; C: Cerebellum; CP: Posterior commissure; I: Infundibulum; H: Hypophysis; Hy: Hypendyma; AS: Apical secrete

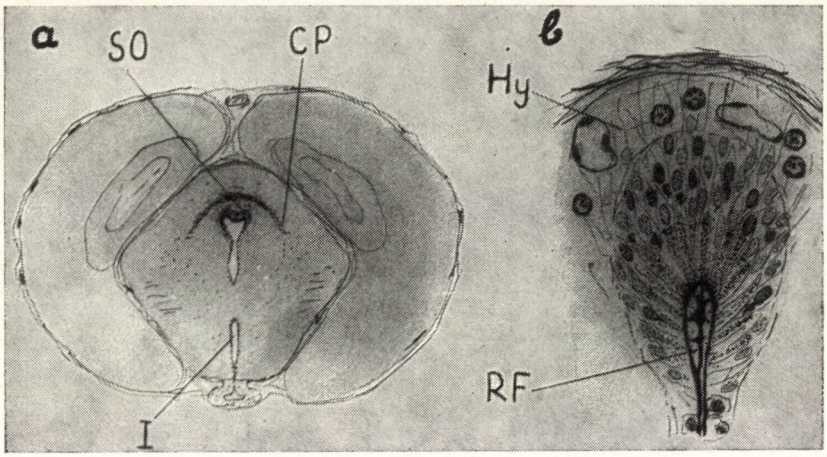


Fig. 16. Left: *Myotis myotis.* Section at the level of the posterior commissure. SO: Subcommissural organ; CP: Posterior commissure; I: Infundibulum
Right: *Epimys norvegicus.* Schematic representation of subcommissural organ. Hy: Hypendyma; RF: Reissner's fibre

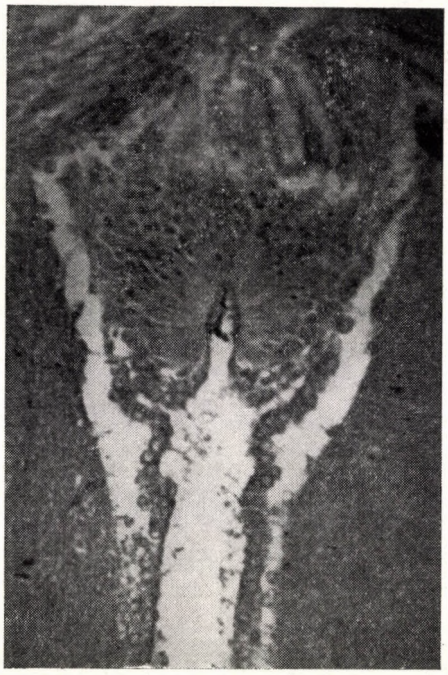


Fig. 17. Epimys norvegicus. Subcommissural organ in cross-section. Paraldehyde-fuchsin stain

processes were absent. Secrete was scanty around the nuclei but occurred in abundance in the apical part of the superficial layer.

Very similar were our findings concerning the organ in *Passer domesticus* which produced apical secretion apparently in the superficial layer only.

The subcommissural organ in *Myotis myotis* (Fig. 16/*a*) showed much resemblance to that of the albino rat. In the elongated cells of the superficial layer there was apical secretion. The majority of the intermediate cell nuclei stained with Orange G. The deep layer next to the hypendyma consisted of

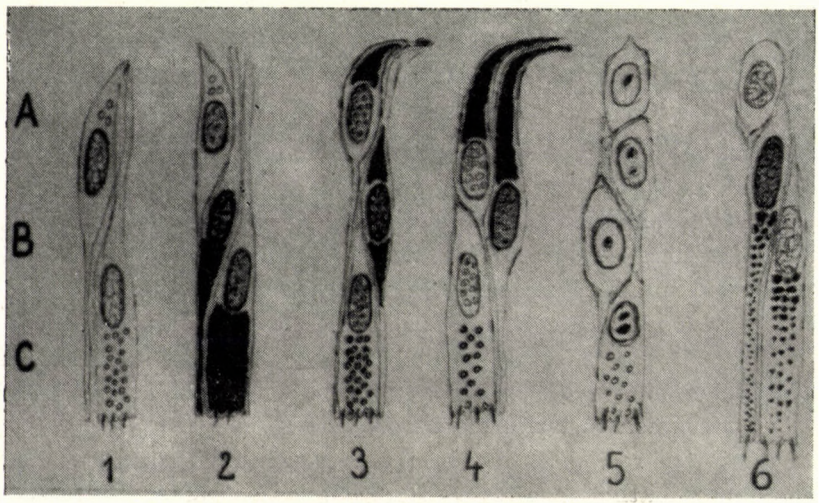


Fig. 18. Schematic representation of subcommissural secretion in various species. 1. *Lebistes reticulatus.* 2. *Rana esculenta.* 3. *Triturus cristatus.* 4. *Pleurodeles waltlii.* 5. *Columba domestica.* 6. *Epimsy norvegicus.* A: basal — B: median — C: apical region

but a few cells; their thin cytoplasmic processes with cuneiform incipient parts contained little secrete and extended between the intermediate cell rows towards the ventricle. Basal secretion occurred in none of the layers.

Much the same was the picture in *Rhynolophus hipposideros.*

Epimys norvegicus (Fig. 16/*b*) presented extremely elongated conical cells in the superficial layer. The intermediate layer consisted of four to five rows, the cells situated closer to the surface emitted broad processes extending towards the ventricle. The deep layer was composed of round cells with barely traceable processes. Apical secrete comprising granules of different sizes was seen in the median and superficial layers (Fig. 17). Basal secretion was observed in neither of them.

Discussion

Various qualities suggest themselves as a basis for the comparison of the subcommissural organs of the different animal species. The organ presenting basal and apical secretion of various intensity, has been described to contain cylindrical ependymal cells, a statement which our findings did not corroborate. In the species examined by us the cells were conical or spindle-shaped, occasionally polygonal, but never cylindrical and were always seen to have one or two processes.

Our examinations revealed the organ in most species to comprise three layers, each including a different type of cells (Fig. 3) viz.

1. a superficial layer,
2. an intermediate layer,
3. a deep layer.

The cells of the superficial layer have oval nuclei and are conical or triangular, their bases constituting the ventricular wall and their apices tapering off to form ependymal processes.

The spindlelike cells of the intermediate layer have one process at each end, the one extending to the ventricle and the other to the external face of the brain. The elongated nuclei are oval and stain frequently with Orange G.

The third layer consists of basally situated spindle-like cells, asymmetrical or sometimes polygonal, and characterized, especially in amphibians, by long cytoplasmic basal and thin apical processes.

There are two regions for the secrete to present itself in the cells of each layer: the basal and the apical parts. Four of the resulting six different places of appearance, namely, the apical region in the superficial, the apical and the basal in the intermediate and the basal in the deep layer were seen to display a more intense secretory activity than the rest. The apical secretion usually goes hand in hand with a multiplication of the Gomori-positive granules and with an intensive staining of Reissner's fibre. The basal secretory substance is traceable a fairly long way in the ependyma processes extending towards the posterior commissure.

The distribution of the secreted substance over the various regions differs from species to species and is characteristic of each of them. These changes are presumably due to functional differences. Discrimination between the three cell types and between basal and apical forms of secretion within each furnishes a proper ground for exact comparison and for determining changes in the state of the organ.

Neither is the secretory activity identical in the rostral, commissural and caudal portions, as has been observed by LEGAIT [17]. Since neither the median-sagittal nor the horizontal section proved adequate for the purpose of our study, the former because the secretory ependymal cells are frequently

situated symmetrically on both sides and the latter because it is impossible to obtain a true image of the location of the secretion granules in the cells by cutting them across, serially prepared frontal sections were the only ones amenable to comparison.

The examined groups showed the following typical forms of secretory activity, as illustrated in Fig. 18.

1. Fish: apical in the superficial cells, mildly basal in the deeper ones.
2. Anura: extremely strong apical in the median and the superficial cells.
3. Triturus genus: moderate apical in the superficial, strong apical and strong basal in the intermediate, strong basal in the deeply situated cells.
4. Pleurodeles: moderate apical in the superficial, very intensive basal in the intermediate and deep layers.
5. Birds: weak apical in the superficial cell-row.
6. Mammals: moderate in the superficial and median rows.

A comparison of the subcommissural organs in the various species revealed the most intensive secretory activity in the amphibians: a phenomenon which in our opinion is quite compatible with their life conditions. Histochemical and physiological investigations (Wislocki and Leduc 32, 33, Bargmann and Schiebler 5, Olsson 26, Gilbert 11, 12, 13 and others) revealed a similarity between the subcommissural and hypothalamic secretions. It seems justifiable to attribute them a significant functional role in species of partly aquatic partly terrestrial habitat.

In the fish the organ usually consists of one or two cell-rows. In amphibians, caudate or non-caudate, there are two or three of them and the spindle-like-cells of the second layer appear to represent a more differentiated form of the superficial integumentary conical cells, as can be inferred from the intermediate transitory forms. The spindle-cells of asymmetrical design in the deepest row show differentiation to a still higher stage of development.

A remarkable feature observed in the subcommissural organ was the presence of ganglion cells (Fig. 13) situated below the ependymal cells in the rostral and median portions and between the ependymal processes in the caudal portion. Those in front displayed neurosecretory activity, presenting a varying number of intensely staining Gomori-positive granules interspersed with vacuoles, and nuclei enlarged in different degrees. The cells situated caudally between the basal ependymal processes replete with secrete are rich in cytoplasm and form an elongated nucleus reaching in the mesencephalon.

Recent electron-microscopic findings (Horstmann 16, Fleischhauer 10) do not favour the view that the ependymal processes are supporting elements (Lenhossék 20 and others) but prove that the glial processes are always surrounded by a thin protoplasmic layer. It is hardly possible that any change in the metabolism of the ependymal cells should go without a corresponding one in the ganglion cells which they closely enfold with their processes.

Obviously there exists a close functional interrelationship between the ependymal processes and the ganglion cells which have entered into a morphologically distinct union. This reciprocal activity still awaits confirmation in detail by experiments in progress.

Summary

The ependymal cells of the subcommissural organ in fish, amphibians, birds and mammals have been found to be arranged in several rows, each row consisting of a different type of cell. Gomori-positive secretion occurred in each, either apically or basally.

The fact that of all examined species the amphibians displayed the most intensive secretory activity may be explained by their particular oecological conditions. The appearance of the second and third cell rows is interpreted as a result of advanced differentiation.

REFERENCES

1. ADAM, H. (1958): Zur Morphologie der ventrikelnahen Hirnwandgebiete bei Cyclostomen und Amphybien. Verh. Deutsch. zool. Ges. Frankfurt a/M. Akad. Verlag. Leipzig. 251—264. — 2. AFZELIUS, B. A.—OLSSON, R. (1957): The Fine Structure of the Subcommissural Cells and of Reissner's Fibre in Myxine. Z. Zellforsch. *46*, 672—685. — 3. ARVYL, L.—FONTAINE, M.—GABE, M. (1957): Modifications histologiques de l'organe souscommissural au cours du cycle evolutif de Salmo Salar. Arch. Anat. micr. *44*, 313—322. — 4. BARGMANN, W. (1943): Die Epiphysis cerebri. In Möllendorf and Bargmann: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. Springer Verlag, Berlin. Vol. *6*, 4. 309. — 5. BARGMANN, W.—SCHIEBLER, TH. (1952): Histologische und Cytochemische Untersuchungen am Subcommissuralorgan von Säugern. Z. Zellforsch. *37*, 593—596. — 6. BARRY, J. (1954): Contribution à l'étude de la neurosécrétion. Biol. méd. *13*, 3, 1—15. — 7. BOSQUE, G.—ARRANZ, B.—ARNAIZ, S. (1958): L'organe souscommissural chez Cavia cobaya adulte. Acta anat. (Basel) *33*, 65—75. — 8. DENDY, A.—NICHOLLS, G. E. (1910): On the Occurrence of a Mesocoelic Recess in the Human Brain, and its Relation to the Subcommissural Organ of Lower Vertebrates; with Special Reference to the Distribution of Reissner's Fibre in the Vertebrate Series and its Possible Function. Anat. Anz. *37*, 496. — 9. ENAMI, M. (1954): Studies on Neurosecretion. I. Preoptico-Subcommissural Neurosecretory System in the Eel *(Anguilla japonica)*. Endocr. jap. *1*, 133—145. — 10. FLEISCHHAUER, K. (1957): Untersuchungen am Ependym des Zwischen- und Mittelhirns der Landschildkröte *(Testudo graeca)*. Z. Zellforsch. *46*, 729—767. — 11. GILBERT, G. J. (1956): The Subcommissural Organ. Anat. Rec. *126*, 253—266. — 12. GILBERT, G. J. (1957): The Subcommissural Organ: a Regulator of Thirst. Amer. J. Physiol. *191*, 243—247. — 13. GILBERT, G. J. (1958): Subcommissural Organ Secretion in the Dehydrated Rat. Anat. Rec. *132*, 563—567. — 14. GOSLAR, H. G.—TISCHENDORF, F. (1953): Cytologische Untersuchungen an den »vegetativen« Zellgruppen des Mes- und Rhombencephalon bei Teleostiern und Amphibien, nebst Bemerkungen über Hypothalamus und Ependym. Z. Anat. Entw. Gesch. *117*, 259—294. — 15. GRIGNON, G.—GRIGNON, M. (1958): Activité élaborative de l'organe souscommissural chez l'embryon de Poulet. C. R. Soc. Anat. (Paris). *44*, 889—891. — 16. HORSTMANN, E. (1954): Die Faserglia des Selachiergehirns. Z. Zellforsch. *39*, 588—617. — 17. LEGAIT, E. (1942): Les formations épendimaires du troisième ventricule Thesis Nancy. — 18. LEGAIT, H.—LEGAIT, E. (1956): Apropos de la structure et de l'innervation des organes épendimaires du III^{e} ventricule chez les Batraciens et Reptiles. C. R. Soc. Biol. (Paris) *150*, 1982—1984. — 19. LEGAIT, H. (1959): Contribution à l'étude morphologique et expérimentale du système hypothalamo-neurohypophysaire de la Poule Rhode-Island. Thesis Louvain. — 20. LENHOSSÉK, M. (1895): Der feinere Bau des Nervensystems. 2nd Ed. Fischer, Berlin. — 21. MAZZI, V. (1952): Caratteri secretori delle cellule dell'organo sottocommissurale dei vertebrati inferiori. Arch. Zool. ital. *37*, 448—464. — 22. MAZZI, V. (1954): Alcune osservazione intorno al sistema nevrosecretorio ipotalamo-ipofisario e all'organo sottocommissurale nell' ontogenesi di Rana agilis. Monit. Zool. ital. *62*, 78—82. — 23. OKSCHE, A. (1954): Über die Art und Bedeutung sekretorischer Zelltätigkeit in der Zirbel und im Subcommissuralorgan. Anat. Anz. *101*, 88—96. — 24. OKSCHE, A. (1955): Untersuchungen über die Nervenzellen und Nervenverbindungen des Stirnorgans der Epiphyse und des Subcommissuralorgans bei Anuren Amphybien. Morph. Jb. *117*, 50. — 25. OKSCHE, A. (1956): Funktionelle histologische Untersuchungen über die Organe des Zwischenhirndaches der Chordaten. Anat. Anz. *102*, 404—449. — 26. OLLSON, R. (1958): Studies on the Subcommissural Organ. Acta zool. (Stockh.) *39*, 71. — 27. STAHL A. (1957): Recherches sur les álaborations

cellulaires et la néurosécrétion dans l'encéphale des poissons téléostéens. Acta anat. (Basel) *31*, Suppl. 28. — 28. STEYN, V. (1959): Some Problems of the Diencephalic Roof in Lower Vertebrates. Sth. Afr. J. med. Sci. *55*, 4. 93—95. — 29. STUTINSKY, F. (1950): Colloide, corps de Herring et substance Gomori-positive de la neurohypophyse. C. R. Soc. Biol. (Paris) *144*, 1357—1360. — 30. STUTINSKY, F. (1953): La néurosécrétion chez l'anguille normale et hypophysectomisée. Z. Zellforsch. *39*, 276—297. — 31. WINGSTRAND, K. G. (1953): Neurosecretion and Antidiuretic Activity in Chick Embryos with Remarks on the Subcommissural Organ. Arch. Zool. *6*, 41—67. — 32. WISLOCKI, G. B.—LEDUC, E. H. (1952): The Cytology and Histochemistry of the Subcommissural Organ and Reissner's Fiber in Rodents. J. comp. Neurol. *97*, 515—544. — 33. WISLOCKI, G. B.—LEDUC, E. H. (1954): The Citology of the Subcommissural Organ, Reissner's Fiber, Periventricular Glial Cells, and Posterior Collicular Recess of the Rat's Brain. J. comp. Neurol. *101*, 283—310. — 34. WISLOCKI, G. B.—ROTH, W. D. (1958): Selective Staining of the Human Subcommissural Organ. Anat. Rec. *130*, 125—134. — 35. YAMADA, H.—OZAWA, S.—KUSHIMA, S.—NAKAI, A. (1957): Innervation of the Pineal Body and the Subcommissural and Supracommissural Organs of the Dog. Bull. Tokyo med. dent. Univ. *4*, 174—188.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭПЕНДИМАЛЬНОЙ НЕЙРОСЕКРЕЦИИ I. СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛОЖИТЕЛЬНОЙ СЕКРЕЦИИ ПО ГЁМЁРИ СУБКОММИСУРАЛЬНОГО ОРГАНА НА РАЗЛИЧНЫХ ПОЗВОНОЧНЫХ

Б. ВИГ, Б. АРОШ, Б. ЗАРАНД, И. ТЁРК и Т. ВЕНГЕР

Исследовались субкомиссуральные органы рыб, земноводных, птиц и млекопитающих.

Эпендимальные клетки субкомиссурального органа располагаются в нескольких рядах, причем каждый ряд состоит из клеток иного типа. Положительная секреция по Гёмёри может иметь место во всех типах клеток в апикальной или базальной форме.

Принимая во внимание вышесказанное авторы описывают характера секреции различных видов позвоночных.

При сравнении отдельных видов самую интенсивную, распространяющуюся на все типы секреции, функцию авторы установили у земноводных. По их мнению это наблюдение находится в связи с экологическими условиями исследованных видов животных.

Появление второго и третьего клеточных рядов авторы приводили в связь с повышенной дифференцией.

UNTERSUCHUNG DER EPENDYMALEN NEUROSEKRETION I. VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNG DER GOMORI-POSITIVEN SEKRETION DES SUBCOMMISSURALEN ORGANS BEI VERSCHIEDENEN WIRBELTIEREN

B. VIGH, B. AROS, P. ZARÁND, I. TÖRK und T. WENGER

Die subcommissuralen Organe von Fischen, Amphibien, Vögeln und Säugetieren wurde untersucht.

Die Ependymzellen des subcommissuralen Organs bilden mehrere Reihen, wobei jede Reihe aus einem anderen Zellentyp aufgebaut ist. Die Gomori-positive Sekretion kann in jedem der Zellentypen in apikaler und basaler Form auftreten.

Es wurde der Sekretionscharakter der untersuchten verschiedenenTierarten beschrieben.

Vergleicht man die einzelnen Arten, so kann die intensivste, sich auf jeden Sekretionstyp erstreckende Funktion bei den Amphibien festgestellt werden, was mit den ökologischen Verhältnissen der betreffenden Arten zusammenhängen dürfte.

Das Auftreten einer zweiten und dritten Zellenreihe wird mit der höheren Differenzierung in Verbindung gebracht.

Dr. Béla VIGH
Dr. Béla AROS
Péter ZARÁND
István TÖRK
Tibor WENGER

Budapest IX. Tűzoltó u. 58. Hungary

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

PROBLEME DER EMBRYONALEN FASERENTWICKLUNG

L. Karmazsin

(Eingegangen am 28. Juni 1960)

Genese und Morphologie der Bindegewebsfasern bilden seit langer Zeit ein grundlegendes Problem der Histologie. Ein Teil der Untersuchungen sollte die Rolle der Zellen klären, während sich die andere Forschungsrichtung mit der Struktur der Fasern und ihrer Beziehung zur intrazellulären Substanz befaßte. Hinsichtlich der Rolle der Zellen traten zwei Auffassungen zutage: Nach Ansicht der Forscher, die die intrazelluläre Theorie vertreten, sei es eine beweisbare Tatsache, daß die Fasern direkt oder indirekt Zellprodukte darstellen (Flemming, 22, u. a.). Laut anderen hervorragenden Forschern, die zu entgegengesetzten Schlußfolgerungen gelangten (Henle, 30; Koelliker, 36; Renaunt, 55; Scheffer, 59), stammen die jüngsten Fibrillen aus der die Zellen unmittelbar umgebenden Substanz. Von den Arbeiten, welche die Klärung dieser Frage zu fördern versuchten, sollen diejenigen hervorgehoben werden, welche die Genese der am frühesten entstehenden Fasern, der Mesenchymfibrillen, untersuchten. Nach Szilys [65] Feststellungen ist vor dem Erscheinen der Mesenchymzellen — an ihrem Platze — eine zellfreie Gewebssubstanz anzutreffen, in welche die über Faserbildungseigenschaften verfügenden Zellen sekundär hineinwachsen.

Studnicka [64], Alfajew [1] und Tello [66] fanden, daß die Mesenchymfibrillen in der Zelle entstehen. Laut Hartmann [29] bilden sich die Fasern erst im intrazellulären Retikulum, dann gestalten sie sich zu ektoplasmatischen Gebilden um, lösen sich von der Zelloberfläche ab und entwickeln sich im Interstitium weiter. Die im Frühstadium zur Entwicklung kommenden Fasern des Mesenchyms hat man angesichts ihrer Imprägnierbarkeit mit Silbersalzen argyrophile Fasern genannt. Rewutzkaja [56] schreibt den Fibroblasten eine primäre Rolle in der Faserbildung zu. Krompecher [37] fand, daß die elastischen Fasern von den sog. Elastoblasten erzeugt werden. Lelkes und Karmazsin [40] gelangten auf Grund der Beobachtung von Gewebskulturen zu dem Schluß, daß zur Formation der elastischen Fasern die formative oder fermentative Tätigkeit der Zellen erforderlich sei. Bang [6] hat in lebenden Zellen breite intrazytoplasmatische Fibrillen beobachtet. Hall und Mitarbeiter [27] stellten fest, daß im Verlauf der Biosynthese durch

die Fibroblasten eine heterogene Substanz entseht, aus der durch verschiedene Kombination der Fragmente teils Elastin, teils Kollagen synthetisiert werden kann. WASSERMANN [68] hat bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung der auf die Tenotomie folgenden Regenerate nachgewiesen, daß in den Fibroblasten 100—200 Å breite primäre Fibrillen zu sehen sind. Diese Fibrillen liegen in der Marginalzone der Zelle und bilden sich nach ihrer Ablösung durch allmähliche Aggregation zu definitiven Fasern um. RAGAN [53] schreibt in seinem Übersichtsreferat, daß im Verlauf der Biosynthese durch die Fibroblasten eine lebende Substanz von Eiweißcharakter produziert wird und aus dieser Substanz von der Chondroitinschwefelsäure als multivalentem Anion fibröse Moleküle aggregiert werden, die nach Veränderung der physiko-chemischen Bedingungen zur extrazellulären Fibrillenassoziation neigen. ENGHUSEN [21] beobachtete in gezüchteten Mesenchymzellen Vakuolen, deren Inhalt unter Wirkung der Hortega-Lösung Reduktion erleidet, bei pH 7 ausgefällt wird und in ihren chemischen Eigenschaften mit Reticulin übereinstimmt.

Da wir uns im Rahmen unserer Untersuchungen vor allem mit den Entstehungsbedingungen der kollagenen Faser beschäftigen, sollen im folgenden die im Bereich der Kollagenforschung erzielten Resultate erwähnt werden. Nach NAGEOTTE [49] und BAITSELL [5] entstehen die kollagenen Fasern aus der Grundsubstanz, während LAGUESSE [39] den Zellen Bedeutung beimißt. PORTER und VANAMEE [52] untersuchten elektronenmikroskopisch die in vitro entstandenen Fasern. Der Diameter des dominanten Fasertyps war gewöhnlich kleiner als 400 Å. Die Fasern zeigten eine Periodizität von 240 Å. Außerdem kamen noch sog. Protofibrillen vor, deren Durchmesser 50—100 Å mit einer Streifung von 270 Å betrug. Nach den Autoren repräsentieren diese Protofibrillen die primäre Assoziation der kollagenen Makromoleküle. ENGHUSEN [20] stellte fest, daß die kollagenen Fibrillen zellulär und auch azellulär zustande kommen können.

Bereits anläßlich der lichtmikroskopischen Untersuchung tauchte die Frage auf, ob zwischen den Fasern nicht auch Bindesubstanz anzutreffen sei. Laut RANVIER [54] befindet sich zwischen den Fasern nur Lymphe, während RENAUNT [55] feststellte, daß die Fasern von einem mukoiden, viskösen, amorphen Gel umschlossen sind. Nach den Versuchsergebnissen von KLING und CAMERON [35] sowie GROSSFELD, MEYER und GODMAN [23] spielen die aus den mesenchymalen Zellen differenzierten Fibroblasten nicht nur in der Produktion der verschiedenen Bindegewebsstrukturen eine Rolle, sondern auch in der Erzeugung der Substanz, welche sie umgibt. Bei der Untersuchung der chemischen Natur dieses Bindemittels stellte sich heraus, daß es Mukopolysaccharide und Proteine enthält, die frei oder miteinander vermischt vorkommen.

Bei unseren Untersuchungen stellten wir uns die Aufgabe, die Bedingungen der Faserentwicklung an der Differenzierung eines Gewebes zu verfolgen.

Als Versuchsmaterial wählten wir die Hornhaut des Hühnerembryos, weil dieses Gewebe die Untersuchung der kollagenen Fasern ermöglicht und zugleich reichlich Bindesubstanz enthält.

*

Mit der Entwicklung des Bulbus von Hühnerembryonen hat sich — die täglichen Veränderungen registrierend — zuerst BAER [3] befaßt. Seit 1900 beschäftigten sich mit der Entwicklungsgeschichte des Auges im Verlauf experimenteller Arbeiten zahlreiche Autoren. LENHOSSÉK [41] besprach die Fasern der Zonula, NORDMANN [50] untersuchte die Entwicklung der Linse, LADIJENSKI [38], LAGUESSE [39], HAGEDORN [26], SEEFELDER [62], WATZKA [69], JASSWOIN [34], HAMBURGER und HAMILTON [28], COULOMBRE [14, 17] sowie MEYER [48] befaßten sich mit der Differenzierung der Cornea.

Nach den Untersuchungen von SEEFELDER [62] entstehen Hornhaut, Pupillarmembran und Regenbogenhaut aus einer ursprünglich einheitlichen Gewebsmasse. Weiterhin stellte er fest, daß in der Entwicklung der Cornea des Menschen und der Vögel — besonders der Hühner — weitgehende Übereinstimmung besteht. Laut LENHOSSÉK (1903) entsteht im Raum zwischen dem oberflächlichen Ektoderm und der Linse unmittelbar nach Abschnürung der Linse ein Fasernnetz, der sog. vordere Glaskörper, der von STUDNICKA [64] als Mesostroma bezeichnet wurde. Diese feine Membran färbt sich kräftig mit Anilinblau und liegt im 3—4tägigen Entwicklungsstadium parallel zum Oberflächenektoderm. Nach LAGUESSE [39] erscheinen die Zellen, welche die Grundsubstanz der Cornea bilden, zuerst am 5. Entwicklungstage. Diese Einwanderung geht von der corneoskleralen Grenze aus und bekommt am 7. Tage einen neuerlichen kräftigen Impuls. Er erwähnt ferner, daß sich vorher eine fibrilläre Substanz zwischen den beiden Epithelschichten bildet, in welche die mesenchymalen Zellen hineinwachsen. Nach Erscheinen der Zellen kommt eine mächtige Fibrillenproliferation in Gang, deren Orientation auf Grund der primären Gitter vorauszusehen ist. MEYER und RAHILLY [48] wenden zur Bezeichnung der Entwicklungsprozesse eine besondere Einteilung an und bringen den Differenzierungsprozeß der Gewebe mit der Entwicklung des ganzen Embryos in Zusammenhang. Auch diese Autoren fanden, daß die Zellen vom Rand des Augenbechers unter das Epithel einwandern und die Mesothelialschicht der Cornea bilden. Ihrer Ansicht nach ist der vordere Augenkörper eine azelluläre, fibrilläre Schicht, die HAGEDORN [26] postepitheliale Schicht nennt. Im 4tätigen Entwicklungsstadium besteht die Cornea aus drei Bestandteilen: Epithel, azellulär-postepitheliale Schicht und Mesothel. Anschließend erscheinen die Fasern der Substantia propria. Nach COULOMBRE [15] setzt die Bildung der kollagenen Fasern des Stromas am 8. Tage ein, und am 14. Tage sei bereits ein völlig differenziertes Bild zu sehen. WATZKA [69] meint, die am 7. Tage anwesenden Fasern wären als Präkollagen zu betrachten.

LADIJENSKI [38] beobachtete indessen kollagene Fasern schon in diesem Stadium. WATZKA [69] fand, die Entwicklung der hinteren Membran beginne am 7. Tage, und am 11.—12. Tage sei sie bereits in ihrer endgültigen Form anzutreffen. LAGUESSE [39] und JASSWOIN [34] vertreten die Meinung, daß die vordere und hintere Grenzmembran gleichzeitig entstehen.

Laut JAKUS [33] besteht die vordere Grenzschicht aus feinen Fibrillenbündeln, die den kollagenen Fibrillen gleichen und etwa bei derselben Streifung auch Querstreifen aufweisen. In bezug auf die hintere Membran stellt er fest, daß die in der Nachbarschaft des Stromas befindlichen Fibrillen große Ähnlichkeit mit dem bekannten Bild der Fibrillen der Tunica propria zeigen. WISLOCKI [71] und andere haben sich eingehend mit der Histochemie der Grenzschichten beschäftigt.

Auf Grund eigener Untersuchungen hat TÖRŐ [67] festgestellt, daß sich die Cornea, entwicklungsmechanisch betrachtet, aus zwei Bestandteilen verschiedener Herkunft zusammensetzt: aus einer ekto- und einer mesodermalen Schicht. Zur ersten rechnet das Epithel, zur zweiten die Bowmansche Membran, die Tunica propria und die Descemetsche Membran. Seine Versuche hat er an den Eiern bzw. Larven von *Rana fusca* und *Ambylostoma* vorgenommen. Verschieden große Sektoren der Cornea wurden operativ entfernt und im Verlauf der nachfolgenden Regeneration die Entwicklung der Gewebe beobachtet. TÖRŐ fand, daß bei der Regeneration der Tunica propria von der Corneoskleralgrenze eingewanderte Zellen eine hervorragende Rolle spielen. Sowohl bei der Regeneration als auch bei der Entwicklung der Cornea mißt er dem Intraokulardruck große Wichtigkeit bei.

Beachtenswerte Untersuchungen sind auch auf dem Gebiet der Cornealtransplantation durchgeführt worden. WINKELMANN [70, 71] transplantierte Sklera in die Cornea und stellte fest, daß die Sklera allmählich durchsichtig wurde. Zur Erklärung der Erscheinung führt er folgendes an: 1. Die Fasern der Sklera bilden sich unter Wirkung der Stromasubstanz der aufnehmenden Cornea zu typischen Cornealfibrillen um oder 2. die Sklerafasern werden abgebaut und durch Cornealfasern ersetzt. Aus den Untersuchungen von JASSWOIN [34] geht hervor, daß sich die Fasern der Tunica propria der Cornea im frühen Entwicklungsstadium argyrophil und später auf eine für Kollagen bezeichnende Weise braun imprägnieren.

Mit der Frage der Silberimprägnation haben sich viele Autoren befaßt. Im allgemeinen betrachtet man die Silberimprägnation als charakteristisch für die Retikulinfasern, und zwar auf Grund der Vorstellung, daß die retikulären Fasern eine Substanz enthalten, die gegenüber Silber über große Affinität verfügt.

Der Mechanismus der Imprägnation ist eine seit langem umstrittene und auch heute noch nicht gelöste Frage. STADTMÜLLER [63] und ROBINOW [57] meinen, das Wesentliche des Versilberungsprozesses bestehe darin, daß an der

Ausfällungsstelle eine lichtempfindliche Silber-Eiweißbindung zustande kommt. LIESEGANG [42] führt diese Erscheinung darauf zurück, daß in den Gewebsspalten die schutzkolloidartige Wirkung der Gelatine fehlt. LÖVENSTÄDT [44] betont die Rolle der mechanischen Adsorption. HERINGA und HOOFT [31] erörterten das Problem der elektrostatischen Kräfte und nehmen an, daß das positive Silberion an negativ geladenen Stellen ausgefällt wird. ZEIGER [73] weist auf die Rolle des Schwefels hin, der als »Reifungskörper« an photographischen Prozessen teilnimmt. Andere geben der Meinung Ausdruck, daß unter Lichtwirkung ebenso wie in der Photographie aus den Bromionen Elektrone freigesetzt werden, die das Ionengitter des Silberbromids verändern, und auf diese Struktur lagere sich das Silber ab. Die alkalische Silberlösung sei nicht lichtempfindlich, so daß man an andere energiefreisetzende Prozesse denken müsse. Derartige sog. reduzierende Substanzen finden sich beispielsweise in den Eiweiß- und Kohlenhydratkomponenten der kollagenen Fibrillen. DETTMER und SCHWARZ [18] konnten auch in den Zwischensubstanzen des Bindegewebes eine ähnliche reduzierende Gruppe nachweisen.

Die verschiedenen Substanzen führen nach unterschiedlichen Mechanismen zur Entstehung der Silberimprägnation, die unter Mitwirkung innerer und äußerer Gewebsstoffe zustande kommt. Zu den inneren Faktoren zählen die in den kollagenen Fibrillen vorkommenden Komponenten, zu den äußeren Faktoren rechnen die Bestandteile der Kittsubstanz. Wahrscheinlich wird das Silber von den Mukopolysacchariden der Grund- und Kittsubstanz reduziert, und so entsteht das Versilberungsbild der fibrösen Strukturen.

Bekanntlich hemmt Hyaluronidase die Imprägnierbarkeit der Fasern, was aber nicht bedeutet, daß die Grundsubstanz auch im ursprünglichen Zustand eine derartige reduzierende Eigenschaft besitzt. Zwischen den isolierten retikulären Fasern und den gereinigten kollagenen Fibrillen ergibt sich ein geringer Unterschied. Es ist daher anzunehmen, daß auch den Proteinen und Glykoproteinen eine wesentliche Rolle in der Gestaltung des Versilberungsbildes zufällt.

MASSARI [45] legte Sehnenfibrillen in Eiweißlösung und imprägnierte sie anschließend. Es kam starke Versilberung zustande, die Silberkörnchen waren unter dem die Fibrillen umgebenden Protein, an der Oberfläche der Fibrillen. Unter diesen Umständen kommen sie auch im Organismus vor. Von den verschiedenen Gewebseigenschaften wird der Schwellungsindex der Fibrillen verändert und dadurch das Versilberungsbild ebenfalls beeinflußt. Nach PETERS [51] enthalten einige Aminosäuren der kollagenen Polypeptidkette — Histidin, Arginin — aktive Gruppen, die imstande sind, Silberionen zu binden. In den Gebieten, wo Silberionen fixiert werden, kommen Kristallisierungszentren zustande, die zur Entstehung eines schwarzen Versilberungsbildes führen und auf die innere Verworrenheit der Proteinstrukturen deuten. Nach anderen Autoren enthält das Kollagen keine aktiven Gruppen,

dagegen gehe unter Wirkung der Behandlung mit den verschiedenen Reagenzien Proteindenaturation vor sich, die anläßlich der Imprägnation aktiviert wird.

BANGA [7] beobachtete, daß die nativen kollagenen Fasern viel mehr Silber zu binden vermögen, als bisher angenommen wurde. Dies läßt sich ihrer Ansicht nach darauf zurückführen, daß an der Bindung nicht nur Histidin teilnimmt, sondern auch die Mukopolysaccharide. Die Versilberung ist in erster Linie an die Eigenschaft des Prokollagens gebunden, weil dieses dreimal soviel Histidin enthält wie Metakollagen. Von Histidin wird aus der Silbernitratlösung das Metallsilber abgespaltet (braunes Imprägnationsbild), während die Mukopolysaccharide das Silbernitratmolekül binden und sich daher schwarz färben. BAUER [12] hat die Frage der Argyrophilie an menschlichem Material untersucht und festgestellt, daß an der Hornhaut nach Zerstörung der Kittsubstanz Argyrophilie auftritt. Dies beruht seiner Meinung nach darauf, daß die unter pathologischen Bedingungen eindringenden Gefäße mukolytischen Effekt auf die Kittsubstanz ausüben, die infolgedessen zugrunde geht, und dadurch werden die frei gewordenen Fasern imprägnierbar. Die Vaskularisation der Hornhaut findet erst statt, wenn sich die anaerobe Glykolyse in aerober Richtung verschiebt, d. h. Argyrophilie sei nur bei aerober Glykolyse zu beobachten. Weiterhin stellte BAUER fest, daß es sich bei der Argyrophilie und der Metachromasie um einander widersprechende histochemische Erscheinungen handelt [11]. SCHWARZ und MERKER [61] beschäftigten sich mit dem Versilberungsbild der nativen und fixierten kollagenen Fibrillen. Als Untersuchungsmaterial verwendeten sie Sehnengewebe. Nach ihren Feststellungen kommt nach Vorbehandlung mit Hyaluronidase, Zitratpuffer und Perjodsäure die innere Versilberung der D-Zone in den nativen Fasern nicht zustande. Auch nach Bisulfitbehandlung und Azetylierung zeigen native Fibrillen keine Versilberung. In formolfixierten Präparaten entsteht nach Vorbehandlung mit Kochsalz, Zitratpuffer, Hyaluronidase, Trypsin und Perjodsäure das innere Versilberungsbild der D- Zone, während dieses Bild nach Behandlung mit Bisulfit und Azetylierung nicht erscheint. Weiterhin stellen diese Autoren fest, daß die im Zitratpuffer löslichen Kollagenfraktionen die reduzierende Gruppen enthalten, die bei der Versilberung eine Rolle spielen.

Mit den chemischen Eigenschaften der interfibrillären Substanz der Cornea beschäftigte sich eingehend MEYER [46, 47], der folgende Fraktionen isolierte:

1. Chondroitinsulfat, das aus Hexosamin-Uronsäure-Sulfat besteht und mit testikulärer Hyaluronidase hydrolisiert werden kann.

2. Eine Hyaluronsäurefraktion, die sich nur mit testikulärer Hyaluronidase beeinflussen läßt und

3. Keratosulfat, das die Hälfte der gesamten Mukopolysaccharidmenge ausmacht.

Nach HERINGA, LEYENS und WEIDINGER [32] spielen die Mukoide der Cornea eine große Rolle in der Wasserbindung, wodurch die Durchsichtigkeit gewährleistet wird. MEYER und CHAFFEE [46] gelangten zu der Feststellung, daß die Durchsichtigkeit von der Quantität und Qualität der Polysaccharide abhänge. Laut CLEMENS [13] sind Durchsichtigkeit, Konsistenz, Wassergehalt und Stoffwechsel der Cornea von den Eigenschaften der Kittsubstanz abhängig.

Zum Nachweis der Zwischensubstanz kann man u. a. die sog. metachromatischen Färbungsverfahren benutzen. Nach dem ursprünglichen Standpunkt LISONS [43] ergibt sich die Metachromasie aus Kohlenhydraten, die ein Sulfat-Radikal enthalten. Die Metachromasie sei von den Eigenschaften der negativen Radikale abhängig. Obwohl sich die Metachromasie theoretisch auf keine chemische Struktur zurückführen läßt und eher auf der Dichtheit der Oberflächenfüllung beruht, färben sich dennoch unter den in tierischen Geweben vorkommenden Substanzen praktisch nur die saueren Kohlenhydrate metachromatisch. Dies hat aber die lokale Konzentration der sich metachromatisch färbenden Substanzen zur Voraussetzung.

Mit der Metachromasie der Hornhaut hat sich GÜNTHER [24] eingehend beschäftigt. WINKELMANN [70] verfolgte das Schicksal von Skleratransplantaten nach diesem Verfahren und fand, daß das Durchsichtigwerden der Transplantate durch die Vermehrung der metachromatischen Substanzen eingeleitet wird. COULOMBRE [15] beobachtete im Verlauf der normalen Entwicklung zuerst am 14. Tage Metachromasie, die ihre volle Intensität am 18.—19. Tage erreichte. AUREL und HOLMGREN [2] äußern die Meinung, das Erscheinen der Metachromasie und das Durchsichtigwerden der Cornea entfielen bei Menschen, Ratte, Kaninchen, Meer-Schweinchen und Maus auf dieselbe Zeitperiode. BAUER [10] fand, das Erscheinen der Metachromasie sei nicht von den pH-Verhältnissen abhängig.

Im Rahmen unserer Untersuchungen haben wir uns mit der Entwicklung der Hornhaut des Hühnerembryos sowie mit dem Problem der Fasern und der Kittsubstanz an embryonalem Material befaßt.

Methode

Der Bulbus des Hühnerembryos wurde im Initialstadium der Entwicklung in toto, später der vordere Bulbusabschnitt in Methylbenzoat-Paraffin eingebettet. Dann stellten wir Serienschnitte her und färbten die Präparate mit Hämatoxylin Eosin, nach MALLORY, VAN GIESON, ferner wandten wir die Silberimprägnation nach PERDRAU und Toluidinblau an.

Ergebnisse

Im 3tägigen Stadium. Die Substanz des aus einer Doppellamelle bestehenden Bulbus ist von embryonalem Mesenchym umgeben. Der Eingang des Augenbechers wird von einer Lamelle überbrückt, die aus unregelmäßigen

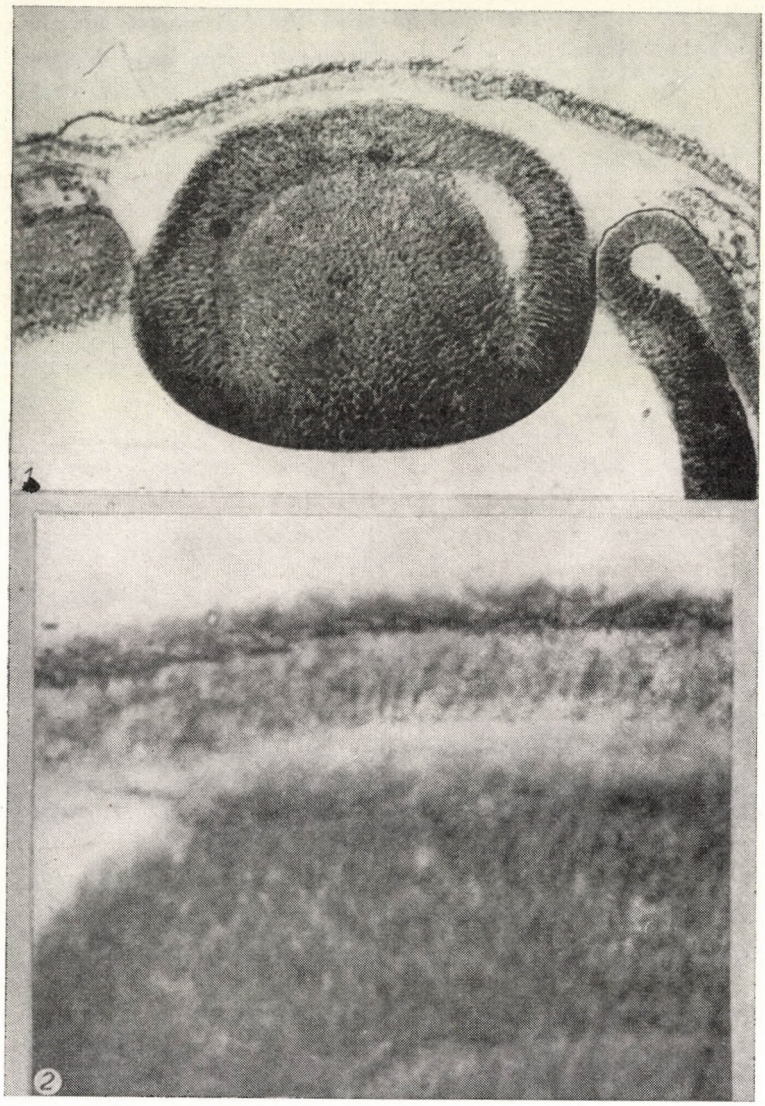


Abb. 1. Im 4tägigen Entwicklungsstadium. Silberimprägnation, 120×

Abb. 2. Im 4tägigen Entwicklungsstadium. Vorderer Glaskörper zwischen Epithel und Linse. Silberimprägnation, 240×

Epithelzellen des oberflächlichen Ektoderms besteht und sich ohne Unterbrechung im Oberflächenektoderm fortsetzt. Die abgeschnürte Linse befindet sich teils in der Eingangsöffnung des Augenbechers, teils bereits im letzteren. Zwischen der den Augenbecher überbrückenden Epithellamelle und dem vorderen Linsenpol ist eine strukturlose Gewebsmasse anwesend.

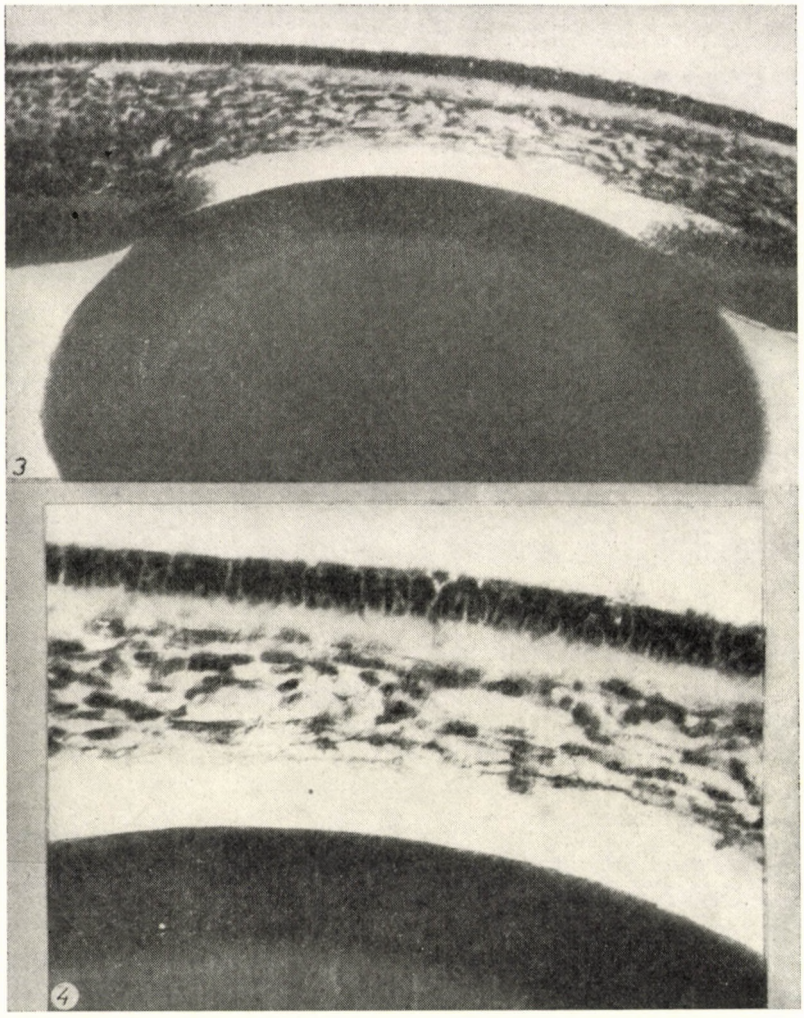


Abb. 3. Im 5tägigen Entwicklungsstadium. Silberimprägnation, 120×

Abb. 4. Im 5tägigen Entwicklungsstadium. Granulöse perizelluläre Gebilde in der Tunica propria-Substanz. Silberimprägnation, 120×

Im 4tägigen Stadium. Unter der mehrschichtigen Epithellamelle befindet sich eine stark imprägnierte Basalmembran. Im Gebiet zwischen Epithel und Linse ist eine blaßgefärbte Membran anzutreffen, die fibrilläre Struktur aufzuweisen scheint. Diese Gewebsmasse steht in enger Beziehung zu der in Entwicklung befindlichen Substanz der Sklera. Die Anwesenheit einer einschichtigen Mesothelplatte läßt sich vermuten (Abb. 1—2). Toluidinblau ergibt keine Metachromasie.

Im 5tagigen Entwicklungsstadium Zwischen dem Epithel und dem schwach entwickelten, eher nur vermutbaren Mesothel ist die aus 5—6 Zellschichten bestehende Tunica propria zu sehen, deren Zellen parallel zum Epithel liegen (Abb. 3). Zwischen dem basalen Epithelbereich und der höchsten Zellreihe der Zellsubstanz sind die Reste des im vorigen Stadium beschriebenen vorderen Glaskörpers noch vorzufinden. Mit Anilinblaufärbung sind an der Oberfläche der Zellen und zwischen den parallel liegenden Zellen fibrillenartige Gebilde zu erkennen, die sich im subepithelialen Gebiet intensiver färben. Nach Silberimprägnation sieht man an der Oberfläche der Zellen feine, granulöse, stellenweise sich über die ganze Zelloberfläche erstreckende fibrillenartige Gebilde. Die Zellen sind durch ihre Fortsätze miteinander verbunden. Diese Gebilde mit granulöser Struktur erscheinen besonders ausgeprägt in der Zone zwischen der obersten Zellreihe und dem Epithel (Abb. 4).

Im 7tägigen Stadium. Das Mesothel hat sich bereits entwickelt. Subepithelial erscheint eine stark gefärbte Basalmembran. Die Tunica propria ist zellreicher, massiver, infolgedessen treten die an der Oberfläche der Zellen liegenden elementaren Fibrillen weniger deutlich in Erscheinung. An der Corneoskleralgrenze ist bereits kräftige Fasernstruktur anzutreffen. Im Imprägnationsbild tritt die stark schwarz gefärbte Basalmembran hervor, die mit den beiden Epithelschichten eng zusammenhängt. In der interzellulären Substanz sind fein schwarz imprägnierte Faserngebilde zu beobachten (Abb. 5—6). An der Corneoskleralgrenze ist in der Zone der massiveren Zellsubstanz blasse metachromatische Färbung wahrnehmbar. Ebenso sieht man intensive Metachromasie in der Substanz der stark massiven, faserigen Sklera (Abb. 7).

Im 8tägigen Stadium. Die Tunica propria ist sehr zellreich, die Zellen liegen parallel zur unteren Epitheloberfläche und zeigen mit Anilinblau feine Blaufärbung am Rande ihres Plasmas. Die Basalmembranen sind gut abgegrenzt und erscheinen homogen. In der Sklera hat ein bedeutender Differenzierungsprozeß stattgefunden, deutliche Knorpelinseln sind erscheinen. Nach Silberimprägnation sieht man ein feines Fasernsystem mit granulöser Struktur. Die Corneoskleralgrenze besteht aus sehr dünnen, parallel gelegenen, schwarz imprägnierten Fasern, die sich in Richtung der Sklera in der perichondralen Substanz des in Entwicklung begriffenen Knorpelgewebes fortsetzen. Mit Toluidinblau ergibt sich im Bereich der Corneoskleralgrenze, vor allem im Umkreis der Knorpelzellen, starke Metachromasie. Rings um die Zellen der Tunica propria und um die Fasernsubstanz ist die Färbung stark metachromatisch, fein inselartig lokalisiert.

Im 9tägigen Stadium. Mit Anilinblaufärbung ist eine kräftige Fasernstruktur in der Tunica propria zu erkennen. Ein interessantes Bild bietet die Corneoskleralgrenze. Als Fortsetzung des Perichondriums sieht man ein sich lang hinstreckendes Fasernbündel, das am Randabschnitt der Cornea seine Massivität verliert, sich auflockert und ohne jeden Übergang mit der Tunica

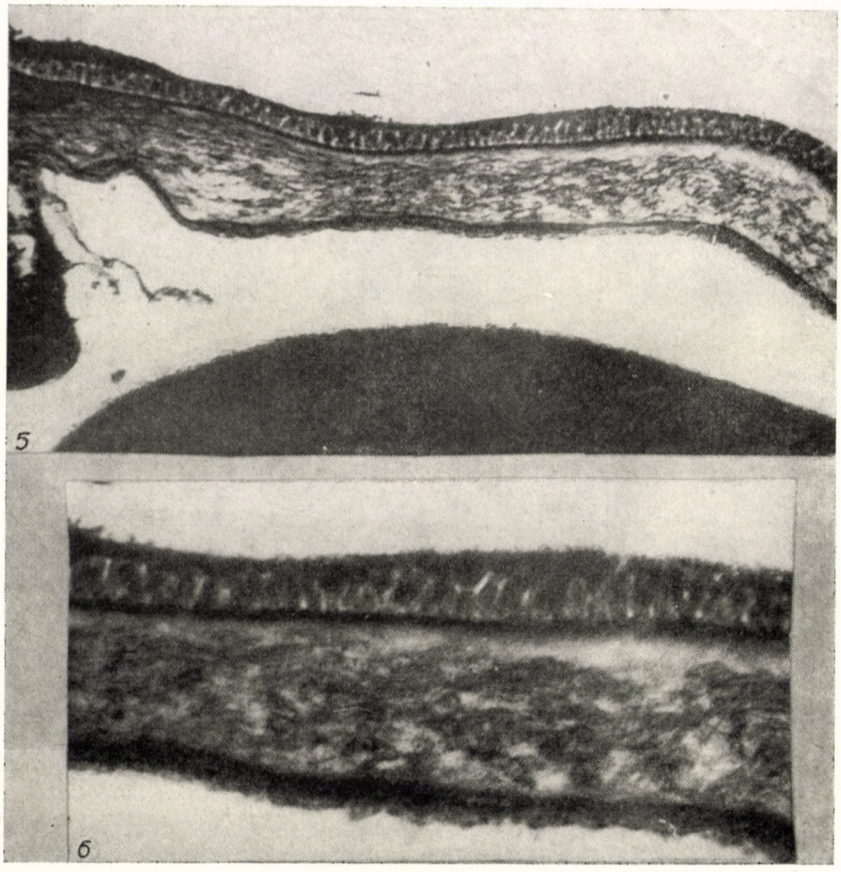


Abb. 5. Im 7tägigen Entwicklungsstadium. Silberimprägnation, 120×

Abb. 6. Im 7tägigen Entwicklungsstadium. Beginn der Entwicklung der fein imprägnierten Faserbildungen. Silberimprägnation, 240×

propria verschmilzt. Die Sklera besteht schon aus Knorpelgewebe. Im Imprägnationsbild sind verschiedenartig angeordnete, stark schwarzgefärbte feine Fibrillen zu sehen. An der Corneoskleralgrenze erscheint als Fortsetzung der die entstehende Knorpelanlage umgebenden faserigen Substanz ein Fasernsystem, das sich auflockert und in die Tunica propria erstreckt (Abb. 8). In den mit Toluidinblau gefärbten Schnitten zeigt die Tunica propria beginnende Metachromasie. Eine ähnliche, aber viel intensivere Färbung ist an der Corneoskleralgrenze wahrnehmbar.

Im 11tägigen Stadium. Die Strukturen haben sich weiter differenziert. Nach Silberimprägnation erscheint im Bereich der Tunica propria zum erstenmal inselartig das für die Kollagenimprägnation charakteristische braune

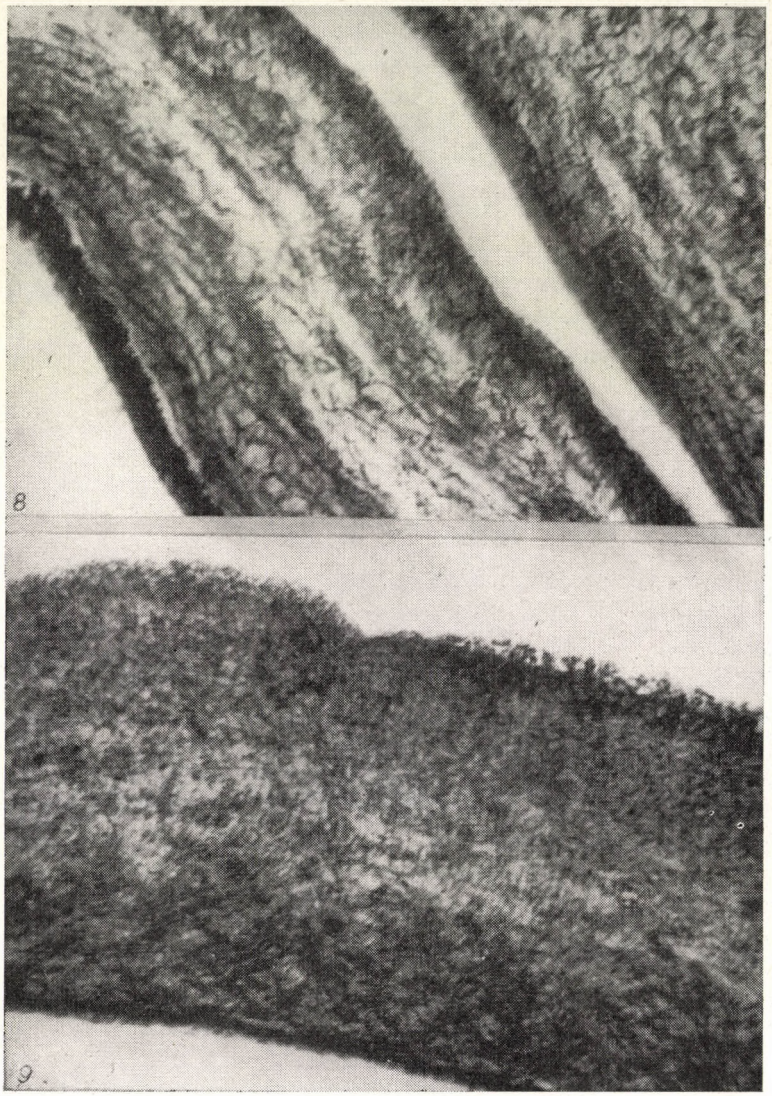


Abb. 8. Im 9tägigen Entwicklungsstadium. Kräftige Fasernbildung an der Corneoskleralgrenze. Silberimprägnation, 240×

Abb. 9. Im 11tägigen Entwicklungsstadium. Braune Imprägnation gebende Inseln im mittleren Stromabereich. Silberimprägnation, 240×

Versilberungsbild. Vorderes und hinteres Drittel der Cornea sind unverändert argyrophil (Abb. 9). In den mit Toluidinblau behandelten Präparaten sieht man die zunehmende Metachromasie der Cornea und die unveränderte Intensität zeigende Metachromasie der Corneoskleralgrenze.

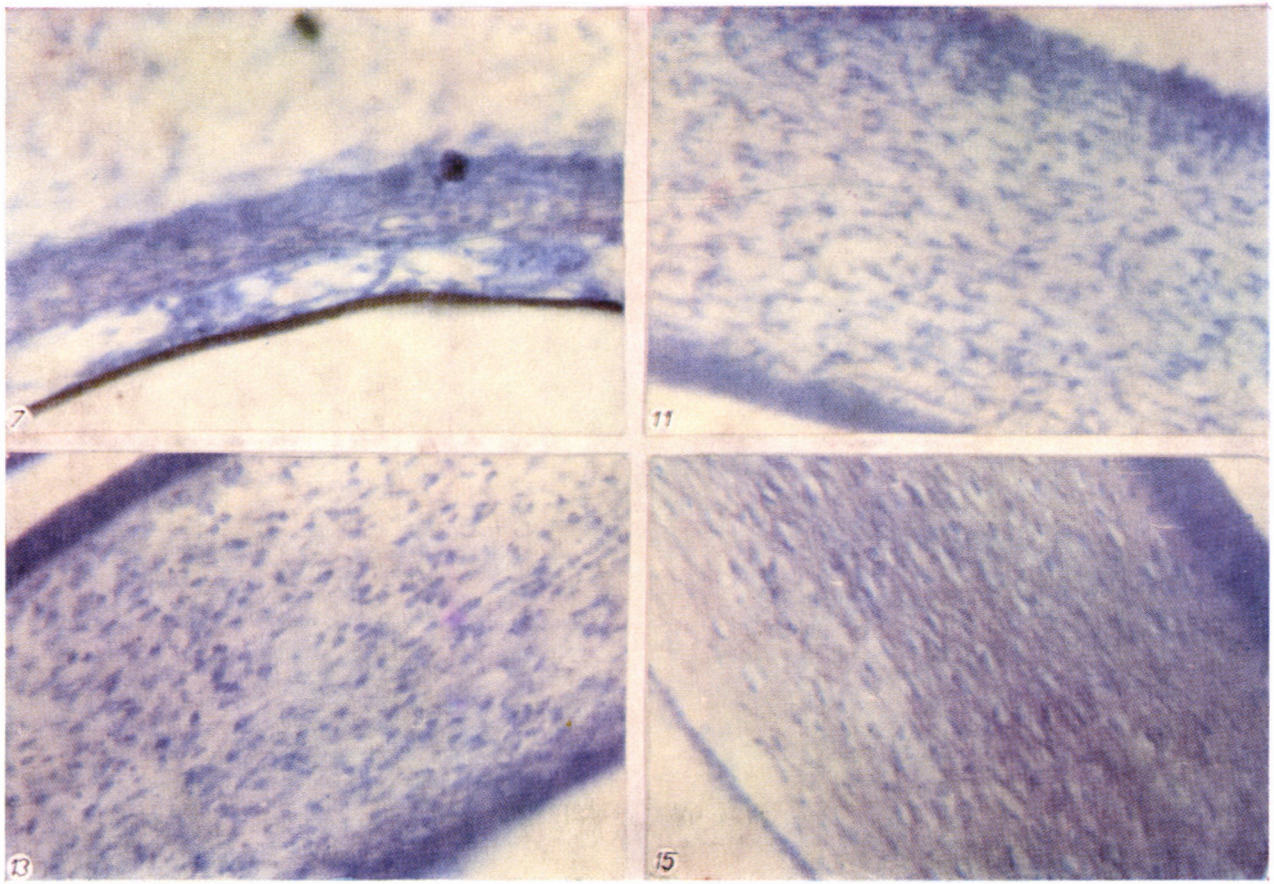


Abb. 7. Sklera im 7tägigen Entwicklungsstadium. Toluidinblau, 120×
Abb. 11. Beginnende Metachromasie der Cornea im 12tägigen Entwicklungsstadium. Toluidinblau, 240×
Abb. 13. Zunehmende Metachromasie der Cornea im 13tägigen Entwicklungsstadium. Toluidinblau, 240×
Abb. 15. Intensive Metachromasie der Cornea im 15tägigen Entwicklungsstadium, Toluidinblau, 240×

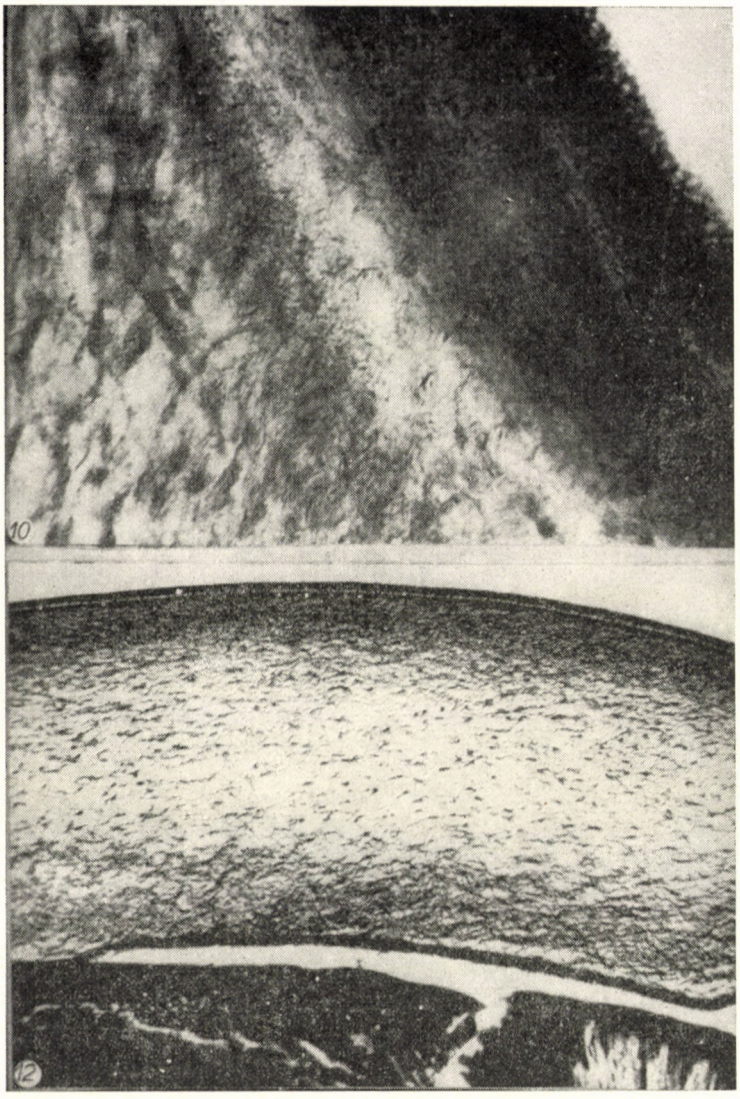


Abb. 10. Im 12tägigen Entwicklungsstadium. Corneoskleralgrenze. Silberimprägnation, 240×

Abb. 12. Im 13tägigen Entwicklungsstadium. Zunehmende Dominanz des für Kollagenen bezeichnenden Imprägnationsbildes. Silberimprägnation, 120×

Im 12tägigen Stadium. Mit Anilinblaufärbung ist die intensive Färbung des Cornealstromas zu sehen. Im silberimprägnierten Präparat erscheinen in der Substanz des im ganzen noch Argyrophilie aufweisenden Stromas mehr und mehr braune Flecke. An der Corneoskleralgrenze dominiert die reiche, intensive Argyrophilie zeigende Fasernstruktur, die als Fortsetzung des

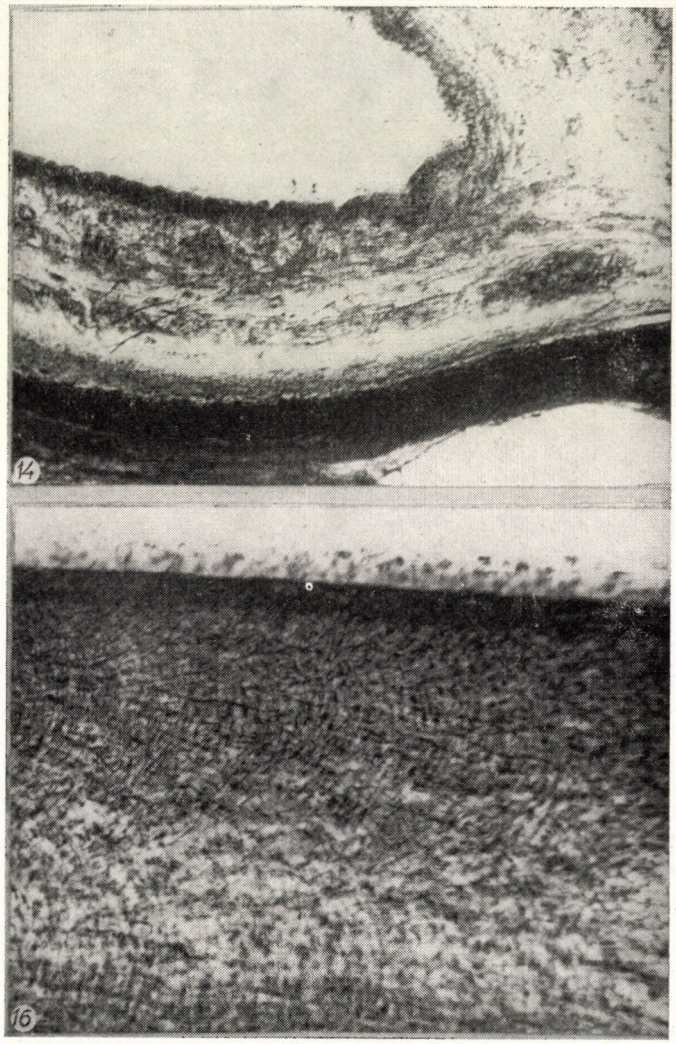


Abb. 14. Im 15tägigen Entwicklungsstadium. Corneoskleralgrenze. Silberimprägnation, 240×

Abb. 16. Im 16tägigen Entwicklungsstadium. Starke Fasernbündel im Stroma. Silberimprägnation, 240×

Knorpelgewebes aufgefaßt werden kann (Abb. 10). Zunehmende Metachromasie sieht man in der Tunica propria der Cornea (Abb. 11). Ein ähnliches Bild ergibt sich auch an der Corneoskleralgrenze. Die Basalmembranen sind nicht metachromatisch.

Im 13tägigen Stadium. Die Cornea ist endgültig differenziert. Mit Azanfärbung erscheint die Corneoskleralgrenze intensiv blau, ihre Struktur ist aufgelockert. Im silberimprägnierten Schnitt ist das für Kollagen bezeichnende

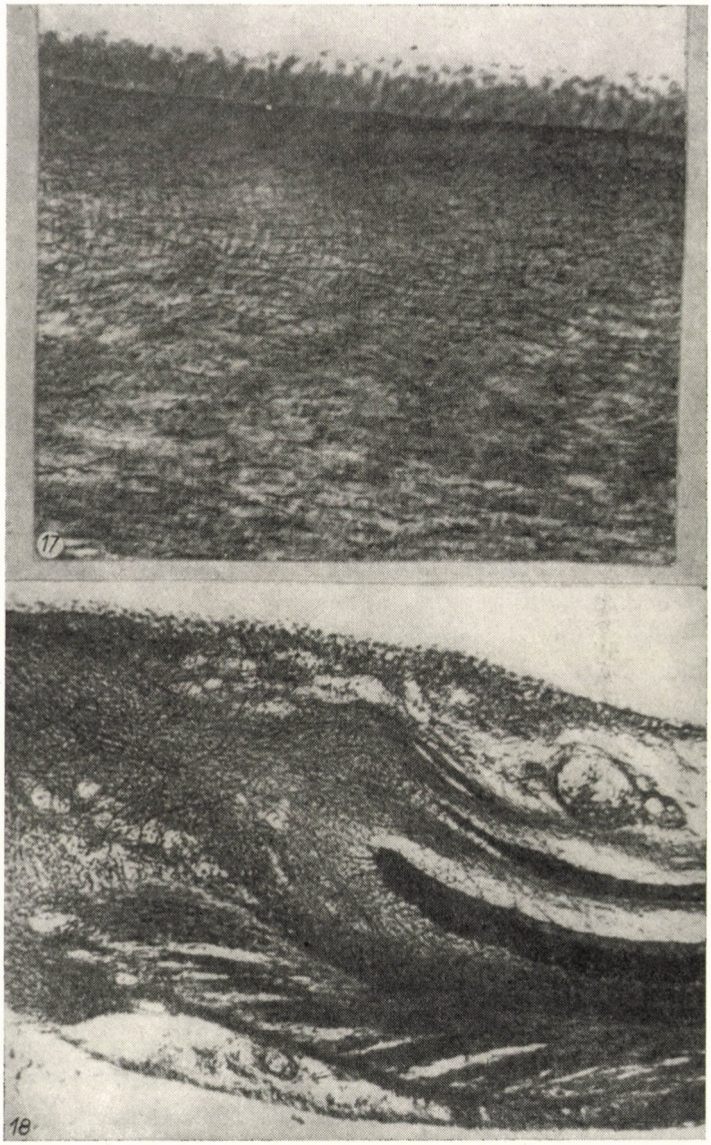


Abb. 17. Im 17tägigen Entwicklungsstadium. Für kollagene Fasern bezeichnendes Imprägnationsbild. Silberimprägnation, 240×

Abb. 18. Im 17tägigen Entwicklungsstadium. Corneoskleralgrenze. Silberimprägnation, 120×

braune Bild noch kräftiger. Subepithelial ist eine dünne, intensiv gefärbte Membran anzutreffen. Ein ähnliches Gebilde erscheint auch über dem Mesothel. Die Tunica propria besteht aus dicken Bündeln. Nach Versilberung sind beide Basalmembranen schwarz imprägniert. Im vorderen und hinteren Drittel der

Tunica propria herrscht noch Argyrophilie vor, aber an den anderen Stromaabschnitten sieht man bereits braune Silberimprägnation (Abb. 12). Die Corneoskleralgrenze ist unverändert argyrophil. In den mit Toluidinblau gefärbten Schnitten tritt im ganzen Bereich der Tunica propria zunehmend intensive Metachromasie in Erscheinung (Abb. 13).

Im 14tägigen Stadium. Man sieht die fertig differenzierte Gewebsstruktur der Cornea. Im silberimprägnierten Präparat dominiert immer stärker die für Kollagen bezeichnende braune Färbung. Die Metachromasie im Stroma ist unverändert.

Im 15tägigen Stadium. Das zuletzt beschriebene Bild ist unverändert, auch die Corneoskleralgrenze ist unverändert argyrophil (Abb. 14). Die Metachromasie der Tunica propria hat ihre endgültige Intensität beinahe erreicht (Abb. 15).

Im 16tägigen Stadium. Im silberimprägnierten Bild ist die Tunica propria intensiv braun (Abb. 16).

Im 17tägigen Stadium. Die endgültige Struktur der Cornea ist zustande gekommen. Nach Anilinblaufärbung sieht man subepithelial eine hellgefärbte, argyrophile Membran, die keine Metachromasie Aufweist. Die Tunica propria besteht aus dicken Bündeln, zeigt lamelläre Struktur und färbt sich kräftig mit Anilinblau. Nach Silberimprägnation ist die Tunica propria homogen braun (Abb. 17). Toluidinblau ergibt intensive Metachromasie.

Die hintere Membran ist argyrophil und zeigt keine Metachromasie. An der Corneoskleralgrenze verläuft als Fortsetzung der Sklera ein stark argyrophiles Fasernbündel zur Cornealsubstanz. An der Übergangasstelle lockert es sich auf, verliert die Argyrophilie und verschwindet in der Struktur des braunen Cornealstromas (Abb. 18). In den späteren Stadien kommen Veränderungen der Struktur und Färbungsreaktion nicht mehr zustande.

Besprechung

Wie die histogenetische Untersuchung ergeben hat, ist im Gebiet der Tunica propria der Cornea anfangs eine feine fibrilläre Substanz anzutreffen, deren Existenz von LENHOSSÉK bereits 1903 beschrieben wurde. Im Verlauf der Untersuchungen erschien dieser vordere Glaskörper zuerst im 3tägigen Entwicklungsstadium, dann verschwand er nach 1—2 Tagen, nachdem im 5—6tägigen Stadium eine kräftige Zellwanderung von der Corneoskleralgrenze in Gang gekommen war. Zugleich mit dem Erscheinen der Zellen setzt der Faserbildungsprozeß ein. Zuerst erscheinen feine, perizelluläre elementare Gebilde mit granulöser Struktur, die sich allmählich zu argyrophilen Faserngebilden umwandeln (8—9tägiges Stadium). WATZKA [69] hält diese Fasern für Präkollagen, COULOMBRE [15] bereits für Kollagen. Nach JASSWOIN [34] sind

die Fasern der Tunica propria der Cornea im frühen Entwicklungsstadium argyrophil und geben später das für Kollagen charakteristische braune Imprägnationsbild. Bei unseren Untersuchungen setzte diese Umgestaltung im 9tägigen Entwicklungsstadium ein und war am 14.—16.-Tage beendet. Die Corneoskleralgrenze zeigte bis zuletzt Argyrophilie. Vor dem Erscheinen der im Bereich der Cornea und Sklera entstehenden Fasern konnte die Aggregation von Zellen wahrgenommen werden.

Weiterhin ist zu beobachten, daß die Hornhaut im Verlauf der embryonalen Entwicklung vom 7. Tage an fleckige, inselartige Metachromasie zeigt, die immer mehr zunimmt und am 13.—16. Tage in stärkster Intensität in Erscheinung tritt. Dieser Zeitpunkt fällt laut HERINGA, LEYENS und WEIDINGER [32] mit einer verstärkten Wasseraufnahme der Cornea zusammen. In Übereinstimmung mit den Angaben von MEYER und CHAFFEE [46] erreicht die Vermehrung der Kittsubstanz zwischen dem 13.—16. Tage fast ihre volle Intensität. Nach anderen Literaturangaben wird die Cornea zu diesem Zeitpunkt durchsichtig.

Im Verlauf der Versuche war ferner zu beobachten, daß die Metachromasie der Corneoskleralgrenze viel früher eintritt als die der Hornhaut, nämlich in dem Entwicklungsstadium, wo die Sklera bedeutende Zellaggregation zeigt (6.—7. Tag). In der Hornhaut ist auch vor dem Erscheinen der Metachromasie beträchtliche Zellaggregation zu sehen. Die Veränderung der Silberfärbung fällt mit der Entwicklung der Metachromasie zusammen.

Nach Literaturangaben unterliegt es keinem Zweifel, daß die Fibrillen und die Kittsubstanz im Zustandekommen der Silberimprägnation gleicherweise eine Rolle spielen (BANGA 7; BAIRATI 4; PETERS 51). Laut BANGA [7] ist das sich im Verlauf der Kollagendifferenzierung vermehrende Histidin imstande, eine große Menge reines Silber zu binden, was die braune Imprägnation der Fasern zur Folge hat. Bei der Silberfärbung der Mucopolysacchariden werden in der Zwischengewebesubstanz Silbernitratmoleküle fixiert, was zur Entstehung des schwarzen Farbtons führt, PETERS [51] fand bei der Untersuchung nativer Faserpräparate, daß die Anwesenheit von Histidin und Arginin die schwarze Imprägnation der kollagenen Fibrillen zu Folge hat.

Die Untersuchungen ermöglichten noch die Beobachtung folgender Zusammenhänge:

In der Substanz der Tunica propria setzt die Fasernbildung nach Zelleneinwanderung ein, so daß die Zellen zweifellos eine formative oder fermentative Rolle spielen dürften. Diese elementaren Faserbildungen zeigen anfangs Argyrophilie und nehmen zugleich mit dem Reifungsprozeß den für Kollagen bezeichnenden braunen Imprägnationscharakter an. Die Kittsubstanz erscheint am 7. Entwicklungstage, verstärkt sich zunehmend und ist am 14.—16. Tage in voller Intensität zu sehen. Argyrophilie und Metachromasie stellen — am embryonalen Material — auch nebeneinander vorkommende histochemische Erscheinungen dar. Das für Kollagen bezeichnende Imprägnationsbild und

die metachromatische Kittsubstanz erscheinen bzw. entwickeln sich ungefähr in derselben Entwicklungsperiode.

Weiterhin war festzustellen, daß die Corneoskleralgrenze bis zuletzt argyrophil und zugleich auch metachromatisch bleibt.

*

Auf Grund vorstehender Tatsachen darf der Schluß gezogen werden, daß zwischen der nach vorheriger Zellinvasion sich nach und nach in Kollagenrichtung entwickelnden Faserdifferenzierung und dem Erscheinen der Kittsubstanz ein Zusammenhang besteht.

Worauf mag dieser Zusammenhang beruhen?

Es ist anzunehmen, daß sich im Verlauf der Differenzierung in Kollagenrichtung die Möglichkeit zur Bindung einer größeren Metallsilbermenge ergibt und das Versilberungsbild dementsprechend braun wird. Doch läßt sich auch nachweisen, daß die sich unterdessen vermehrende Kittsubstanz die Gestaltung des Bildes ebenfalls immer mehr beeinflußt, was zur Folge hat, daß das schwarze Imprägnationsbild — nachdem die Polysaccharide Silbernitratmoleküle binden — immer intensiver wird. Daß die Kittsubstanz in zunehmender Menge anwesend ist, wird durch die auch nach Verschwinden der Argyrophilie erhalten gebliebene intensive Metachromasie bewiesen.

Zur Erklärung der Beobachtungen ergeben sich theoretisch folgende Möglichkeiten:

1. Die aktiven Gruppen des Kollagens repräsentieren eine stärkere Reduktionswirkung als die über die gleiche Eigenschaft verfügenden Bestandteile der Kittsubstanz.

2. Die im Verlauf der Fibrillogenese in die Fibrillen eingebauten Mukoide stammen aus der Kittsubstanz; infolgedessen nimmt eine verhältnismäßig geringe Menge Zwischensubstanz an der Silberbindung teil, deren Farbreaktion gegenüber der Intensität der von den Fasern gebotenen Farbreaktion in den Hintergrund gedrängt wird.

3. Die Eigenschaften der Kittsubstanz verändern sich, was eventuell mit der im Zeitpunkt des Verschwindens der Argyrophilie eintretenden vermehrten Wasseraufnahme in Beziehung gebracht werden kann.

4. Es besteht auch die Möglichkeit, daß die Kittsubstanz infolge dieser Tatsachen nicht mehr fähig ist, Metallsilber zu binden.

5. Aus dem Umstand, daß das Verschwinden der Argyrophilie und die volle Entwicklung der Metachromasie zeitlich zusammenfallen, darf auf einen kausalen Zusammenhang zwischen den beiden Erscheinungen geschlossen werden.

Zur weiteren Klärung obiger Erscheinungen sind unsere anderweitige histochemische, sowie enzymatische Untersuchungen im Gang.

Zusammenfassung

Die histogenetische Untersuchung der Hornhaut des Hühnerembryos hat ergeben, daß zur Bildung der Stromafasern die formative oder fermentative Tätigkeit der von der Corneoskleralgrenze eingewanderten Zellen erforderlich ist. Die ersten Fasernbildungen zeigen Argyrophilie, verlieren diese im Verlauf des Faserreifungsprozesses und werden braun. Das Verschwinden der Argyrophilie fällt mit dem Erscheinen der Metachromasie zusammen. Vor dem Erscheinen der Metachromasie tritt beträchtliche Zellaggregation zutage. Die metachromatische Reaktion der Sklera kommt viel rascher zustande als die Hornhaut. Die Corneoskleralgrenze bleibt zuletzt argyrophil und zugleich auch metachromatisch. In weiteren Versuchen sollen die Veränderung des Imprägnationsbildes und ihr Zusammenhang mit der gleichzeitig eintretenden Metachromasie sowie die Eigenschaften der Fasern und der Kittsubstanz in dieser Periode untersucht werden.

LITERATUR

1. Alfajew, S. (1926): Über die embryonale Histogenese der kollagenen und reticulären Fasern des Bindegewebes bei Säugetiren. Z. Zellforsch. *3*, 149—168. — 2. Aurel, G.—Holmgren, H. (1953): On the Corneal Tissue and some Observations on its Transparency. Act. ophthal. Kbh. *31*, 1—28. — 3. Baer, K. E. (1828): Über die Entwicklungsgeschichte der Thiere. Beobachtung und Reflexion. Bornträger. Königsberg. — 4. Bairati, A. (1958): Submikroskopische Struktur des Kollagens. III. Silberfärbung der Bindegewebe. Sc. Med. Ital. *7*, 273—320. — 5. Baitsell, G. (1921): A Study of the Development of Connective Tissues in the Amphibia. Amer. J. Anat. *28*, 447—467. — 6. Bang, cit. Policard, A. (1952): Sur les stades inframicroscopiques du développement des fibers conjonctives. Bull. Microsc. appl. Sér. 2. *2*, 137—147. — 7. Banga, I. (1955): Dissertation. Budapest. — 8. Banga, I. (1959): The Role of Polysaccharides in Connective Tissue. Acta morph. hung. Suppl. VIII. 8—13. — 9. Bauer, F. (1959): Über die pathologische Histologie der gitterigen Hornhautdegeneration. v. Graefes Arch. Ophthal. *160*, 560—562. — 10. Bauer, F. (1959): Chemische Untersuchungen zur Klärung der Entstehung und des Verschwindens der Metachromasie in der Hornhaut. v. Graefes Arch. Ophthal. *161*, 81—92. — 11. Bauer, F. (1959): Die Argyrophilie und Metachromasie als antagonistische histochemische Erscheinungen der Sklera und Hornhaut und deren Zusammenhang mit dem Charakter des Stoffwechsels. v. Graefes Arch. Ophthal. *161*, 103—108. — 12. Bauer, F. (1959): Histochemische Untersuchung der getrübten Hornhaut mit alkalischer Silberimprägnation. v. Graefes Arch. Ophthal. *160*, 658—662. — 13. Clemens, H. J. (1951): Dissertation. Berlin. — 14. Coulombre, A. J.—Coulombre, J. L. (1958): Corneal Development. I. Corneal Transparency. J. cell. comp. Physiol. *51*, 1—11. — 15. Coulombre, A. J.—Coulombre, J. L. (1958): Development of Stromal Collagen Patterns. Amer. J. Ophthal. *45*, 291. — 16. Coulombre, A. J.—Coulombre, J. L. (1958): The Role of Intraocular Pressure in the Chick Eye. IV. Corneal Curvature. Arch. Ophthal. (Chicago) *59*, 503—506. — 17. Coulombre, A. J.—Coulombre, J. L. (1958): Corneal Development. II. Transparency Changes during Rapid Hydratation. Amer. J. Ophtahal. *46*, 276—281. — 18. Dettmer, N.—Schwarz, W. (1954): Die qualitative elektronenmikroskopische Darstellung von Stoffen mit der Gruppe CHOH—CHOH. Ein Beitrag zur Elektronenfärbung. Z. wiss. Mikr. *61*, 423—429. — 19. Enghusen, E. (1954): Über die Bildung der kollagenen Fibrillen in vitro. Acta anat. (Basel) *20*, 94—100. — 20. Enghusen, E. (1955): Über die Bildung der kollagenen Fibrillen. Acta anat. (Basel) *23*, 69—80. — 21. Enghusen, E. (1959): Über die Entwicklung des Reticulins in vitro. Acta anat. (Basel) *36*, 264—274. — 22. Flemming, W. (1897): Über die Entwicklung der kollagenen Bindegewebsfibrillen bei Amphibien und Säugetieren. Arch. Anat. Physiol. Anat. Abt. 171—190. — 23. Grossfeld, H.—Meyer, K.—Godman, C. (1955): Differentiation of Fibroblasts in the Tissue Culture as Determinated by Mucopolysaccharide Production. Anat. Rec. *121*, 471. — 24. Günther, G. (1953): Die Metachromasie bei verschiedenen Erkrankungen der Wirtshornhaut und ihre Bedeutung für den Erfolg der Keratoplastik. v. Graefes Arch. Ophthal. *154*, 184—196. — 25. Günther, G. (1953): Die Metachromasie der konservierten menschlichen Leichenhornhaut. v. Graefes Arch. Ophthal. *154*, 177—183. — 26. Hagedorn, A. (1930): Beitrag zur Entwicklungsgeschichte des Auges. Arch. Augheilk. *102*, 33—110. — 27. Hall, A. A.—Keech, M. R.—Reed, A.—Saxl, H.—Turnbridge, R. E.—Wood, M. X. (1955): Collagen and Elastin in Connective Tissue. J. Geront. *10. A.* 388—400. — 28. Hamburger, V.—Hamilton, H. L. (1951): A Series of Normal Stages in the Development of the Chick Embryo. J. Morph. *88*, 49—92. — 29. Hartmann, A. (1910): Zur Entwicklung des Bindegewebeknochens. Arch. mikr. Anat. *76*, 263—287. — 30. Henle, cit. Möllendorff: Lebendige Masse, I/1. VI. 509. —

31. HERINGA, G. C.—HOOFT, C. (1954): Über Zusammenhang der Argyrophilie der Bindegewebsfasern mit dem Stoffwechsel der Zellen. Z. mikr. anat. Forsch. *36*, 1—9. — 32. HERINGA, G. C.—LEYENS, W. F.—WEIDINGER, A. (1940): On the Water Adsorbtion of the Cornea. Acta neer. Morph. Extrc. *3*, N. 2. — 33. JAKUS, M. A. (1954): Studies on the Cornea. I. The Fine Structure of the Rat Cornea. Amer. J. Ophthal. *38*, N. 1. Part. II. 40—53. — 34. JASSWOIN, G. W. (1939): Sur le Développement de la cornée chez le poulet. Arch. Anat. (Strasbourg) *21*, 112—115. — 35. KLING, D. H.—CAMERON, G. (1955): Morphological and Physiological Study of Tissue Cultures of Human and Mammalian Synovial Membranes. Anat. Rec. *121*, 472. — 36. KOELLIKER, O. (1861): Entwicklungsgeschichte des Menschens und höheren Tiere. Leipzig. — 37. KROMPECHER, ST. (1928): Die Entwicklung der elastischen Elemente der Arterienwand. Z. Anat. Entwgesch. *85*, 704—723. — 38. LADIJENSKI, V. D. (1911): Sur l'évolution de la structure fibrillaire de la cornée chez l'embryon de poule. C. R. Soc. Biol. (Paris) *78*, 307—308. — 39. LAGUESSE, F. : cit. Möllendorff, Lebendige Masse, I/1. VI. — 40. LELKES, G.—KARMAZSIN, L. (1955): Development of Elastic Elements in Tissue Cultures. Acta morph. hung. *5*, 149—157. — 41. LENHOSSÉK, M. (1911): Die Entwicklung und Bedeutung der Zonulafasern nach Untersuchungen am Hühnchen. Arch. mikr. Anat. *77*, 200—310. — 42. LIESEGANG, R. E. (1928): Histologische Versilberungen. Z. wiss. Mikr. *45*, 273—281. — 43. LISON: cit. A kísérleti orvostudomány vizsgáló módszerei. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1959. 265. — 44. LÖWENSTÄDT, H. (1924): Untersuchungen über die Vorgänge bei der Bindegewebsversilberung nach Bielschowsky-Maresch und über die Konstitution der »Gitterfasern«. Z. exp. Med. *39*, 355—377.— 45. MASSARI, cit. BAIRATI (1958): Submikroskopische Struktur des Kollagens. III. Silberfärbung der Bindegewebe. Sc. Med. Ital. *7*, 273—320. — 46. MEYER, K.—CHAFFEE, E. (1940): The Mucopolysaccharide of the Cornea and its Enzymatic Hydrolysis. Amer. J. Ophthal. *23*, 1320. — 47. MEYER, K.—LINKER, A.—DAVIDSON, A. E.—WEISMANN, B. (1953): The Mucopolysaccharides of Bovine Cornea. J. Biol. Chem. *205*, 611. — 48. MEYER, K.—RAHILLY, D. R. (1959): The Development of the Cornea in the Chick. J. Embryol. exp. Morph. *7*, 303—315. — 49. NAGEOTTE, J. (1922): L'organisation de la matière dans les rapports avec la vie. Alcan. Paris. — 50. NORDMAN, J. (1938): A propos de l'histogénèse de la cristalloïde. Arch. Anat. (Strasbourg) *25*, 173—182. — 51. PETERS zit. BAIRATI (1958): Sc. Med. Ital. *7*, 273—320. — 52. PORTER, K. R.—VANAMEE, P. (1949): Observation of Connective Tissue Fibers. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) *71*, 513—516. — 53. RAGAN, CH. (1953): The Physiology of the Connective Tissue. Ann. Rev. Physiol. *14*, 51—72. — 54. RANVIER, L. zit. POLICARD (1954): Press Méd. *16*, 343. — 55. RENAUNT, J. (1897): Traité d'Histologie pratique. C. R. Ass. anat. 5, réun. Liège. 1903.— 56. PEBYTCKAJA, P. (1952) Доклад Акад. Мед. Наук. C. C. C. P. *2*, 313. — 57. ROBINOW, C. (1937): On the Structure of Epithelial Membranes in Tissue Cultures. Protoplasma. *27*, 86—97. — 58. ROHAILLY, R. O.—MEYER, D. B. (1959): The Early Development of the Eye in the Chick. Acta anat. (Basel) *36*, 20—58. — 59. SCHAEFER, A. (1901): Grundsubstanz—Interzellularsubstanz und Kittsubstanz. Anat. Anz. *19*, 95—104. — 60. SCHWARZ, W. (1953): Elektronenmikroskopische Untersuchungen über den Aufbau der Sklera und der Cornea des Menschen. Z. Zellforsch. *38*, 26—48. — 61. SCHWARZ, W.—MERKER, H. J. (1959): Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Innerversilberung der Sehnenfibrillen. Histochemie. *1*, 225—240. — 62. SEEFELDER, R. (1930): Über normale und abnorme Entwicklung der Hornhaut. Z. Anat. Entwgesch. *92*, 779—795. — 63. STADTMÜLLER, F. (1921): Histochemische Darstellung zur Deutung des Wesens der Silbermethode an nichtfixierten Objekten. Anat. Hefte. *59*, 79—210. — 64. STUDNICKA, F. K. (1907): Über die Grundsubstanzgewebe. Anat. Anz. *30*, 209—228. — 65. SZILY, A. (1908): Über Entstehen eines fibrillären Stützgewebes im Embryo und dessen Verhältnis zur Glaskörperfrage. Anat. Hefte. *35*, 649—757. — 66. TELLO, F. (1922): Das argentophile Netz der Bindegewebszellen. Z. Anat. *65*, 204—225. — 67. TÖRŐ, E. (1932): Zur Frage der Entwicklung und Regeneration der Hornhaut. Z. Anat. Entwgesch. *98*. — 68. WASSERMANN, F. (1954): Fibrillogenesis on the Regenerating Rat Tendon with Special Reference to Growth and Composition of the Collagenous Fibre. Amer. J. Anat. *3*, 399—439. — 69. WATZKA, M. (1935): Über die Entwicklung der Cornea und der Linsenkapsel des Hühnchens. Z. Anat. Entwgesch. *104*, 424—439. — 70. WINKELMANN, J. E. (1950): Experimental Transplantation of Sclera. Ophthalmology. *119*, 336—343. — 71. WINKELMANN, J. E. (1951): Transplantation of Sclera into Cornea. Ophthalmology. *54*, 3—10. — 72. WISLOCKI, G. B. (1952): The Anterior Segment of the Eye of the Rhesus Monkey Investigated by Histochemical Means. Amer. J. Anat. *91*, 323—362. — 73. ZEIGER, K. (1938): Physico-chemische Grundlagen der histologischen Methodik. Steinkopff, Dresden.

ПРОБЛЕМЫ РАЗВИТИЯ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ВОЛОКОН I.

Л. КАРМАЖИН

В ходе гистогенетического исследования роговицы зародыша цыплят было установлено, что для образования волокон стромы необходимо образовательная или ферментативная деятельность клеток, иммигрированных с границы роговицы и склеры. Зачаточные образования волокон показывают аргирофилию, а затем в ходе процесса созревания волокон они утрачивают свою аргирофилию и пропитываются бурым цветом. Между исчезновением аргирофилии и метахроматическим окрашиванием наблюдается хронологическое совпадение. До метахроматического окрашивания наблюдалось значительное накопление клеток. Метахроматическая реакция склеры наступает значительно раньше чем реакция роговицы. Граница роговицы и склеры до конца сохраняет аргирофилию и она одновременно является также метахроматической.

PROBLEMS OF EMBRYONIC FIBRE DEVELOPMENT. I

L. KARMAZSIN

Histogenetic studies of the chick-embryo cornea have revealed that the formation of stromal fibres requires the formative or fermentative activity of cells originating from the corneo-scleral boundary. Primitive fibres are argyrophile but lose this capacity in the course of maturation and take a brown colour on impregnation with silver. The disappearance of argyrophilia and the appearance of metachromasia are synchronous processes, preceded by a considerable accumulation of cells. The metachromasic reaction of the sclera significantly precedes that of the cornea. The corneo-scleral boundary remains throughout both argyrophile and metachromasic.

Dr. László Karmazsin, Debrecen, 12. Anatómiai Intézet, Ungarn

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

ZELLE UND GEWEBSEINHEIT

St. Krompecher

(Eingegangen am 1. Juli, 1960)

Die sich mit der lebenden Materie befassende Wissenschaft macht seit Jahrzehnten ernsthafte und keineswegs erfolglose Anstrengungen zur Erforschung von Lebenseinheiten, welche kleiner sind als die Zelle. Der Begriff der Zelle hat sich als zu eng erwiesen. Bei diesen Bemühungen hat man indessen kaum beachtet, daß es eine Kategorie der lebenden Materie gibt, die größer ist als die Zelle, in ihrer Struktur, Funktion und Bedeutung von dieser abweicht und daher nicht unter den Begriff der Zelle fällt.

Im folgenden soll unter Berücksichtigung der histologischen Forschungsergebnisse des letzten Jahrhunderts — und unter Respektierung des Begriffes der Zelle — versucht werden, eine Gewebseinheit — größer als die Zelle — zu umschreiben.

Unser Organismus ist nicht nur aus Zellen und interzellulärer Substanz aufgebaut. Die Einheit zahlreicher Gewebe, wie beispielsweise die der quergestreiften Muskel, des Knorpels oder des Nervengewebes, ist nicht die Zelle, sondern ein aus Zellen entstandenes Organellum, das — wenn wir den philosophischen Aspekt der histologischen Wissenschaft auch nur etwas weiterentwickeln wollen — von der Zelle entschieden differenziert werden muß. Die quergestreifte Muskelfaser ist z. B. keine Zelle, sondern ein kompliziertes zytogenes Organellum, dessen Länge den Durchmesser der größten bekannten menschlichen Zelle um das Mehrhundertfache übertrifft und selbst die dezimetrische Größe erreicht; dasselbe läßt sich von ihrer Masse, ihren vielen tausend Kernen usw. sagen. Ebenso müssen wir aber von der Zelle auch die Nerveneinheit, das Neuron, unterscheiden, in dem die Neurozyte lediglich einen — wenn auch den wichtigsten — Bestandteil darstellt, das jedoch außerdem noch das mitunter selbst die Länge von 1 m erreichende Neurit sowie das Telodendron als wichtige Teile enthält. Sofern wir aber das Neuron als genetische, anatomische, trophische, physiologische und pathologische Einheit betrachten — was wir zweifellos tun müssen —, so erscheint es als eine Unmöglichkeit, nur einen Teil desselben zu berücksichtigen und in den Rahmen der Zelle hineinzupressen.

Als drittes Beispiel sei die Knorpeleinheit, das Chondron, erwähnt, von dem die Knorpelzelle nur einen Teil darstellt. Die Masse der Knorpelzellen

vermag indessen noch keineswegs den Charakter des Knorpels zu sichern. Hierzu gehört noch die von den Knorpelzellen erzeugte und aufrechterhaltene Knorpelgrundsubstanz, die zusammen mit der Zelle die Knorpeleinheit ergibt. Eine Knorpelgrundsubstanz ohne Zellen degeneriert und wird abgebaut; andererseits sind die Zellen allein außerstande, die Rolle des Knorpels zu versehen: das Knorpelgewebe wird von den Zellen und von der Grundsubstanz gemeinsam gebildet.

An Hand der angeführten Beispiele (quergestreifte Muskelfaser, Neuron und Chondron) wollen wir es nunmehr von mehreren Seiten aus versuchen, worin sich dieses abzusondernde und als besonderer Begriff zu umschreibende Organellum zelliger Herkunft, d. h. die Gewebseinheit, von der Zelle unterscheidet. Den Unterschied zwischen Zelle und Gewebseinheit müssen wir nach folgenden Gesichtpunkten untersuchen:

1. In histologischer Beziehung.
2. In histogenetischer Beziehung, unter besonderer Berücksichtigung der Zell- bzw. Kernteilungsform und der Rolle des Zytozentrums.
3. Nach der Stabilität oder Labilität der Gewebe.
4. In bezug auf den differenzierten oder undifferenzierten Zustand.
5. Vom Gesichtspunkt der Regeneration.
6. Vom Standpunkt der Genetik.

Darüber hinaus können wir versuchen, die Zelle von der Gewebseinheit

7. in pathophysiologischer Hinsicht zu differenzieren.

Nach Durchführung dieser Vergleiche wird sich die Feststellung ergeben, wie weit es berechtigt ist, die Gewebseinheit von der Zelle zu trennen.

1. *Histologische Unterschiede zwischen Zelle und Gewebseinheit*

Vergleichen wir an konkreten Beispielen die am Aufbau des Organismus teilnehmenden Zellen mit den Gewebseinheiten.

Ob wir die Monozyte oder die zylindrige Flimmerepithelzelle oder eine Zelle des mehrschichtigen Plattenepithels betrachten: jede weist die charakteristischen Eigenschaften der Zellen auf. Sie hat einen Kern, Protoplasma, Zytozentrum usw., und wie sehr sich auch diese Zellen voneinander unterscheiden, handelt es sich in bezug auf Form, Größe und Funktion bei der Spermiozyte ebenso um eine umschriebene Zelle wie bei der Plasmazelle oder Pigmentzelle der Retina, und alle besizten die für Zellen bezeichnenden Merkmale.

Ein anderer Teil unserer Gewebe ist nicht aus Zellen, sondern aus zytogenen, aber hochdifferenzierten Gewebselementen, Gewebseinheiten aufgebaut. Von der quergestreiften Muskelfaser war hereits eingangs die Rede. Ihre Form, Größe, ihr Volumen, ihre Einrichtung, Lebenserscheinungen, Ent-

wicklung usw. weichen wesentlich von denen der Zelle ab. Sie unterscheiden sich von der Zelle in bezug auf das Sarkolemma, die Myofibrillen, die an der Peripherie liegenden vielen tausend Kerne, das Fehlen des Zellzentrums, die hineingewachsenen Nervenendigungen usw. Aber die Muskelfaser läßt sich von der Zelle auch bezüglich des Stoffwechels, der Funktion und in energetischer Beziehung unterscheiden. Im Vergleich zur Zelle stehen wir einem wahrhaften Großbetrieb gegenüber. Die Zelle muß ebenso von der quergestreiften Muskelfaser getrennt werden, wie wir den allein arbeitenden Handwerker nicht in eine Kategorie mit einem Fabrikbetrieb reihen können. — Ähnlich verhält es sich mit dem Neuron, wobei als Beispiel eine pseudounipolare Zelle des Intervertebralganglions mit ihrer komplizierten Einrichtung angeführt sei, von den sensorichen Nervenendigungen über die zu den Neurozyten gehörigen Amphizyten bis zur Markscheide und zu den Telodendrien, mit ihren Neurofibrillen, dem Tigroid und der verwickelten Ernährungs- und Reizleitungsvorrichtung dieses kleinen Organs. Die Ernährungs-, Regenerations- und unter pathologischen Bedingungen zutage tretenden Eigenheiten des Neurons, vor allem aber seine hochdifferenzierte Funktion und nicht zuletzt seine vom Ende der großen Zehe bis zur Oblongata reichende Länge dokumentieren, daß das Neuron mit der Lymphozyte oder Mikrogliazelle nicht in eine Kategorie gerechnet werden kann. — Ebenso könnte man die Zytotrophoblastzellen dem sie umschließenden Synzytiotrophoblast gegenüberstellen, bei dem es sich um eine lamellär ausgebreitete Resorptionsschicht handelt. — Ein weiteres Beispiel wäre die Knorpeleinheit, das Chondron, in dessen Zentrum die Knorpelzellgruppe sitzt, deren Form, Funktion, Lebenseinrichtung usw. jedoch in jeder Beziehung von der zugehörigen Knorpelgrundsubstanz abhängen und das, wenn es von dieser getrennt wird, nicht mehr eine Einheit des Knorpelgewebes darstellt, weil auch beliebig viele Knorpelzellen gemeinsam die Rolle des Knorpels nicht zu übernehmen vermögen. Die Knorpeleinheit ist das Chondron, dessen Bestandteile die Knorpelzelle, die Knorpelzellkapsel, der Hof und die Grundsubstanz bilden. Als hochdifferenzierte Gebilde können sie ihre Aufgabe nur gemeinsam erfüllen, weshalb das Chondron — als eine derartige lebende Einheit — als lebende Gewebseinheit des Knorpels angesehen werden muß. Dasselbe ließe sich von der Knocheneinheit, dem Zytoosteon, als der biologischen und morphologischen Einheit des Knochengewebes sagen. Die Knochenzelle allein würde kein festes Gerüst bieten, könnte nicht als passives Organ der Bewegung dienen, wäre nicht imstande, in der Lage, einen Platz oder die erforderlichen Substanzen für das blutbildende rote Knochenmark zu gewährleisten und könnte allein nicht als Depot für Kalzium, Magnesium, Phosphor, Fluor und zahlreiche andere Elemente bzw. Spurenelemente dienen. Lediglich gemeinsam mit der ihrerseits erzeugten und zugehörigen Knochengrundsubstanz bildet die Osteozyte die für das Knochengewebe charakteristische Einheit, das Zytoosteon.

Am Beispiel der quergestreiften Muskelfaser, des Neurons, Chondrons und Zytoosteons haben wir auf die zwischen den Zellen und Gewebseinheiten bestehenden histologischen Unterschiede hingewiesen.

2. *Histogenetische Unterschiede*

Von den Zellen darf festgestellt werden, daß sie sich als einfache Abkömmlinge der Keimblätter durch mitotische Zellteilung vermehren und jede einzelne Zelle über einen vollwertigen Kern verfügt. Demgegenüber wächst die Gewebseinheit, z. B. die quergestreifte Muskelfaser, durch direkte Kernteilung, und auf diese Kernteilungen (Amitosen) folgt keine Zellteilung. Bei der Entwicklung dieser Gewebseinheit handelt es sich somit nicht um mitotische Vermehrung von Zellindividuen, sondern um die komplizierte, durch amitotische Kernteilung vor sich gehende Gestaltung und das Wachstum eines einheitlichen Organellums. Das im Leben der Zelle eine wesentliche Rolle spielende Zytozentrum hat demnach in den Gewebseinheiten seine Funktion verloren, weil hier nur noch ein Wachstum durch direkte Kernteilungen stattfindet. Wenn wir die Zelle und die Gewebseinheit aus dem Gesichtswinkel der Histogenese betrachten, so sehen wir, daß ein wesentlicher Unterschied zwischen den vermehrungsfähigen Zellen und den komplizierten Endprodukten, den Gewebseinheiten, besteht.

3. *Stabile und labile Gewebe*

Die einer ständigen Abnutzung ausgesetzten und sich physiologisch dauernd erneuernden Gewebe sind aus Zellen aufgebaut. Die verbrauchten Zellen werden durch mitotische Teilungen ersetzt. Das Gewebe verändert sich immerfort. Die durch Teilung entstandenen neuen Zellen lösen sich nach Wochen oder Monaten ab (wie die Zellen des mehrschichtigen Plattenepithels) oder werden wie die Erytrozyten abgebaut, aber unter physiologischen Verhältnissen aus der unteren Zellschicht oder aus dem Knochemark ständig ersetzt. Dieses auch unter physiologischen Verhältnissen in kontinuierlicher Erneuerung befindliche Gewebe nennen wir, nach Bizzozero, labiles Gewebe. Die Zellen der labilen Gewebe ersetzen sich durch mitotische Teilungen, die zugrunde gehenden Generationen durch eine dauernde Vermehrung der Zellindividuen. Aktivitätshypertrophie oder Inaktivitätsatrophie vermögen diesen Prozeß zu verlangsamen oder zu beschleunigen, aber das ändert nichts an der Gesetzmäßigkeit, daß die fortlaufend zugrunde gehenden Zellgenerationen von neuen Zellen ersetzt werden. Die Zellen, die wir bei der aktuellen Untersuchung sehen, sind somit nicht mehr dieselben, die vor Wochen dort waren, und nach Ver-

lauf weiterer Wochen sind die damals jungen Zellen wieder reif geworden, und den Platz der jungen Generation haben die seither entstandenen neuen Zellen eingenommen. Dennoch wird das Bild strukturell dasselbe sein. — Ganz anders verhält es sich mit den stabilen Geweben. Die quergestreifte Muskelfaser, die sich im Bizeps oder Augenmuskel eines Individuums entwickelt hat, bleibt nach dem heutigen Stand unseres Wissens Jahrzehnte, ja wahrscheinlich sogar bis ans Ende des Lebens erhalten. Ebenso stellen die Pyramidenzelle, die multipolare motorische Zelle im vorderen Horn des Rückenmarks oder die pseudounipolare Nervenzelle des Gollschen Stranges konstante Bausteine des Organismus dar, die nach dem heutigen Stand unseres Wissens ein Leben lang in seinem Dienste stehen. Auch das Chondron bildet einen stabilen Baustein des Organismus. Naturgemäß besitzen auch diese Gewebselemente einen Stoffwechsel und erneuern sich in gewisser Weise. Diese Regeneration geht indessen unter Aufrechterhaltung der Einheit des Zellorganellums vor sich.

Von der Stabilität des Knorpels als eines stabilen Gewebselements vermag man sich auch bei der Transplantation zu überzeugen, indem der homotransplantierte Gelenkknorpel im neuen Organismus auch noch nach Ablauf von 2 Jahren sowohl makro- wie mikroskopisch normale Gewebsstruktur zeigt.

Es gibt Gewebseinheiten, wie den Knochen, von dem wir wissen, daß er sich im ständigen Umbau befindet; aber dieser Umbau ist nur ein langsam vor sich gehender Prozeß, der von den Veränderungen in der Lebensweise des Individuums, von der mechanischen Inanspruchnahme, vom hormonalen Gleichgewicht abhängt, und die Lebensdauer eines Zytoosteons darf unter normalen Verhältnissen eher auf Jahrzehnte als Jahre Geschätzt werden.

Wenn wir unsere Gewebe überblicken, so können wir die labilen und stabilen Gewebselemente, welch letztere im allgemeinen nicht aus Zellen, sondern aus Gewebseinheiten aufgebaut sind, einander entschieden gegenüberstellen.

4. *Undifferenzierte (oder nur wenig differenzierte) und hochdifferenzierte gewebliche Bauelemente*

Die stabilen Gewebseinheiten sind im allgemeinen hochdifferenziert. Man denke nur an die quergestreifte Muskelfaser oder an das Neuron. Demgegenüber weisen die Gewebe des mehrschichtigen Plattenepithels niedrige Differenzierung auf. Es ist ja durchaus verständlich, daß sich ein labiles Gebilde von vorübergehendem Charakter weniger differenziert entwickelt als ein konstant-stabiles. Neben der Gegenüberstellung dieser Extreme müssen wir naturgemäß wahrnehmen, daß vom Gesichtspunkt der Differenzierung fast ein kontinuierlicher Übergang von den niedriger differenzierten Geweben (Epithelgewebe, Blutformelemente) über den hochdifferenzierten Knorpel und

das Knochengewerbe zum sehr hoch differenzierten Muskel- und Nervengewebe besteht, welch letztere die schönsten Beispiele hochentwickelter Gewebseinheiten darstellen.

5. *Unterschiede in der Regeneration*

Die aus niedriger differenzierten Zellen aufgebauten labilen Gewebe befinden sich in ständiger Vermehrung. Eine Verletzung bewirkt lediglich die Beschleunigung dieser unaufhörlichen Vermehrung. Daraus geht hervor, daß die labilen Gewebe auch schon unter physiologischen Bedingungen aus Zellen aufgebaut sind die sich fortlaufend mitotisch teilen, vermehren und gut regenerieren: für diese sich mitotisch ohnehin ständig vermehrenden Gewebe bedeutet die Regeneration nur eine quantitative Veränderung, da ja die Vorbedingung, aber auch der Bedarf für die Vermehrung der Zellen dauernd gegeben ist. Diesen gut regenerierenden Zellen lassen sich die Gewebseinheiten gegenüberstellen, bei denen unter physiologischen Bedingungen keine Vermehrung, keine Teilung stattfindet. Diese haben sich nur langsam entwickelt, sind nur langsam zugewachsen und zeigen infolgedessen einen stabilen Charakter. Wenn sie verletzt wurden oder zugrunde gegangen sind, so ist kaum mit der Neubildung einer Gewebseinheit zu rechnen, weil die Milieuverhältnisse, unter denen sich eine derart hoch differenzierte Gewebseinheit zu entwickeln vermag, im erwachsenen Organismus meistens nicht mehr gegeben sind. Eine Neodifferenzierung dieser hochdifferenzierten Gewebseinheiten kommt nur dann in Frage, wenn die Möglichkeit besteht, die Milieuverhältnisse neu zu schaffen, unter denen undifferenzierte Reservezellen imstande sind, sich erneut zu einer kompliziert aufgebauten Gewebseinheit zu entwickeln. Derartige experimentell oder operativ produzierbare Fälle heben indessen nicht den grundlegenden Unterschied auf, der in den Geweben höherer Organismen vorliegt, in denen die labilen Gewebe, sei es das Epithel, Bindegewebe, Lymphgewebe oder Blut, gut regenerieren, während die zerstörten Neurozyten des Nervensystems nur durch Gliagewebe ersetzt werden und die multipolaren motorischen Zellen im Vorderhorn des Rückenmarks — wenn sie einmal zugrunde gegangen sind — nach dem heutigen Stand der Wissenschaft nicht mehr ersetzt werden können.

6. *Genetische Unterschiede*

Die Vererbung ist an die teilungs- und vermehrungsfähige Zelle gebunden. Die in den Keimdrüsen entstehenden Geschlechtszellen entwickeln sich durch mitotische bzw. reductions-Zellteilung. Die Geschlechtszellen sind typische undifferenzierte Elemente. Hohe Differenzierung und Ausübung einer speziel-

en Funktion würden hier nur einen Nachteil bedeuten. Vom Gesichtspunkt der Vererbung aber kommt den Gewebseinheiten — ob es sich nun um Muskelgewebe oder Muskelfasern, um das Neuron, den Knorpel, den Knochen oder das Zytoosteon handelt — keine Bedeutung zu. Diese durch amitotische Kernteilung wachsenden, hochdifferenzierten stabilen Gewebselemente nehmen an der Fortpflanzung des Individuums nicht direkt teil. Diese hochdifferenzierten Elemente üben andere höhere Funktionen des Organismus aus. Auch in genetischer Beziehung lassen sich somit den undifferenzierten, sich mitotisch teilenden Zellen — die hochdifferenzierten und eine spezielle Funktion versehenden Gewebseinheiten gegenüberstellen.

7. *Andere biologische bzw. pathologische Unterschiede*

Auch noch in anderer Beziehung lassen sich die Zellen von den Gewebseinheiten distanzieren, ja sogar einander gegenüberstellen. So sind beispielsweise den Röntgenstrahlen gegenüber die in Vermehrung befindlichen Zellen empfindlich, dagegen die aus Gewebseinheiten aufgebaute Muskulatur, der Knorpel und das in engerem Sinne verstandene Knochengewebe, aber auch das Nervensystem bekanntlich weniger empfindlich. Nach der auf den ganzen Körper einwirkenden Bestrahlung sind in den aus Gewebseinheiten aufgebauten Organen nur geringe Veränderungen anzutreffen, und auch diese ergeben sich eher aus der Fragilität der diese Organe versorgenden Kapillaren als aus der Schädigung der im engeren Sinne verstandenen Gewebseinheiten. Im Gegensatz dazu zeigen die Zellen der innersekretorischen Drüsen, die Zellenelemente der Darmschleimhaut, im allgemeinen die Epithelien, die aus Zellen aufgebauten Lymphorgane, das Knochenmark, d. h. die Zellelemente der Hämopoese, beträchtliche Schädigungen, die zum Tode der Tiere führen. Die Trennung von Zellen und Gewebseinheiten läßt sich daher vom strahlenpathologischen Gesichtspunkt nur bestärken. Aber auch in pathologischer Beziehung kann man das aus Zellen bestehende labile Gewebe dem aus Gewebseinheiten zusammengesetzten stabilen Gewebe gegenüberstellen: bekanntermaßen neigen die labilen Gewebe in höherem Maße zur bösartigen Wucherung als die stabilen. Vom Epithel, von Bindegewebszellen bzw. vom Knochenmark ausgehende oder in den Lymphorganen entstehende bösartige Geschwülste (Karzinome, Sarkome) kommen viel häufiger vor als die aus den Nervenelementen des Nervensystems oder aus quergestreiftem Muskel (Rhabdomyosarkom) bestehenden Malignome.

Sicherlich werden die Vertreter der verschiedenen Wissenschaftszweige noch weitere Gesichtspunkte finden, auf Grund welcher die Zellen und Gewebseinheiten einander gegenübergestellt bzw. voneinander getrennt werden können. Zweifellos dürfte dies auf die weitere Entwicklung der einen oder anderen Wissenschaft befruchtend wirken.

In der Nomenklatur erscheint gegenüber der historischen Benennung Zelle der neutrale Ausdruck Gewebseinheit zur Bezeichnung des den Histologen und Pathologen wohlbekannten Zellorganellums geeignet.

Innerhalb der Gruppe der von den Zellen zu trennenden Gewebseinheiten kann natürlich in verschiedener Hinsicht unterschieden werden. So hat die plasmodiumartige quergestreifte Muskelfaser einen anderen Charakter und eine andere Struktur als das mit Lemmoblasten umfasste den Nervenfortsatz versehende Neuron oder das über Knorpelsubstanz verfügende Chondron. Diese Unterschiede zwischen den einzelnen Gewebseinheiten bildet indessen keine Ursache, ihre Gesamtheit auf Grund der angeführten ähnlichen Eigentümlichkeiten von den Zellen nicht abzutrennen.

Zusammenfassung

Im Interesse des weiteren Ausbaus der histologischen Wissenschaft erscheint es angezeigt, neben die Zelle als einen besonderen Begriff die Gewebseinheit als stabilen geweblichen Bestandteil des Organismus zu stellen. Am Beispiel der quergestreiften Muskelfaser, des Neurons, Chondrons, Zytoosteons usw. wird gezeigt, daß diese geweblichen Bestandteile im Hinblick auf ihre Struktur, ihren Aufbau sich von den Zellen wesentlich unterscheiden, so daß es berechtigt ist, sie besonders zu bezeichnen und zu behandeln. Die Gewebseinheit ist ein hochdifferenzierter, stabiler geweblicher Bestandteil mit langer Lebensdauer, der sich aus den Zellen durch Differenzierung bzw. Wachstum in spezieller Richtung, oft durch direkte Kernteilungen entwickelt und zur Durchführung gewisser höherer Aufgaben geeignet wird (Muskelfaser, Neuron). Sie regeneriert schwer, ihre genetische Bedeutung und ihre Wichtigkeit für die Fortpflanzung ist sehr gering. Angesichts dieser Eigenschaften ist die Gewebseinheit von den niedriger differenzierten, kürzere Zeit lebenden, labilen, sich durch mitotische Teilung ständig erneuernden, gut regenerierenden Zellen zu trennen. Im Gegensatz zu den Gewebseinheiten kommt bekanntlich den Zellen auch vom Gesichtspunkt der Vererbung eine große Bedeutung zu. Es gibt natürlich auch einen Übergang zwischen Zelle und Gewebseinheit (z. B. die zweizellige Leberzelle oder die Megakaryozyte), doch ist dies kein Grund, nicht auf die Unterschiede zwischen den Antipoden hinzuweisen.

КЛЕТКА И ЕДИНИЦА ТКАНИ

Ш. КРОМПЕХЕР

С точки зрения дальнейшего развития гистологии можно считать обоснованным выдвижение в качестве нового понятия наряду с клеткой также единицу ткани, как постоянную тканевую составную часть организма.

На примере поперечнополосатого мышечного волокна, нейрона, хондрона, цитоостеона, и т. д. явно видно, что эти тканевые составные части в отношении своей структуры в существенной мере отличаются от клеток и вполне обосновано их обособленное обозначение и рассматрение. Тканевая единица представляет собой высоко дифференцированную, прочную тканевую составную часть, с большой продолжительностью жизни, которая развивается из клетки благодаря дифференциации, в специфическом направлении, росту часто путем прямого ядерного деления, и становится пригодной для осуществления определенных более высоких задач (мышечное волокно, нейрон). Единица ткани трудно возобновляется, ее способность к размножению и ее наследственное значение минимальны. Тканевую единицу на основании этих особенностей следует обособлять от лабильных, постоянно возобновляющихся митозным размножением, хорошо регенерирующихся клеток меньшей дифференцированности, с более короткой продолжительностью жизни. По сравнению с тканевыми единицами, клетки, как известно, обладают также большим наследственным значением. Между клетками и тканевыми единицами существуют, конечно, переходы (напр. двуядерные печеночные клетки, или мегакароциты), однако, это не является причиной, что бы не указать на разницы между этими антиподами.

CELL AND TISSUE UNIT

SF. KROMPECHER

The progress of histology justifies the introduction of a new concept, the tissue unit, which — like the cell — is an integral component of the organism.

Striated muscle fibre, neuron, chondron or cytoosteon, etc., being tissue components whose structure and architecture is greatly different from that of the cells, should be defined and treated separately. Tissue units are highly differentiated, long-living, stable histological constituents which, evolved from cells through specially oriented differentiation, growth, and often through direct division, are able to perform certain higher functions (muscle fibre, neuron). They are rarely capable of regeneration and their reproductive and genetic significance is almost nil. These properties distinguish the tissue units from cells, these being less differentiated, short-lived, labile and constantly regenerating by mitotic reproduction. In contradistinction to tissue units, cells have a great genetic significance. There are, of course, transitory forms between cell and tissue unit (e.g. the binuclear liver cell or the megakaryocyte). This does not, however, justify a disregard of the differences between them.

Prof. Dr. Stefan KROMPECHER, Debrecen, 12. Anatómiai Intézet. Ungarn

Department of Embryology. Leningrad State University
(Head: B. P. TOKIN)

ON THE ELECTRON MICROSCOPY OF MEMBRANE STRUCTURES OF CELLS

I. B. TOKIN

(Received July 3, 1960)

In the early years of fine structure studies with the aid of the electron microscope the existence of clearly defined cell surface membranes were convincingly demonstrated (SJÖSTRAND & RHODIN, 1953; RHODIN, 1954 etc.). These structures were rarely analysed; in those years the authors mentioned only their presence and only in some instances did they refer to their thickness. The ultrastructure of these membranes was completely neglected, mainly owing to technical difficulties. To reveal the structural details, very thin sections are needed which must be cut exactly perpendicular to the membrane.

ZETTERQVIST (1956) was one of the first to study the intimate ultrastructure of cell membranes. He demonstrated a three-layered structure in the plasma membrane covering the apical free surface of epithelial cells in the mouse intestine. Somewhat later similar structures were found also in other cells, *e. g.* the nerve tissue of mammals (ROBERTSON, 1957, 1958; SCHMIDT & GESCHWIND, 1957), germ-cells (ROTHSCHILD, 1958), helminths (TOKIN, 1959) and bacteria (KELLENBERGER & RYTER, 1958; TOKUYASU & YAMADA, 1959).

The present paper summarises the results of our electron microscopic studies in the years 1958 and 1959 concerning the ultrastructure of different protoplasmic membranes in the somatic and germ-cells of *Parascaris equorum* GOEZE.

Material and methods

Small pieces of ascaris testis, ovary and intestine were fixed in 1 per cent osmic acid (PALADE, 1952), dehydrated in butanol, infiltrated and embedded in a 4:1 mixture of butyl and methyl metacrylate (NEWMAN, BORYSKO & SWERDLOW, 1949; BORYSKO, 1956). Butanol gives superior results in embedding without the use of strong organic solvents. Thin sections were cut with glass knives on a SJÖSTRAND (1953) ultramicrotome and examined with an UEM-100 (УЭМ-100) electron microscope using a 60 kV beam.

Cell membranes

The cell membranes of the intestinal cells were found to be three-layered over all regions of the cells and not only over the free surface and the desmosomal region. The membrane is composed of two external, electron dense

(osmiophilic) layer and an internal, less dense one (Figs. 1 and 2). The germ-cells in different stages of development have surface membranes similar in structure. It is difficult to demonstrate this structure in the cell membranes of germ-cells, owing to their uneven borders. Statistical elaboration of the measurement data showed some variation in the thickness of the intestinal cell membrane. The thickness was found to be 70 ± 4 Å in the apical, 187 ± 8 Å in the desmosomal, and 74 ± 5 Å in the basal region. The thickness of the germ-cell membrane changes during the development of the gametes; in the course of spermiogenesis this value increases from 82 ± 4 Å (spermatogonia) to 97 ± 8 Å (spermatids).

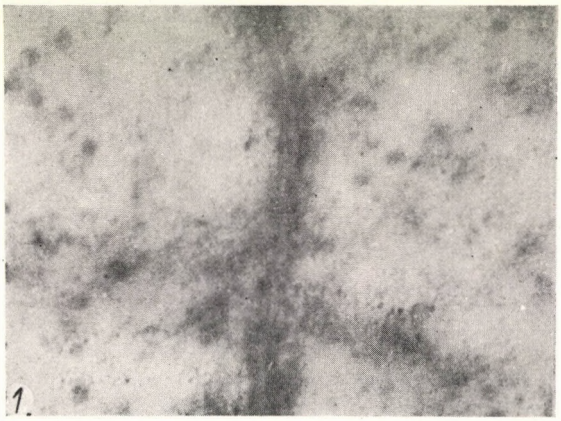


Fig. 1. Lateral surface membranes of ascaris intestinal cells. "Desmosomal" region. ×110 000

On sections of all studied cells, cut exactly perpendicular through the membrane, it was very conspicuous that the membranes retain their individuality and never coalesce however close they are to one an other. Highly characteristic minimal cell distances could be extablished amounting to 55—94 Å in the intestinal epithelium, to 66 Å between the spermatogonia, and 82 Å between the oogonia. This consistency of the intracellular spaces points to an active relationship of the individual cells and gives no support to their being conceived as passive, purely mechanical structures.

The chemical composition of the cell membranes is still far from being completely elucidated. All authors agree, however, that they contain phospholipids and proteins, in full agreement with the view of the biochemists and physiologists (*e. g.* DANIELLI, 1935, 1936; HÖBER, 1945; PARPART & DZIEMIAN, 1940) who accept the classical membrane theory of permeability, dating back to the end of the last century (PFEFFER, 1877; DE VRIES, 1884, etc.).

The general physico-chemical processes during fixation and dehydration have not been sufficiently studied. Even less is known about the interaction

Fig. 2. The same as in Fig. 1. Area below the "desmosomal" region. × 140 000

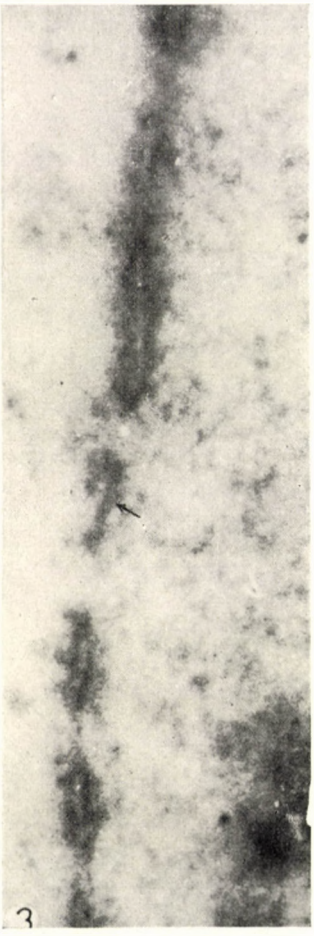


Fig. 3. Nuclear envelope membranes in ascaris intestinal cell. × 140 000

of osmic acid with different cytoplasmic structures, and of the effect of potassium permanganate fixation, which has lately become widely used, we know the least. Owing to the scarcity of such facts several hypothses have been proposed explaining differently the exact topochemistry of the cell membranes. Several authors (ROBERTSON, 1957, 1958; SCHMIDT & GESCHWIND, 1957, SJÖSTRAND, 1956) identify the electron dense layers with the proteins and the light layer with the lipids.

MERRIAM (1958), however, assumes that osmic acid is bound by the membrane phospholipids. Cell membrane models were constructed exclusively of protein free phospholipids. The electron microscopic study of such models gave a decisive support to the latter view (REVEL, ITO & FAWCETT, 1958).

The presence of proteins (together with phospholipids) in the osmiophile layer of genuine cell membranes cannot, however, be ruled out. In this connection the work of STOECKENIUS (1959) is of considerable interest, who studied ultrathin sections of myeline formations from brain phospholipids with and without added protein (globin).

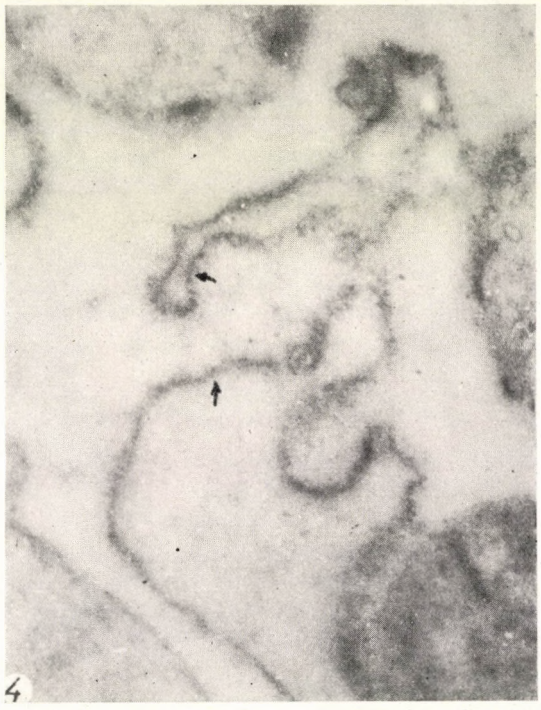


Fig. 4. Walls of the Porter-Palade elements in ascaris intestinal cell. × 53 000

Nuclear envelope membranes

In different parts of the external and internal membranes constituting the nuclear envelope of interkinetic nuclei a substructure of three layers can be shown (Fig. 3). The outer layers are osmiophilic and the inner one is less dense, as in the case of cell membranes.

Membranes of the Porter-Palade complex*

In the year 1958 we succeeded in demonstrating the three layers composing the membrane of the ergastoplasmic structures in ascaris ovocytes. Later

*The Porter-Palade complex (a name proposed by the author in 1959) or ergastoplasmic complex is composed of the individual structures described earlier as „endoplasmic reticulum", "ergastoplasm", "α-cytomembranes", etc. The proposed name, according to our

studies have shown this structure (Fig. 5) of the Porter-Palade complexes in the ascaris intestinal cells (Fig. 4) and germ-cells in different developmental stages. The ribonucleoproteid granules adhere to the outer layer of the membrane. Similar micrographs showing the three-layered wall of the ergastoplasm units have been published by several authors (BRADBURY & MEEK, 1958, SCHOENBERG, 1958) but remained undescribed. It is a noteworthy fact that parallel adjecent canalicular (= lamellar) components of the ergastoplasm have their limiting membranes in a fixed distance (SJÖSTRAND, 1955; EPSTEIN, 1957 etc.). The fact may point to a definite (molecular?) interaction between the membranes.

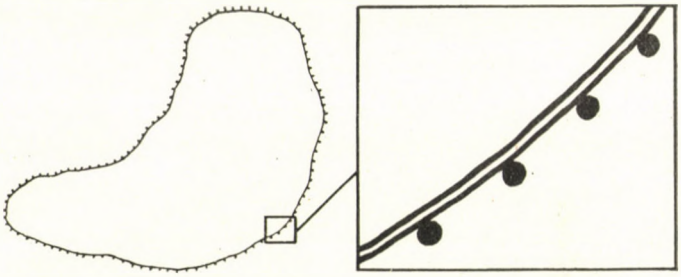


Fig. 5. Schematic drawing of the structure of the wall of the Porter-Palade elements

Membranes limiting the elements of the Golgi complex

The thickness of the membranes is similar (82 Å) both in different parts of the same Golgi complex and in different cells of the ascaris (Fig. 6). The membranes have three layers. The distance between individual Golgi canalicules depends on their arrangement but has a minimal value of 152 Å.

Our data are in good agreement with the recent views concerning the intimate relationship between nuclear and ergastoplasmic membranes (PALADE, 1955; WATSON, 1955; EPSTEIN, 1957). A similar relationship has been shown to exist between the ergastoplasmic and cell surface membranes (PALADE, 1956; HAY, 1958). The continuity of the agranular and endoplasmic reticulum has been firmly established (PALADE & SIEKEWITZ, 1956). Many authors point to the agranular reticulum and the Golgi complex membranes (PALADE & SIEKEWITZ, 1956; SAGER & PALADE, 1957 etc.) having a similar ultrastructure.

Dealing with the structure of protoplasmic membranes one must not leave unconsidered the three-layered wall of mitochondria (FREEMAN, 1956).

view, corresponds fairly to their structural diversity, and at the same time stresses their unquestionable role in the synthetic processes and points to their physiological and morphological interdependence. It also refers to the fundamental contributions by PORTER and PALADE to the formation of recent views on the structure and function of the ergastoplasmic particles

The morphological studies by means of the electron microscope thus reveal the universality of a three-layered structure of the different protoplasmic membranes. Their having a common chemical composition is likewise highly probable. The elucidation of the molecclar architectonics of the membranes is hoped to lead to clearer concept of the physiological significance of the phenomenon discussed in this paper.

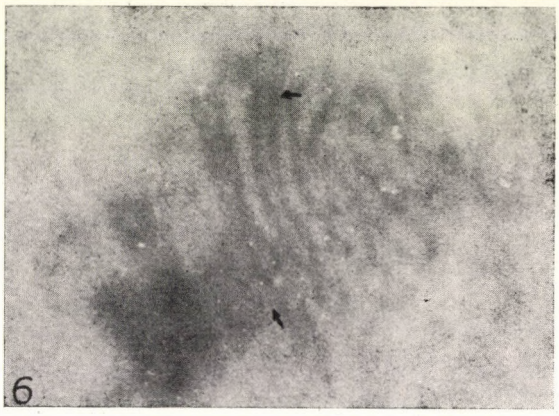


Fig. 6. Walls of the Golgi elements in ascaris intestinal cell. × 140 000

Summary

An electron microscopical study of different membranes (cell membrane, nuclear envelope, walls of the Golgi and Porter-Palade complexes) in the somatic and germ-cells of *Parascaris equorum* Goeze has been performed. All studied membranes were found to be composed of three layers.

In all cells they have a similar ultrastructure. The two external layers are electron dense (osmiophile), the internal one is lighter. The results obtained have been discussed with regard to the recent views on the chemical composition of cell membranes.

REFERENCES

1. Borysko, E. (1956): Recent developments in methacrylate embedding. I. A study of the polymerization damage phenomenon by phase contrast microscopy. J. Biophys. a. Biochem. Cytol. *2* (Suppl.) 3—14. — 2. Bradbury, S.—Meek, G. A. (1958): The fine structure of the adipose cell of the leech of Glossosiphonia complanata. J. Biophys. a. Biochem. Cytol. *4*, 603—608. — 3. Danielli, J. (1935): The thickness of the wall of the red blood corpuscle. J. Gen. Physiol. *19*, 19—22. — 4. Danielli, J. (1936): Some properties of lipoid films in relation to the structure of the plasma membrane. J. Cell Comp. Physiol. *7*, 393—408. — 5. Vries, H. de (1884): Eine Methode zur Analyse der Turgorkraft. Jahrb. wiss. Bot. *14*, 427—601. — 6. Epstein, M. A. (1957): The fine structure of the cells in mouse sarcoma 37 ascitic fluids. J. Biophys. a. Biochem. Cytol. *3*, 567—576. — 7. Freeman, J. A. (1956): The ultrastructure of the double membrane systems of mitochondria. J. Biophys. a. Bio-

chem. Cytol. *2* (Suppl.) 353—354. — 8. HAY, E. D. (1958): The fine structure of blastema cells and differentiating cartilage cells in regenerating limbs of Amblystoma larvae. J. Biophys. a. Biochem. Cytol. *4*, 583—592. — 9. HÖBER, R. (1945): Physical chemistry of cells and plasmic membrane of Escherichia coli. J. Biophys. a. Biochem. Cytol. *4*, 323—326. — 11. MERRIAM, R. W. (1958): The contribution of lower oxides of osmium to the density of biological specimens in electron microscopy. J. Biophys. a. Biochem. Cytol. *4*, 579—582. — tissues. Philadelphia. — 10. KELLENBERGER, E.—RYTER, A. (1958): Cell wall and cyto-12. NEWMAN, S. B.—BORYSKO, E.—SWERDLOW, M. (1949): New sectioning techniques for light and electron microscopy. Science, *110*, 66—68. — 13. PALADE, G. E. (1952): A study of fixation for electron microscopy. J. Exp. Med. *95*, 285—298. — 14. PALADE, G. E. (1955): A small particulate component of the cytoplasm. J. Biophys. a. Biochem. Cytol. *1*, 59—68. — 15. PALADE, G. E. (1956): The endoplasmic reticulum. J. Biophys. a. Biochem. Cytol. *2* (Suppl.) 85—98. — 16. PALADE, G. E.—SIEKEVITZ, P. (1956): Liver microsomes. J. Biophys. a. Biochem. Cytol. *2*, 171—200. — 17. PARPART, A.—DZIEMIAN, A. (1940): The chemical composition of the red cell membrane. Cold Sp. H. Symp. Q. Biol. *8*, 17—22. — 18. PFEFFER, W. (1887): Osmotische Untersuchungen. Leipzig. — 19. REVEL, J. R.—ITO, S.—FAWCETT, D. W. (1958): Electron micrographs of myelin figures of phospholipide simulating intracellular membranes. J. Biophys. a. Biochem. Cytol. *4*, 495—498. — 20. RHODIN, J. (1954): Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changes proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney. Thesis: Stockholm. — 21. ROBERTSON, J. D. (1957): Some aspects of the ultrastructure of double membranes. Ultrastructure and Cellular Chemistry of Neural Tissue (H. Waelsch-editor), New York, Paul Hacker. — 22. ROBERTSON, J. D. (1958): Structural alterations in nerve fibers produced by hypotonic and hypertonic solutions. J. Biophys. a. Biochem. Cytol. *4*, 349—364. — 23. ROTSCHILD, L. (1958): The surface of the sea urchin egg. Quart. J. Microsc. Sci. *99*, 1—3. — 24. SAGER, R.—PALADE, G. E. (1957): Structure and development of the chloroplast in Chlamydomonas. I. The normal green cell. J. Biophys. a. Biochem. Cytol. *3*, 463—488. — 25. SCHMIDT, F. O.—GESCHWIND, N. (1957): The axon surface. Progress in Biophysics and Biophysical Chemistry (J. A. Butter a. B. Katz, editors), New York, Pergamon Press 8. — 26. SHOENBERG, C. F. (1958): An electron microscope study of smooth in pregnant uterus of the rabbit. J. Biophys. a. Biochem. Cytol. *4*, 609—614. — 27. SJÖSTRAND, F. S. (1953): A new microtome for ultrathin sectioning for high resolution electron microscopy. Experientia (Basel), 114. — 28. SJÖSTRAND, F. S. (1955): The ultrastructure of the ground substance of the cytoplasm. Symp. VIIIth Congr. Cell. Biol., Leiden 1954; Ser. B. *21*, 222—228. — 29. SJÖSTRAND, F. S. (1956): The ultrastructure of cells as revealed by the electron microscope, International Reviews of Cytology (G. H. Bourne and J. E. Danielli, editors), New York, Academic Press, Inc. — 30. SJÖSTRAND, F. S.—RHODIN, J. (1953): The ultrastructure of the proximal convoluted tubules of the mouse kidney as revealed by high resolution electron microscopy. Exp. Cell Res. *4*, 426—456. — 31. STOECKENIUS, W. (1959): An electron microscope study of myelin figures. J. Biophys. a. Biochem. Cytol. *5*, 491—500. — 32. Токин, И. Б.: (1958) Ультраструктура протоплазмы ооцитов Parascaris equorum. Архив Анатомии, Гистологии и Эмбриологии, *35* (2) 79—87.— 33. Токин, И.Б.: (1959) Электронно-микроскопические исследования половых и соматических клеток Parascaris equorum. Thesis, Moscow. — 34. TOKUYASU, K.—YAMADA, E. (1959): The fine structure of Bacillus subtilis. I. Fixation. J. Biophys. a. Biochem. Cytol. *5*, 123—128. — 35. ZETTERQVIST, H. (1956): The ultrastructural organization of the columnar absorbing cells of the mouse jejunum. Thesis, Stockholm.

О ТОНКОМ СТРОЕНИИ МЕМБРАННЫХ ОБРАЗОВАНИЙ КЛЕТКИ

И. Б. ТОКИН

Проводились электронно-микроскопические исследования строения мембранных образований половых и соматических клеток Parascaris equorum GOEZE (клеточные и ядерные мембраны; стенки компонентов комплексов Гольджи и Портера—Паладе). Обнаружено, что все эти различные мембранные образования являются трехслойными.

Во всех изучавшихся клетках они имеют весьма сходную субмикроскопическую структуру и состоят из наружных осмиофильных и внутренних электронно-оптически менее плотных слоев. Полученные данные сопоставляются с современными представлениями о химическом строении клеточных мембран.

ÜBER DIE ELEKTRONENMIKROSKOPIE DER MEMBRANEN DER ZELLE

I. B. TOKIN

Elekronenmikroskopische Untersuchungen des Aufbaus von Membranen der Keim- und somatischen Zellen des Parascaris equorum GOEZE wurden durchgeführt (Zellen- und Kernmembranen: die Wände der Komponenten des Golgi und Porter-Palade-Komplexes). Es wurde festgestellt, daß alle diese Membranbildungen dreischichtig sind.

In allen untersuchten Zellen weisen sie eine vollkommen ähnliche submikroskopische Struktur auf, und sie bestehen aus äußeren osmiophilen und inneren, elektronenoptisch weniger dichten Schichten. Die Befunde werden mit den gegenwärtigen Vorstellungen über die chemische Struktur der Zellmembranen verglichen.

И. Б. Токин, Ленинград В. О. Менделеевская 5, СССР

Laboratorium für Experimentelle Embryologie der Akademie der Rumänischen Volksrepublik, Timişoara

TRANSSEKTIONSEXPERIMENTE AM 12-SOMITEN HÜHNEREMBRYO

B. Menkes

(Eingegangen am 12. Juli, 1960)

Während der embryonalen Entwicklung bilden sich zwischen den Teilen des Embryokörpers verschiedenartige Beziehungen aus, mit denen der Entwicklungsvorgang selbst, insofern er ein epigenetisches Phänomen ist, innig verbunden ist. Diese Beziehungen entstehen und werden aufrechterhalten teilweise durch humorale Faktoren auf dem Wege der Diffusion und des Blutkreislaufes, teilweise durch direkten Kontakt. Eine bedeutende morphologische Rolle spielen hier auch Wanderungen von Zellkomplexen, Verschiebungen, Auswachsen embryonaler Organe mit Einwanderung in — von ihrem Ursprungsort entfernte — Gebiete, Vorwachsen von Nervenstämmen, Kanälen usw. Eine der Methoden, die in der experimentellen Embryologie zur Analyse dieser verwickelten Vorgänge benützt wird, ist die Transsektion der gesamten Embryonalanlage in verschiedenen Höhen. Solche Transsektionsversuche wurden am Hühnerembryo von Wetzel, Waddington, Wolff, Lutz, Spratt und noch einer Reihe von anderen Autoren in ovo oder an explantierten Keimscheiben, die auf besonderen Kulturmedien wachsen, zwecks Analyse der längs der axialen Organanlagen vorhandenen Entwicklungspotenzen in den verschiedensten Varianten durchgeführt. Es handelt sich bei der Mehrzahl der zitierten Arbeiten um transversale oder schräge Durchschneidungen (totale oder partielle) an jungen, sogar unbebrüteten Keimscheiben, und solchen des ersten Entwicklungstages. Meistens wurde die Operation im Stadium der vollausgebildeten Primitivlinie, Primitivlinie und Kopffortsatz und im Stadium der ersten Somiten (entsprechend Stadium 5—7 nach Hamburger—Hamilton) vorgenommen.

Seltener wurden etwas ältere Embryonen im Stadium von 12—15 Somiten von etwa 38 Stunden Inkubationsdauer (Stadium Hamburger—Hamilton 10—11) mit der Durchschneidungsmethode untersucht. Solche Untersuchungen sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Es handelt sich hier um die Untersuchung des Entwicklungsvorganges in zwei voneinander frühzeitig operativ getrennten Hälften des Embryokörpers, die miteinander nur durch gemeinsame Blutzirkulation und gemeinsames Eiweissdotter und subembryonale Flüssigkeit in Verbindung geblieben sind.

Material und Methode

Verwendet wurden Leghorn-Embryonen, welche im Stadium von 12—15 Somiten im Alter von 38—40 Stunden operiert wurden. In diesem Bebrütungsalter steht der Embryo dicht vor Beginn der Blutzirkulation und befindet sich in einer für verschiedenartigste Operationen ausserordentlich günstigen Periode. Nach Fensterung des Eies und einer leichten Vitalfärbung mit Neutralrot wird der Embryokörper unter der 12. Somite mit Hilfe einer Glasnadel transversal durchschnitten. Der Schnitt geht durch die ganze Dicke der Embryoanlage und reicht zu beiden Seiten bis an die Area pellucida, darf aber nicht ihren äusseren Rand, also die Area opaca erreichen. Um die Wiedervereinigung der Schnittränder zu verhindern, kann ein Zellophan-Keil in die Schnittwunde eingeführt werden.

Resultate

An einem Teil der so operierten Embryonen ist die Ausbildung der Arteriae vitellinae gestört, so dass es nicht zur Bildung einer normalen Blutzirkulation kommen kann. (Diese Fälle sind natürlich für die weiteren Untersuchun-

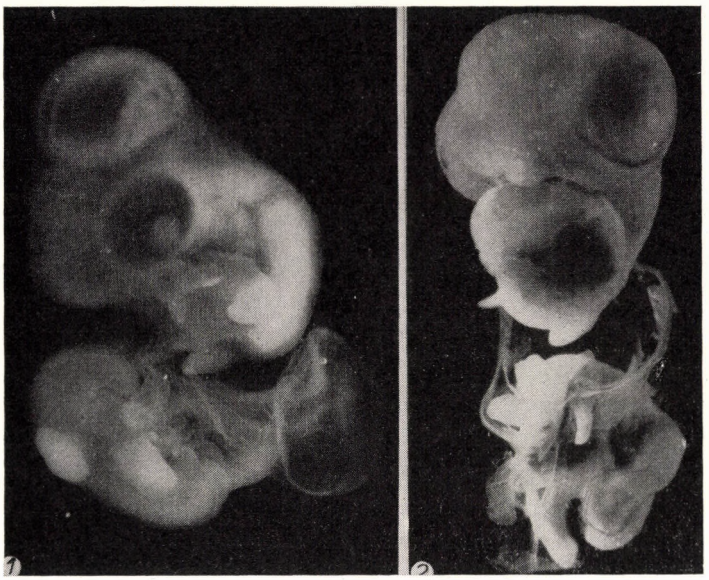


Abb. 1. Transsektion im 12-Somiten-Stadium unterhalb des 12. Somitenpaares. Fixation am 7. Bebrütungstag

Der Embryo besteht aus 2 völlig getrennten Körperteilen. Die obere Extremität ist in 2 Gebilde aufgeteilt, ein oberes stummelförmiges, von konischer Form, und ein unteres, grösseres, der Norm ähnlicheres. Der untere Körperteil hat eine Allantoisblase ausgebildet

Abb. 2. Operiert wie bei Abb. 1. Fixiert nach 8-tägiger Bebrütung Obere Extremität in je 2 spitze, stummelförmige Gebilde aufgeteilt

gen verloren.) In etwa 60% der operierten Fälle bildet sich die Blutzirkulation normal aus und wir erhalten Embryonen die aus zwei voneinander völlig getrennten Teilen, einem kranialen und einem kaudalen, bestehen (Abb. 1,

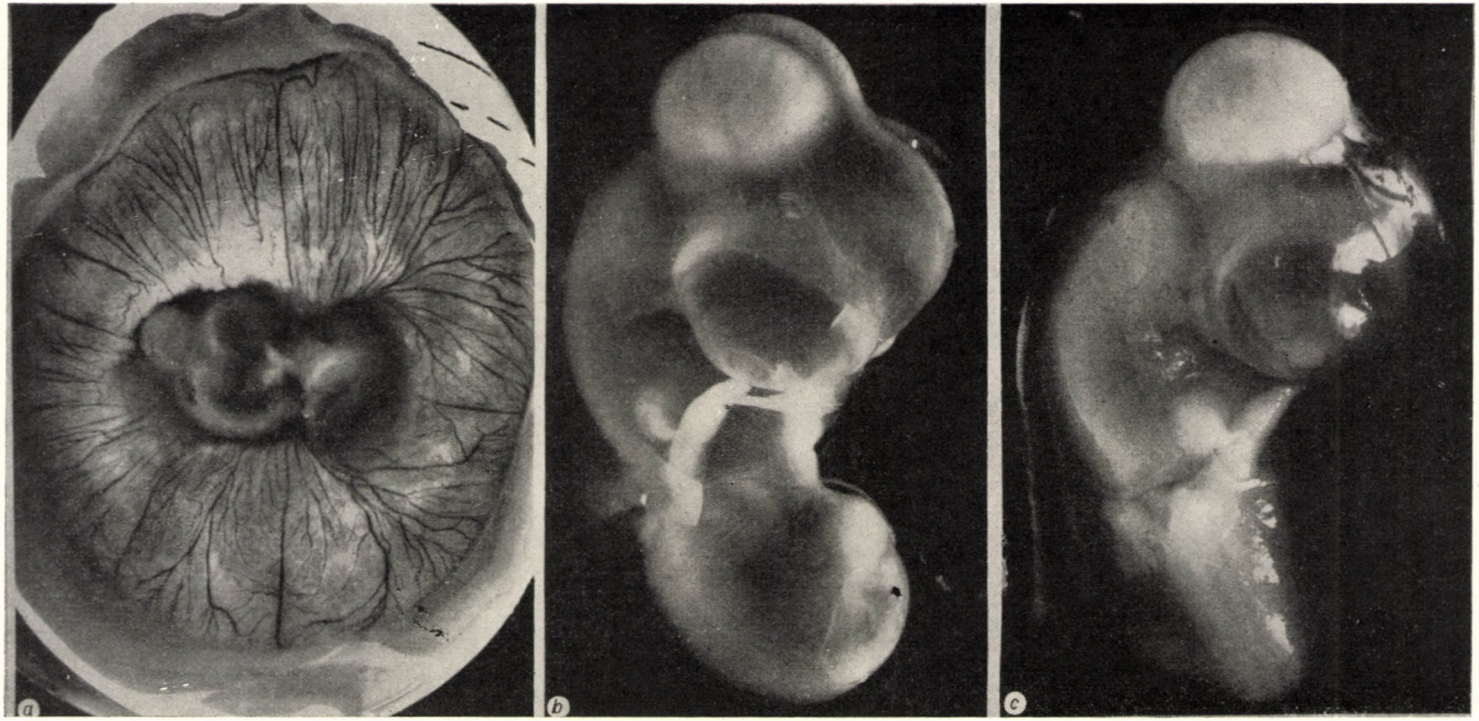


Abb. 3a. Operiert wie bei Abb. 1 und 2. Fixiert am 7. Bebrütungstag, nach Durchschneidung im 12-Somiten-Stadium unter dem 12. Somitenpaar, Totalansicht in ovo. Die beiden Teile des Embryonalkörpers werden von einem gemeinsamen Amnion zusammengehalten, aber voneinander völlig getrennt. Typisches Verhalten der oberen Extremität nach Halbierung ihrer Anlage: kranialer, konischer, nach unten gerichteter kleiner Stummel und langer, zugespitzter, nach oben gerichteter kaudaler Teil. *3b und c:* der Embryo isoliert

2 und 3). Ein Ast der Arteria vitellina dringt in den kaudalen Embryonalteil ein und nimmt dort den typischen Verlauf der Aorta. In den von uns beobachteten Fällen waren die mit Erfolg operierten Embryonen bis zum 8. Bebrütungstag lebensfähig. In einigen Fällen bildet der kaudale Teil eine typische Allantoisblase aus.

In folgendem beschreiben wir den Zustand der Plica urogenitalis im kaudalen Embryoteil und das Verhalten der geteilten Anlage der oberen Extremität.

Abb. 4. Schnitt durch die untere Hälfte eines im 12-Somiten-Stadium operierten Embryos. Fixierung am 7. Bebrütungstag. Völliges Fehlen des Mesonephros. Breitbasige, leere Plica urogenitalis, kurzes Mesenterium.

1. *Zustand der Plica urogenitalis*

Es ist bekannt (WADDINGTON, GRÜNWALD), dass kaudal von Durchschneidungen oder andersartiger Behinderung des Vorwachsens des Wolff-Kanals ein Mesonephros (und später Metanephros) nicht zur Entwicklung kommen kann. Unsere kaudalen Embryohälften besitzen dementsprechend kein Mesonephros (Abb. 4). Es ist aber bemerkenswert, dass die mesenchymale Plica urogenitalis trotz Fehlens des grössten Teiles ihres normalen Inhaltes, wohl nicht im normalen Ausmass, aber deutlich ausgebildet ist und in die Zölomhöhle vorspringt. Sie enthält, ausser laxem Mesenchym, die Vena cardinalis posterior und Vena subcardinalis. Die Glandula suprarenalis bzw. interrenalis ist normal ausge-

Abb. 5a. 7. Bebrütungstag, kaudale Hälfte eines operierten Embryos. Plica urogenitalis ohne Mesonephros mit Inter- und Adrenal-Organ, Sympathicus, Gonade, kurzes Mesenterium, Darm- und Blinddarm-Anhänge. Interrenal-Organ scheint im ganzen hypertrophisch zu sein

Abb. 5b. Normales Vergleichspräparat zu *5a.* Silberimprägnation

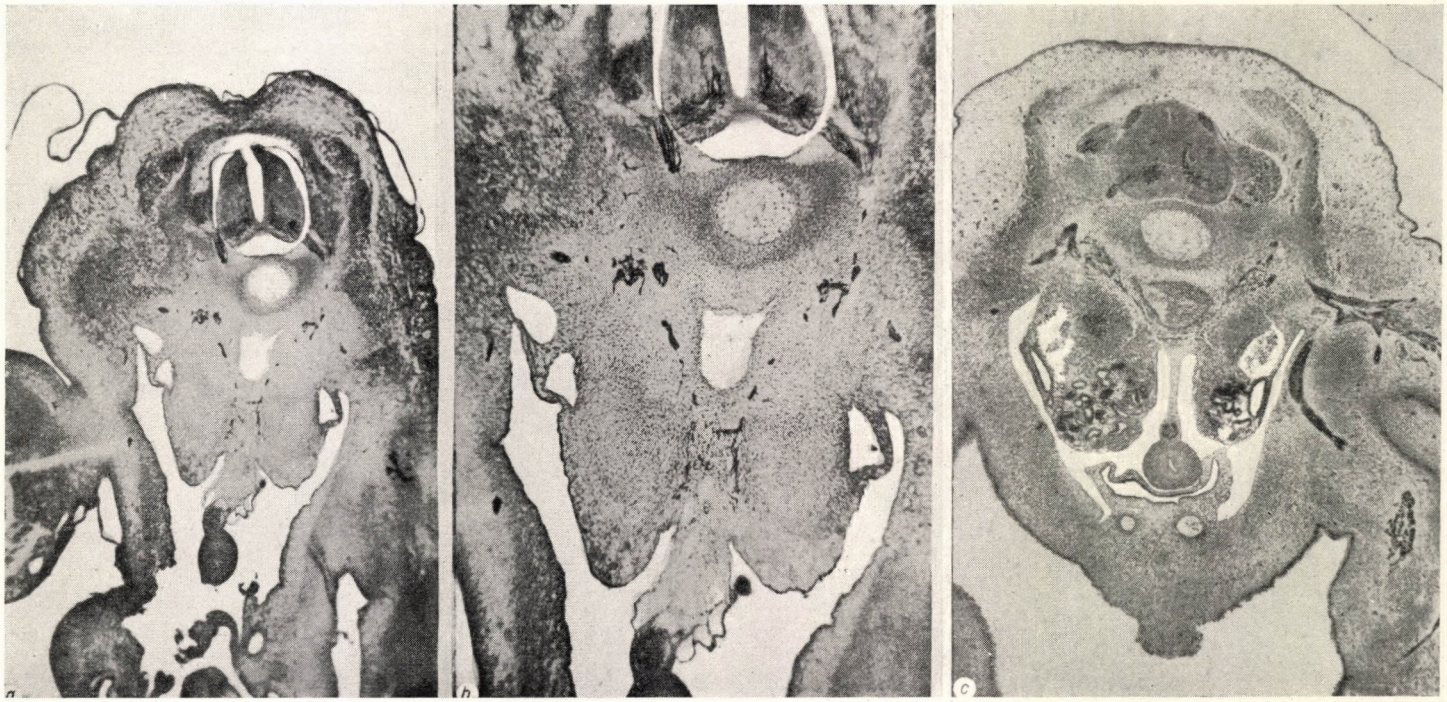


Abb. 6a. Kaudaler Teil eines operierten Embryos. Silberimprägnation. Leere Plica Urogenitalis. Kein Mesonephros, Sympathicus und Adrenal-Organ. *6b.* Einzelheiten von *6a* in stärkerer Vergrösserung. *6c.* Normales Vergleichsbild, Silberimprägnation

bildet, ihre Zellstränge scheinen sogar hypertrophisch zu sein. (Abb. 5 bis 7). Es steht ihnen offenbar ein zu grosser Ausbreitungsplatz zur Verfügung. Die Gonade ist ebenfalls normal ausgebildet und normal gelagert. Sie enthält Gonozyten. Silberimprägnationen zeigen die normale Ausbildung des Sympathicus und der adrenalen Komponente. Auffallend ist auch das breitbasig aufsitzende Mesenterium. Die ganze Interrenal-Anlage scheint — wie gesagt — hypertrophisch und ventral vorgelagert zu sein. Es ist bemerkenswert, dass die mesenchymale

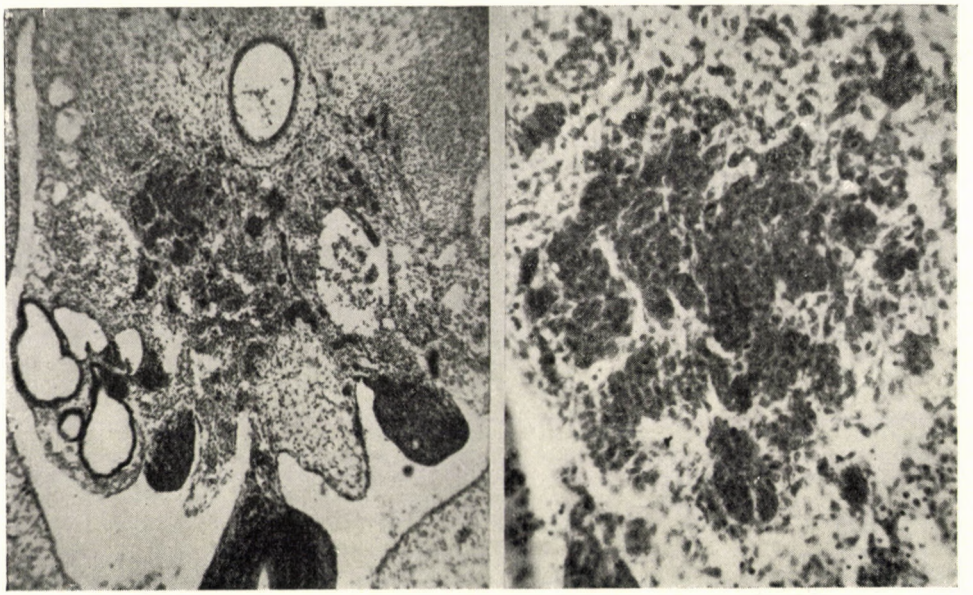


Abb. 7a. 7. Bebrütungstag, kaudaler Teil. Rechts zystischer Mesonephros-Rest. Gonaden Interrenal-Organ im ganzen hypertrophisch. *7b.* Interrenal-Organ von *7a*

Hülle, das »Bett« also auch in Abwesenheit seines parenchymatösen Hauptinhaltes, in unserem Falle des Mesonephros (siehe Vergleichsbilder mit normalen Embryonen) sich ausbildet. Zu dieser Beobachtung sei bemerkt, dass — wie eigene Beobachtungen zeigen — sich auch die Dura mater nach Exstirpation des Rückenmarkes ausbilden kann.

2. *Anlage der oberen Extremität*

Die Entwicklungspotenzen der Extremitäten-Anlagen beim Hühnerembryo waren Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. SAUNDERS stellt mittels Kohlenmarkierung eine proximokaudale Folge von Anlagebezirken fest. ZWILLING untersuchte die Beziehungen zwischen Ektoderm und Mesoderm in der Anlage.

Unser Operationsschnitt unterhalb des 12. Somitenpaares geht durch das Anlagematerial der oberen Extremität hindurch. Die meisten der von uns

operierten Embryonen zeigen dementsprechend eine verdoppelte Anlage der oberen Extremitäten und zwar eine im vorderen und eine im hinteren Embryonalteil. Interessant ist die Wachstumstendenz der beiden, jetzt getrennten Anlagen des Flügels. Die obere Anlage zeigt eine kaudale Wachstumstendenz, die untere wächst in kranialer Richtung. (Abb. 3.) Die Grösse der beiden Teilanlagen hängt offenbar vom Niveau des Operationsschnittes ab: liegt der Schnitt mehr kranial, so bildet sich eine kleine stummelförmige Anlage und eine grosse kaudale Anlage, die der normalen ganzen Anlage ähnlich ist. Die durch die Operation separierten Anlagemassen zeigen also, von ihren normalen Partnermassen befreit, — jede für sich — ein eigenes Verhalten.

Zusammenfassung

Nach Durchschneidung des Hühnerembryos im 12. Somitenstadium unter dem 12. Somitenpaar erhält man 2 getrennte Embryoteile, die bis zum 8. Bebrütungstag lebensfähig sind. Im kaudalen Teil bildet sich eine Plica urogenitalis ohne Mesonephros mit hypertrophischem Interrenal-Organ. Der Operationsschnitt geht durch die Anlage der oberen Extremitäten. Es bilden sich auf jeder Seite je 2 Flügelanlagen von ungewöhnlicher Wachstumsrichtung und Form.

LITERATUR

1. Grünwald, P. (1943): Stimulation of Nephrogenic Tissue by Normal and Abnormal Induction. Anat. Rec. *86*, 321. — 2. Menkes, B. (1958): Cercetari de Embryologie Experimentala. Ed. Ac. Rep. Pop. Rom. — 3. Saunders, J. W. Jr. (1948): The Proximo-distal Sequence of Origin of the Chick Wing and the Role of the Ectoderm. J. exp. Zool. *108*, 363. — 4. Spratt, N. T. (1955): Analysis of the Organizer Center in the Early Chick Embryo. J. exp. Zool. *128*, 121. — 5. Waddington, C. H. (1932): Experiments on the Development of Chick and Duck Embryos Cultivated in vitro. Trans. roy. Soc. B *221*, 179. — 6. Waddington, C. H. (1943): The Morphogenetic Function of a Vestigial Organ in the Chick. J. exp. Zool. *15*, 371. — 7. Waddington, C. H. (1952): The Epigenetics of Birds, Cambridge Univ. Press. — 8. Wetzel, R. (1936): Primitivstreifen und Urkörper nach Störungsversuchen am 1—2 Tage bebrüteten Hühnchen. Arch. Entw. Mech. Org. *134*, 1936. — 9. Wolff, E. J. Kahn (1947): La régulation de l'ébauche des membres chez les oiseaux. C. R. Soc. Biol. (Paris) *141*, 915. — 10. Wolff, E.—H. Lutz (1947): Sur une méthode permettant d'obtenir experimentalement le doublement des embryos d'oiseaux. C. R. Soc. Biol. (Paris) *141*, 901. — 11. Zwilling, E. (1949): The Role of Epithelial Components in the Developmental Origin of the "Wingless" Syndrome of Chick Embryo. J. exp. Zool. *111*, 175.

ОПЫТЫ ПО ПЕРЕРЕЗКЕ ЗАРОДЫШЕЙ ЦЫПЛЯТ В СТАДИИ 12 СОМИТОВ

Б. МЕНКЕШ

После перерезки зародышей цыплят в стадии 12 сомитов получаются под 12. парой сомитов 2 обособленные эмбриональные части, которые способны доживать до 8 дня насиживания. В каудальной части образуется мочеполовая складка без мезонефроса с гипертрофическим интерренальным органом. Операционный разрез проходит через зачатки верхних конечностей. На обеих сторонах образуются по 2 зачатка крыльев необычной формы и необычного направления роста.

EXPERIMENTAL TRANSSECTION OF 12-SOMITE CHICK EMBRYOS

B. MENKES

By a division of 12-somite chick embryos below the 12th segment two separate parts of the embryos are obtained which may survive until the 8th day of incubation. In the caudal portion an urogenital fold without mesonephros and with a hypertrophic interrenal organ is formed. The transsection passes through the anlage of the upper extremities. Two primordial wings of unusual shape and direction develop on each side.

Prof. Dr. B. Menkes, Timişoara, Bul. Mihai Viteazul 24. Rumänien

Institut für Histologie und Embryologie der Universität, Lausanne
(Direktor: Prof. Dr. O. Bucher)

PROBLEME DER HISTOLOGISCHEN MITOCHONDRIENDARSTELLUNG

H. Mayersbach

(Eingegangen am 14. Juli, 1960)

Die Angaben in der Literatur über Form, Zahl und Anordnung der Mitochondrien in einer bestimmten Zellart unbehandelter Tiere sind oft uneinheitlich und Widersprechend. Zweifellos sind dafür tagesrythmische Veränderungen der Organe und Gewebe verantwortlich; gerade die streng periodisch fressenden Laboratoriumstiere wie Ratten und Mäuse weisen starke tageszyklische Schwankungen auf. Bekannt ist dies seit längerem vom Glykogengehalt der Leber (Holmgreen, 1931). Gelegentliche frühere eigene Beobachtungen und jetzt allerdings noch nicht voll abgeschlossene systematische Untersuchungen am Lausanner Institut haben ergeben, dass der Glykogentagesrythmus überdies jahresszeitliche Unterschiede aufweist. Hand in Hand mit dem verschiedenen Glykogengehalt gehen Mitochondrienveränderungen in der Leber (Roberts, 1949). Aber auch die Nierenmitochondrien verändern sich, wie wir beobachten konnten, zum Teil nicht unerheblich im Rahmen des Tageszyklus.

Mehr aber noch spielen die zur Mitochondriendarstellung angewendeten Techniken eine Rolle. Durch die histologische Gewebshandlung können Mitochondrien derart verändert werden, dass von ein und demselben Organ gewonnene Gewebsproben sich nicht mehr vergleichen lassen und keine Ähnlichkeiten mehr untereinander aufweisen.

Wenn man sich das Problem stellt, Mitochondrien zu untersuchen, dann setzt das Thema fast immer voraus, die Mitochondrien möglichst lebenswahr zu Gesicht zu bekommen. Mit einem »Äquivalentbild« ist im Zusammenhang mit der Fragestellung meist wenig gedient, da es nur wenig Aufschlüsse gibt. Das Material soll aber auch nach Möglichkeit noch für andere Untersuchungen verwendbar sein, denn es ist sehr oft wünschenswert, in nebeneinander liegenden Serienschnitten Mitochondrien darzustellen aber auch verschiedene Färbungen und histochemische Reaktionen durchzuführen. Darüber hinaus soll die Technik möglichst einfach sein, so dass es ohne besondere Umstände möglich ist, gleichmässige Serien herzustellen. Methoden, welche nur gelegentliches Gelingen der Mitochondrienfärbung ermöglichen, sind für Vergleiche bei experimentellen Untersuchungen ungeeignet.

Obwohl sich in neuerer Zeit eine grosse Zahl von Fixierungs- und Färbungsmethoden für Mitochondrien anbietet, (HARMANN 1950, CHANG 1956, FUJII 1956, ANDREWS and JOHNSON 1956, BAKER 1957, LADMANN und MITCHELL 1957) kehrt man immer gerne zu den altbewährten Methoden von Regaud und Champy zurück. Die Darstellung der Mitochondrien gelingt dann meist immer. Allerdings haben diese beiden Methoden den Nachteil, dass sie andere Färbungen kaum oder überhaupt nicht erlauben (Abb. 1*a*), von histochemischen Reaktionen ganz zu schweigen.

Vergleicht man aber die Resultate der Fixierungsmethoden von Champy und Regaud untereinander, wobei die eine dem Typus der Osmiumsäure, die andere dem Typus des Bichromat entspricht, so sind die Ergebnisse fast immer verschieden. Nach der Regaud'schen Fixierung z. B. sind die Mitochondrien in der Niere in überwiegender Zahl stäbchenförmig (Abb. 1*b*, *c*), nach Osmiumfixierung erscheinen die Mitochondrien als kleine Körnchen oder grössere Kugeln (Abb. 1*e*). Nur sehr selten sieht man sie stäbchenförmig. Bei genauerer Untersuchung kann man allerdings feststellen, dass die Form der Mitochondrien abhängig ist von der Lage der Zellen im Gewebeblock. Ganz oberflächlich gelegene Zellpartien enthalten stäbchenförmige, während einige tiefer liegende körnchenförmige Mitochondrien enthalten (Abb 1*f*). Dies hängt mit der langsamen Eindringtiefe der Osmiumsäure zusammen, wodurch sich postmortale Veränderungen noch abspielen können, bevor das Fixierungsmittel die Zellen erreicht hat. Nach ZOLLINGER (1950) ist Mitochondrien-Zerfall und -Abkugelung ein Ausdruck anoxämischen Geschehens in überlebenden Mitochondrien. Andere osmiumhaltige Fixierungsmittel, wie etwa das von BAKER (1957) angegebene Herrmann'sche Fixierungsgemisch, ebenso gepufferte Osmiumsäure nach Pallade, wie sie für die Elektronenmikroskopie verwendet wird, zeigen gleiche Effekte (Abb. 1*g*). Auch aus Arbeiten von BAHR (1960) geht hervor, dass trotz osmotische Verhältnisse verbessernder Zusätze zu Osmiumsäuregemischen Mitochondrienveränderungen in tieferen Blockschichten nicht verhindert werden können.

Zur Fixierung der Nierenmitochondrien hat sich uns ganz ausgezeichnet das Helly'sche Gemisch bewährt, welches nicht zu den eigentlichen Mitochondrienfixierungsmitteln zählt. Die in der Abb. 1*d* dargestellte Helly-fixierte Niere zeigt deutlich gezeichnete, schöne stäbchenförmige Mitochondrien, die teilweise sogar fast bessere Erhaltung aufweisen, als das nach Regaud fixierte Nierenmaterial.

Bei vergleichsweiser Anwendung von osmium- und bichromathaltigen Fixierungsmitteln auf die *Leber* kann ähnliches beobachtet werden. Während REGAUD wiederum sehr feinkörnig die Mitochondrien erhält, die sogar oft als kommaförmige Gebilde zur Darstellung kommen (Abb. 2*a*), verquellen die Mitochondrien in den osmiumfixierten Leberstückchen; sie erscheinen als relativ plumpe Kugeln (Abb. 2*e*). Nicht selten enthalten diese Kugeln eine

kleine, aber deutlich sichtbare Blase (Abb. 2*e* B). Bei der Leber allerdings versagt das Helly'sche Gemisch. Die in den Leberzellen besonders reichlich enthaltenen Ribonukleotide bilden Schollen, welche sich überaus stark mit Eisenhaematoxylin (aber auch mit anderen Färbemitteln) anfärben, wodurch die Mitochondrien vollständig überdeckt werden (Abb. 2*b*). Selbst durch prolongierte Differenzierung lässt sich keine Mitochondriendarstellung erzielen, weil die Mitochondrien immer eher entfärbt sind, als die Schollen. Das zur Mitochondrienfixierung empfohlene Formol verschiedener Konzentration (ROMEIS 1948), sowie Calcium-Formol (BAKER 1944) ergeben Gleiches, insbesondere, wenn die Schnittdicke 2—3 μ übersteigt (Abb. 2*d*). Durch diese gute Erhaltung und Mitfärbung der Ribonukleotide ist die Verwendung dieser Fixierungsmittel, welche sowohl Darstellung von Mitochondrien, als auch Färbungen und bestimmte histochemische Reaktionen in Schnitten von einem einzigen Gewebsblock erlauben würden, für bestimmte Gewebe ausgeschlossen.

Von dem störenden Einfluss der Ribonukleotide auf die Mitochondriendarstellung ausgehend, hat BHARADWAJ (1959) eine sowohl interessante, wie klug durchdachte Technik entwickelt. Dazu werden die Gewebe mit einem Sublimat-Formol-Gemisch fixiert, was alle Zellanteile, einschliesslich der Mitochondrien gut erhalten soll. Zur Mitochondriendarstellung werden dann die Schnitte vor der Färbung mit Ribonukleinsäure-Extraktionsmitteln behandelt, damit sich diese nicht mehr mitfärben. Bei der Nachuntersuchung dieser Angaben wurde festgestellt, dass die angegebenen Extraktionsmittel — zu denen übrigens einige gehören, welche nach PEARSE (1959) zur RNS-Extraktion nur sehr wenig geeignet sind — nicht den gewünschten Erfolg bringen. Die durch die Sublimat-Formol-Fixierung sehr starken Nukleotidschollen in der Leber lassen sich durch KOH, Trichloressigsäure, Mc Ilvaine-Puffer und Ribonuklease nicht genügend entfernen und färben sich trotzdem mit. Erst nach Anwendung schärferer Extraktionsmittel (HCl, $HClO_4$, Schneider-Extraktion) wird die Färbung der Nukleotidschollen durch Eisenhaematoxylin nach Regaud verhindert. Die Abb. 2*g* zeigt deutlich den Effekt prolongierter Perchlorsäure-Extraktion, wodurch nun die Mitochondrien deutlich sichtbar werden. Diese Mitochondrien sind aber teilweise sehr stark verquollen und abgekugelt, wobei das Bild nicht, wie BHARADWAJ angibt, an das der Regaud-Fixierung erinnert, sondern vielmehr an das einer (schlechten) Osmium-Fixierung. Noch viel deutlicher zeigen die Nierenmitochondrien die Abkugelungserscheinungen (Abb. 3*c*).

Der an sich vorzügliche Gedankengang von BHARADWAJ wurde weiter verfolgt und die Technik in unserem Laboratorium modifiziert. Als Fixierungsmittel verwenden wir das für zahlreiche Färbungen und für viele histochemische Reaktionen geeignete Formol und Formol-Calcium. (Fixierung bei 4° C.). Ribonukleitode werden dadurch aber so gut erhalten, dass eine Mitochondriendarstellung — zumindest in RNS-reichen Organen — unmöglich gemacht wird.

Insbesondere dann, wenn die verschiedenen Formol-Lösungen mit Zucker versetzt werden; Zuckerzusätze verwenden wir für bestimmte histochemische Reaktionen mit Erfolg, weil durch Anpassung an osmotische Verhältnisse Substanzenverschiebungen hintangehalten werden. (Über die Formol-Zucker-Fixierung wird an anderer Stelle eingehend berichtet.)

Extraktionsversuche an Schnitten dieser verschieden fixierten Gewebe haben ergeben, dass die unerwünschte Mitfärbung der Ribonukleotide durch deren Extraktion verhindert werden kann. Allerdings kommt man zu diesem Zweck mit den sonst für histochemische RNS-Untersuchungen (Brachet-Test) üblichen milden und kurzen Extraktionen nicht aus. Dazu müssen vielmehr die kräftigsten Extraktionsmittel angewendet werden, wobei die Einwirkungsdauer sowohl vom nativen RNS-Reichtum des Zellmaterials, als auch von dessen guter Erhaltung durch Fixierungsmittel abhängt. Aber selbst in Formol-Calcium-Zuckergemischen fixierte Lebergewebe können damit ausreichend extrahiert werden (Abb. 2*h*), wonach sich die Mitochondrien sehr gut darstellen lassen. In der Niere gelingt auf diese Weise die Mitochondriendarstellung ebenfalls sehr gut. Wenn zwar in diesem Organ die Färbung der Mitochondrien nach Formolfixierung an und für sich keine besondere Schwierigkeit bedeutet, weil die Zellen weniger RNS enthalten, so bietet die Anwendung von Extraktionsmitteln vor der Färbung zweifellos Vorteile. Es erübrigt sich nämlich, ganz dünne (unter 4 μ dicke) Schnitte herzustellen und überdies fällt die Mitochondrienfärbung sowohl in ganz dünnen, wie auch in dickeren Schnitten gleichmässiger aus. In üblich behandelten Schnitten sind nämlich immer einzelne Nierentubuli noch zu wenig differenziert, wobei das Gebiet um die Mitochondrien eine einzige schwarze Farbmasse bildet (Abb. 3*a*, M), während in anderen, danebenliegenden Tubuli die Mitochondrien sehr gut dargestellt oder sogar schon überdifferenziert sind. (Abb. 3*a*, U). Dieser auf dem ungleichmässig grossen RNS-Gehalt der einzelnen Zellen in den Tubuli beruhende Färbungseffekt zwingt, mehrere verschieden stark differenzierte Schnitte herzustellen, damit die Mitochondrien sämtlicher Nierenabschnitte untersucht werden können. Im verstärkten Masse trifft dies zu, wenn die Nieren etwa für histochemische Untersuchungen mit Formol-Calcium oder Formol-Zuckergemischen fixiert wurden (Abb. 3*d*—*f*). Wie diese Abbildungen aber zeigen, erfolgt jedoch die Anfärbung der Mitochondrien nach der Extraktion gleichmässig stark, wodurch eine einheitliche Differenzierung ermöglicht wird. Es darf aber nicht verschwiegen werden, dass durch sehr lange Extraktionsbehandlung die Färbbarkeit der Leber und Nierenmitochondrien leiden kann, d. h., dass es sehr schwer ist, den Moment richtiger Differenzierung (auch mit ganz verdünnten Eisenalaunlösungen) zu erfassen. Hier hat sich die Nachchromierung der Schnitte mit 3% Bichromat (12—24 Std.) nach der Nukleinsäure-Extraktion sehr bewährt; die Färbbarkeit der Mitochondrien wird dadurch wieder hergestellt.

Was die Morphologie der Mitochondrien angeht, so zeigt der Vergleich der Abb. 3*b* und 3*f* mit 3*c*, dass die Stäbchenform der Nierenmitochondrien durch Formol erhalten bleibt, während das von BHARADWAJ (1959) vorgeschlagene Sublimat-Formol-Gemisch eine Abkugelung der Mitochondrien verursacht. Gleiches gilt für die Leber (Vgl. Abb. 2*g* mit 2*a*), wozu hier noch eine sichtbare Mitochondrien-Abnahme in den Sublimat-Formol-fixierten Lebern kommt. Die gute Mitochondrienerhaltung durch Formol und deren anschliessende leichte Darstellbarkeit nach Ribonukleinsäure-Extraktion der Schnitte liefert sowohl in beiden Organen Ergebnisse, welche an die der klassischen Mitochondriendarstellung von REGAUD herankommen. (Siehe Abb. 1*b*, *c* und 2*a*).

Dieses Resultat ist an und für sich nicht verwunderlich, da nach ROMEIS (1948) Formol die Mitochondrien gut fixiert. Allerdings ist die Formolfixierung abero nur bei Geweben mit geringem RNS-Gehalt erfolgversprechend. Es ist deshalb zweifellos ein Verdienst von BHARADWAJ, durch seine Idee der RNS-Extraktion die Mitochondrienfärbung in RNS-haltigen Organen zu ermöglichen. Es wird durch diesen Vorgang nichts anderes erreicht, als was sich bei der Fixierung nach Regaud im Gewebe abspielt: Entfernung der Nukleinsäuren, die durch Bichromat nicht fixiert und dann extrahiert werden. Daraus erwächst aber für die Histotechnik ein bedeutender Vorteil. Einerseits werden zeitraubende Prozeduren und parallel laufende Fixierungen überflüssig, anderseits ist es möglich, an Schnitten ein und desselben Blockes auch andere Färbungen und sogar histochemische Untersuchungen durchzuführen, was für sehr viele Fragestellungen von Bedeutung ist.

In der Tafel 4 sind einige Ergebnisse histochemischer Reaktionen an verschieden fixierten Nierenstückchen gleicher Herkunft zusammengestellt. Vergleicht man lediglich die Verteilung PAS-positiven Materials in den Tubuli contorti I, dann kann man sehen, dass die übliche Formol und Formol — Calcium-Fixierung, aber auch das Formol-Sublimat nach BHARADWAJ (Abb. 4*a*, *b*, *c*) dieses in Hauptsache nur im Bereich der Bürstenbesätze erhält. Nach Formol-Calcium bzw. Formol-Sublimat kommen noch zusätzlich einzelne PAS-positive Körnchen im Cytoplasma der Tubuluszellen zur Darstellung. Nach Zusatz von Rohrzucker zum Formol hingegen enthalten die Lumina eine homogene Substanz; auch die Bürstenbesätze geben eine wesentlich stärkere PAS-Reaktion (Abb. 4*e*). Mit starker Vergrösserung ist besonders gut sichtbar (Abb. 4*f*), dass die Tubuluszellen reichlich PAS-positive Körnchen enthalten und dass das an der Zelloberfläche gelegene PJS-positive Material feine (intra- oder interzelluläre) strichartige Fortsätze gegen die Zellen hin aufweist. Dieser Befund gleicht weitgehend Bildern, wie sie in sehr gut erhaltenen gefroren-getrockneten Nieren mit der PJS-Reaktion erzielt werden (MAYERSBACH 1956). Aber auch die in Tubuluszellen nicht immer gut zu praeservierbaren Ribonukleotide erscheinen nach Rohrzuckerzusätzen zu Formol oder

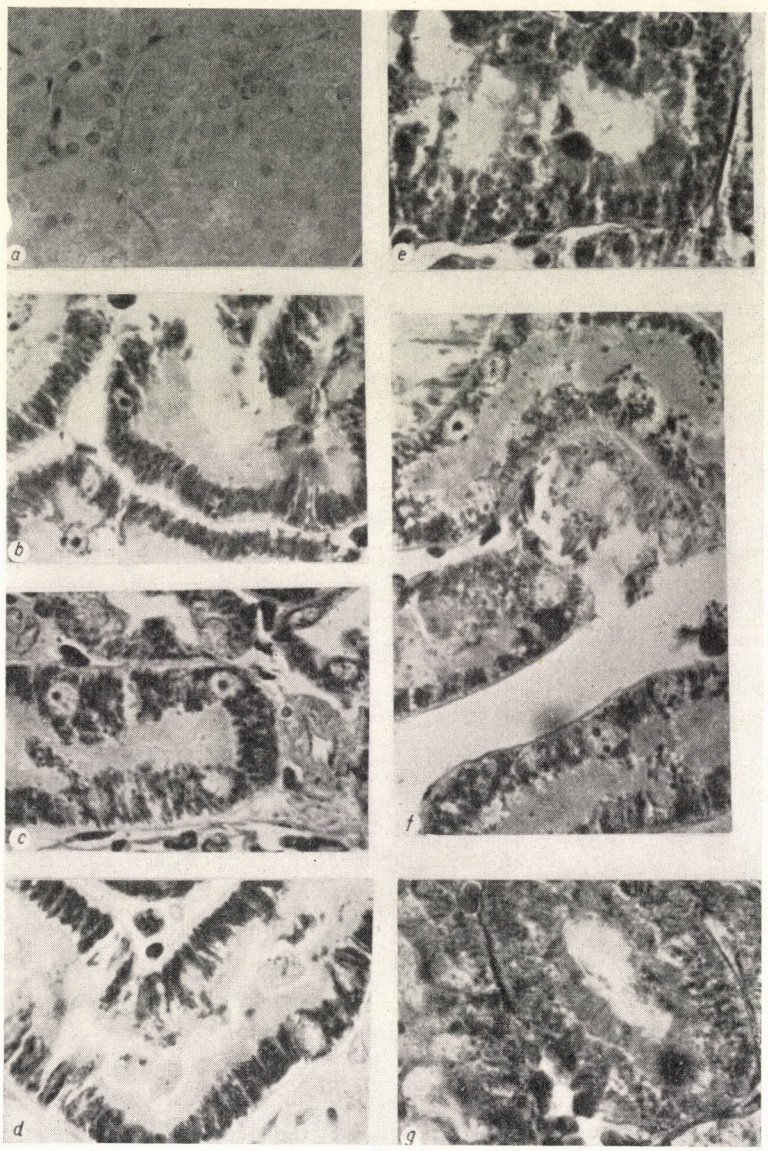


Abb. 1. Niere einer Ratte bei verschiedener Fixierung. *a:* Regaud, Färbung: Haematoxylin-Eosin. Die Abbildung zeigt deutlich, dass die Färbbarkeit der Gewebe durch die Regaud'sche Fixierung vermindert ist. Mikrofotografien lassen sich deshalb fast nicht herstellen und liefern »flaue« Bilder. *b, c:* Mitochondrienfärbung mit Eisenhaematoxylin. Die Mitochondrien erscheinen nach Regaud-Fixierung entweder als feine Stäbchen oder Körnchenreihen *(c)* in den Tubuli contorti I. *d:* Gleiche Niere nach Helly-Fixierung und Färbung mit Eisenhaematoxylin. Die Mitochondrien erscheinen als deutliche Stäbchen. *e:* Osmiumsäure-Fixation nach CHAMPY. Die Mitochondrien der Tubuli contorti I sind in der überwiegenden Zahl abgekugelt. *f:* Champy-Fixierung. Oberflächlich im Gewebeblock liegende Zellanteile (untere Bildhälfte) enthalten stäbchenförmige, tiefer gelegene kugelige Mitochondrien (obere Bildhälfte). *g:* Mitochondrien-Fixierung nach BAKER (1957). (Herrmann'sches Gemisch und Nachosmierung). Mitochondrien kleinkörnig zerfallen

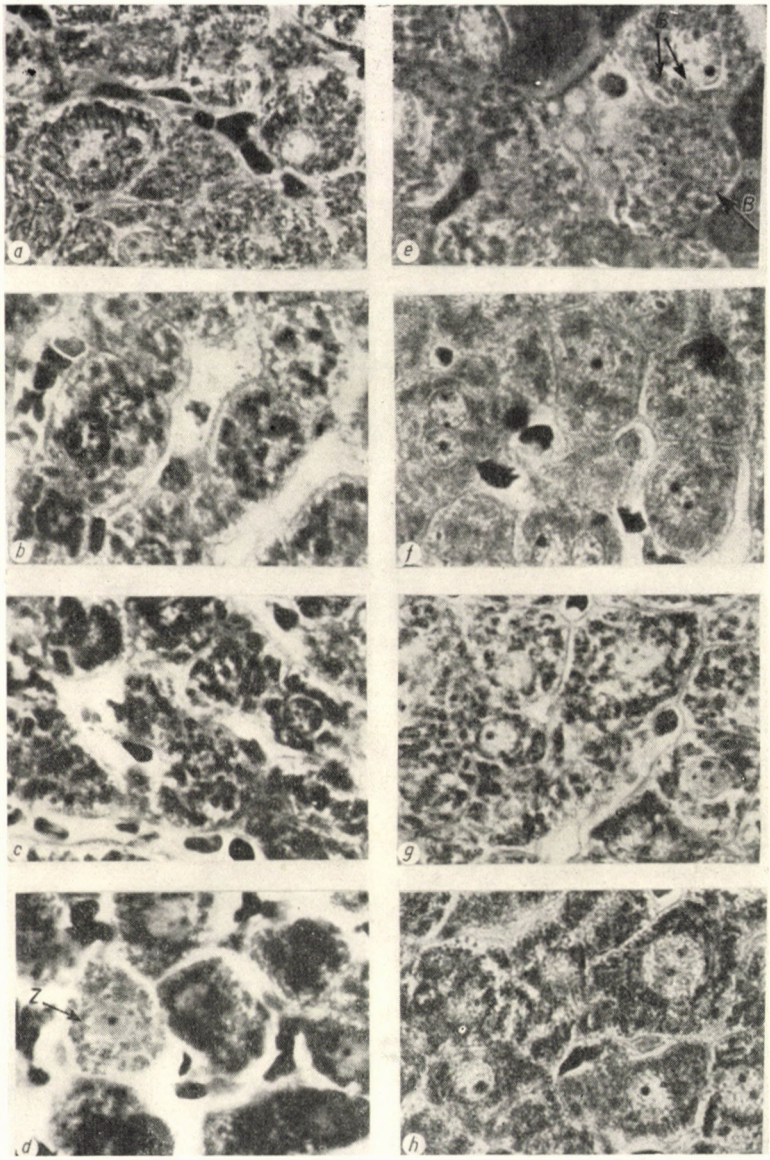


Abb. 2. Leber einer Ratte bei verschiedener Fixierung. *a:* Regaud-Fixierung. Die Mitochondrien sind feinkörnig oder fein-stäbchenförmig. *b:* Helly-Fixierung. Ribonukleotidschollen werden durch Eisenhaematoxylin stark gefärbt, so dass keine Mitochondrienfärbung mehr möglich ist. *f:* Trotz Extraktion der RNS mit HCl bleiben Ribonukleotide im Helly-fixierten Gewebe noch färbbar. Ihre verminderte Färbbarkeit erlaubt jedoch schon annähernd Mitochondrien darzustellen. *c:* Formol—Sublimat-Fixierung nach BHARADWAJ. Starke Anfärbung von Ribonukleotidschollen durch Eisenhaematoxylin. Mitochondrien können nicht dargestellt werden. *g:* Formol-Sublimat, Extraktion der Schnitte 12 Std N—HCl. Durch Entfernung der RNS werden Mitochondrien darstellbar, welche der Fixierung entsprechend als gröbere Kugeln erscheinen. *d, h:* Fixierung mit Formol—Calcium-Zuckergemisch. *d:* Ohne Extraktion. Durch die gute Ribonukleotiderhaltung und deren starke Mitfärbung können Mitochondrien nur in RNS-freien Zellen (Z) dargestellt werden. *h:* Nach Extraktion der Ribonukleotide mit N—HCl. Mitochondrien in allen Zellen darstellbar. Ihre Form ist kleinkörnig oder fein-stäbchenförmig. *e:* Champy-Fixierung. Mitochondrien durchwegs grosskugelig, einige enthalten Bläschen (B)

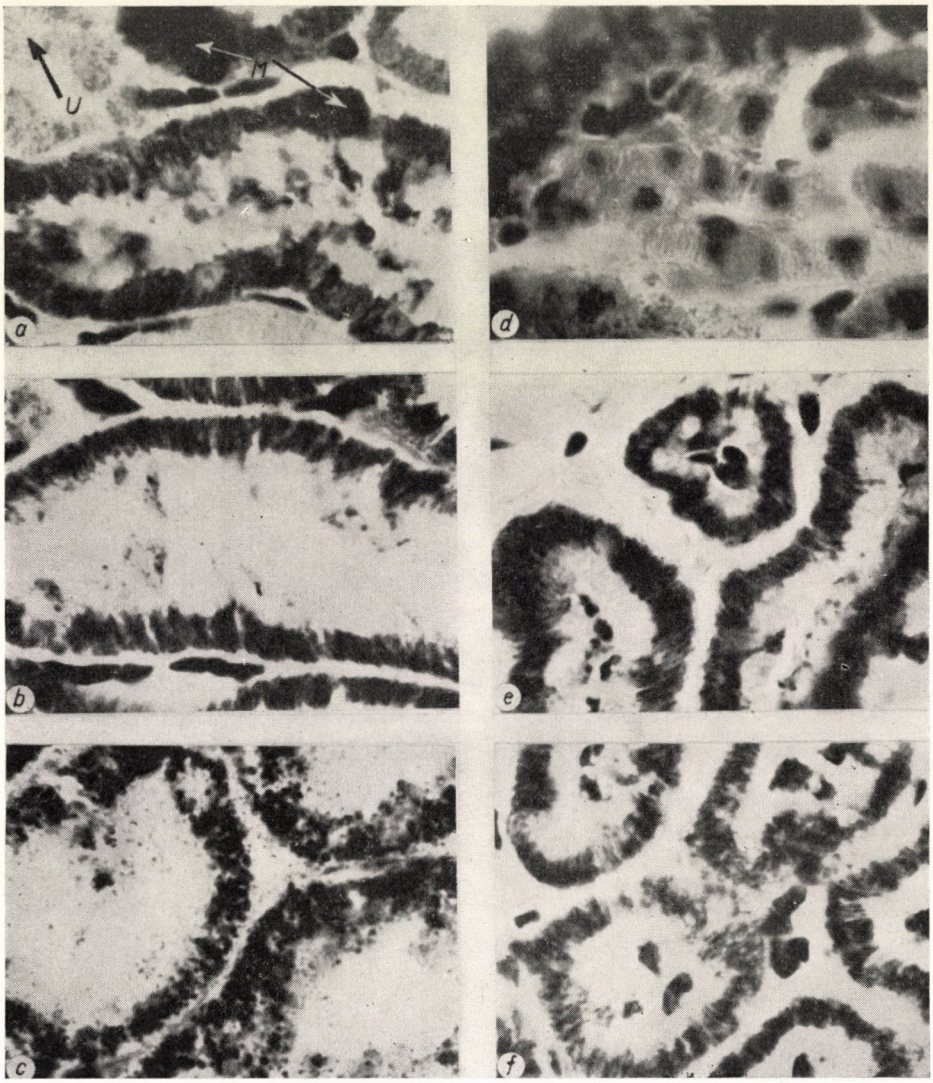


Abb. 3. Niere einer Ratte bei verschiedener Fixierung. *a:* Formol-Fixierung. Durch den verschieden starken RNS-Gehalt erfolgt die Differenzierung der Ribonukleotide ungleichmässig. Einzelne Zellen bzw. Zellgruppen enthalten noch Farbmassen (M), andere sind zur Mitochondriendarstellung richtig differenziert und schliesslich gibt es noch überdifferenzierte (U) Tubuli, in denen die Mitochondrien schon fast wieder entfärbt sind. *b:* Wie *a*, jedoch Schnitt extrahiert mit N—HCl. Gleichmässige Anfärbung der Mitochondrien, die stäbchenförmig sind. *c:* Gleiche Niere nach Sublimat—Formol-Fixierung (BHARADWAJ) und Extraktion mit N—HCl. Die Differenzierung des Eisenhaematoxylins erfolgt in allen Tubuli gleichmässig. Die Mitochondrienform ist jedoch durch die Fixierung grobkugelig. *d, e, f:* Fixierung mit Formol—Calcium-Zucker. *d:* Ohne Extraktion. Durch die gute RNS-Erhaltung dieses Gemisches sind die Differenzierungsunterschiede stärker als bei reiner Formol—Calcium-Fixierung. *e:* Unvollständige. *f:* Vollständige Extraktion der RNS mit N—HCl

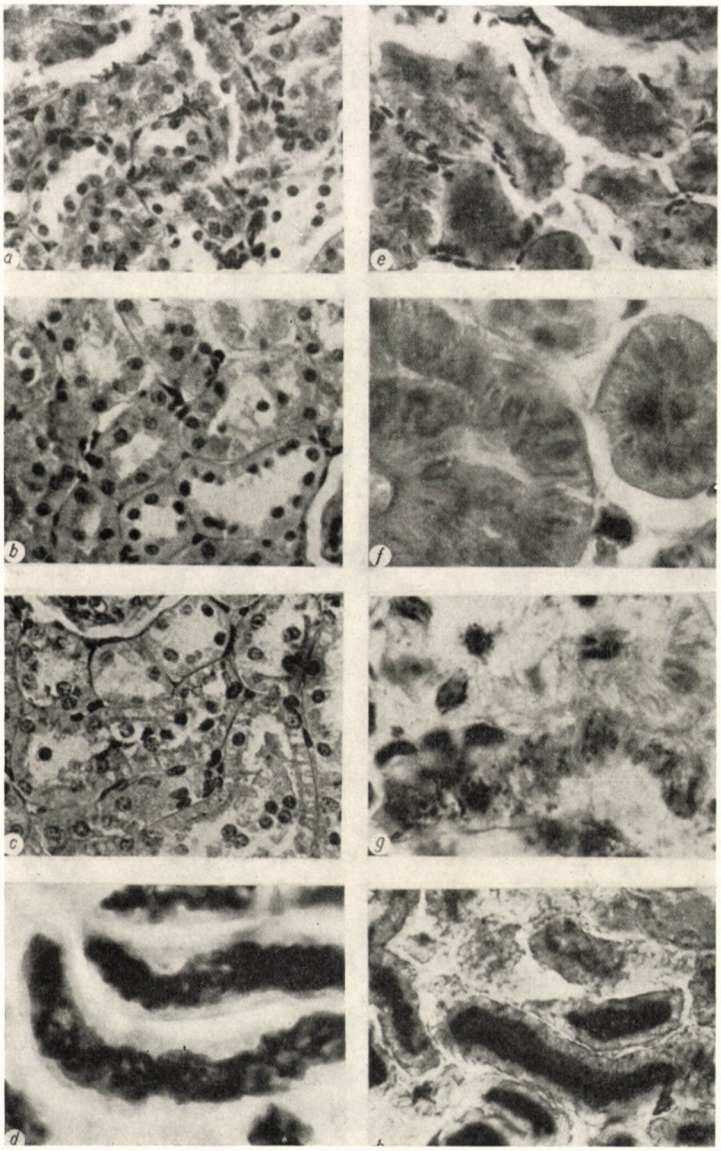


Abb. 4. Niere einer Ratte bei verschiedener Fixierung. Beispiele histochemischer Reaktionen. *a, b, c, e, f:* PJS-Reaktion, Haemalaun. *a:* Formol—Calcium. Nur Bürstenbesätze und feine Körnchen im Cytoplasma erscheinen. Schiff-positiv. *b:* Formol. Nur Bürstenbesätze, aber fast keine Körnchen des Cytoplasmas enthalten PJS-positives Material. *c:* Formol—Sublimat. Bürstenbesätze und gelegentlich in einzelnen Tubuli schwach PJS-positiver Inhalt. *e:* Formol—Calcium—Zucker. Bürstenbesätze und zahlreiche feine Körnchen im Cytoplasma stark PJS-positiv. Auffällig gute Erhaltung einer Schiff-positiven Substanz im Tubulus-Lumen. *f:* Wie *e*, jedoch bei stärkerer Vergrösserung. Man sieht deutlich strichartige Schiff-positive Fortsätze aus dem Bürstenbesatzbereich in die Tiefe der Zellen hineinragen. *g:* Formol—Calcium—Zucker-Fixierung, Darstellung der Ribonukleotide mit gepuffertem Methylenblau nach Pischinger. *d, h:* Darstellung der alkalischen Phosphatase nach GOMORI (β-Glycerophosphat). *d:* Nativer Gefrierschnitt inkubiert 15 Min. 37 C°. *h:* Formol—Calcium—Zucker-Fixation. Schnitt inkubiert bei Zimmertemperatur 5 Min.

Formol – Calcium als Filamente. Von besonderem Vorteil ist die Substanzerhaltung für histochemische Fermentreaktionen. Aus dem Vergleich der Abb. 4*d* und 4*h* geht eindeutig hervor, dass durch den Rohrzuckerzusatz die Reaktion für alkalische Phosphatase nach GOMORI stärker ausfällt, als in nativen Gefrierschnitten. Dies äussert sich in wesentlich kurzeren Inkubationszeiten (der Schnitt der Abb. 4*h* wurde nur 5 Min bei Zimmertemperatur, der Schnitt der Abb. 4*d* hingegen 15 Min bei 37° C inkubiert). Auch die Lokalisation ist viel schärfer und die Fermente bleiben selbst an jenen Orten erhalten, die mit üblicher technik fermentfrei gefunden werden. Dazu gehören die feinen basalen Streifen und Cytoplasmakörnchen; gleiche Lokalisation der Phosphathase konnte durch eine sehr entwickelte, histochemisch-elektronenmikroskopische Technik von MÖLBERT (1960) in Nierenzellen beobachtet werden. Nach Formol—Zucker-Fixation ist sogar in paraffineingebettetem Material die Darstellung von Adenosintriphosphatase (Methode: PADYKULA — HERRMANN, 1956) in ausreichender Menge möglich. Dies muss als besondere Leistung der Substanzerhaltung durch den Zuckerzusatz gewertet werden, da sich dieses Ferment selbst in Gefrierschnitten nicht immer leicht darstellen lässt und nach NOVIKOFF (1960) durch Fixation sehr leicht geschädigt wird. Die Formol—Zucker-Fixation wurde bereits für Untersuchungen über das Verhalten verschiedener Fermente in der Mäuseniere nach Alloxangaben (ERGOCACK und BUCHER, 1960) mit Erfolg angewendet.

Material und angewandte Technik

Material: Leber und Nieren von weissen Ratten; für Vergleichsuntersuchungen dienten nur Organe von jeweils einem einzigen Tier.

Fixierungen: Regaud und Champy (nach ROMEIS 1948); Herrmann'sches Gemisch mit Nachosmierung nach BAKER (1957); gepufferte Osmiumsäure nach PALLADE; Formol—Sublimat nach BHARADWAJ (1959); Neutrales Formol (4%) und Formol—Calcium nach BAKER (1954); Formol und Formol—Calcium mit Rohrzuckerzusatz (0,88 M). Sämtliche Fixierungen wurden bei 4° C durchgeführt.

Übliche Paraffineinbettung, Schnittdicken 5—8 μ.

Nukleinsäure—Extraktion: a) nach BHARADWAJ:

1% KOH, 1 Std bei Zimmertemperatur,
Mc Ilvaine und Phosphatpuffer (pH 7, 0,2 M) 2—8 Std bei 37° C.
5% Trichloressigsäure 12 Std. 37° C und
0,1% Ribonuklease.

b) eigene Modifikation:

Perchlorsäure 10% 2—15 Std., 60° C.
Salzsäure, N—HCl 2—20 Std., 60° C.
Trichloressigsäure 10% 2—10 Std., 90° C. (nicht sehr gut geeignet)

c) eventuell Nachchromierung mit Kaliumbichromat 3% 12—24 Std.

Um Abschwimmen der Schnitte während der Säurebehandlung zu verhindern, wurden die Schnitte nach LIPP celloidiniert.

Färbung: Regaud'sches Eisenhaematoxylin nach ROMEIS; Farbstoff jedoch künstlich durch Natriumperjodat-Zugabe gereift (0,1 gr pro 0,5 gr Haematoxylin).

Beizen der Schnitte in 5% Eisenalaun-Lösung 24 Std. 37° C.
Färben 12 Std. bei Zimmertemperatur.
Differenzieren in 2,5% Eisenalaun.
Alkoholreihe, Kanada-Balsam.

Zusammenfassung

Es ist für histologische Untersuchungen von Mitochondrien in Leber und Niere dem Regaud'schen Fixierungsmittel der Vorzug zu geben. Durch dessen rasche Penetration erfolgt die Fixierung der Gewebe noch bevor postmortale Veränderungen der Mitochondrien stattfinden können. Die für das Gelingen einer Osmiumfixierung notwendigen papierdünnen Gewebsblöcke können aus verschiedenen Gründen nicht immer hergestellt werden und mit nur oberflächlich gelegenen, gut erhaltenen Schichten ist meist nicht gedient. Selbst in nur 2—3 mm dicken Gewebsblöcken treten infolge der langsamen Eindringgeschwindigkeit der Osmiumsäure starke postmortale Veränderungen durch Zerfall und Abkugelung der stäbchenförmigen Nierenmitochondrien auf, während diese in der Leber mit Verquellung und Blasenbildung der Mitochondrien einhergehen.

Das von BHARADWAJ angegebene Sublimat—Formol-Gemisch eignet sich nicht sehr zur naturnahen Erhaltung der Mitochondrien, da es ebenfalls deren Umwandlung in Kugelform verursacht. Jedoch ist die von BHARADWAJ vorgeschlagene Extraktion der Ribonukleinsäuren, welche die Eisenhaematoxilinfärbung stören, eine hervorragende Methode, um in Formol, Formol—Calcium und in Formol—Zucker fixierten RNS-reichen Zellen die Darstellung der Mitochondrien zu ermöglichen. Allerdings sind nur sehr kräftig wirkende Extraktionsmittel effektvoll, wobei die Extraktionszeit — abhängig vom Organ — sehr lang sein muss. Eine eventuelle Färbbarkeitsabschwächung der Mitochondrien durch forcierte RNS-Extraktion kann man durch Nachchromierung der Schnitte wieder rückgängig machen. Hiermit ergibt sich die Möglichkeit, in Schnitten von einen einzigen Gewebeblock sowohl Mitochondrien darzustellen, als auch Färbungen und bestimmte histochemische Reaktionen durchzuführen, was zweifellos neben der Zeit- und Arbeitsersparnis sehr wünschenswert und für manche Vergleichsstudien fast unerlässlich ist.

LITERATUR

1. ANDREWS, W.—JOHNSON, H. (1956): Staining Mitochondria in fixed blood smears. Stain tech. *31*, 21. — 2. BAHR, G. F.—HUGSTRÖM, L. (1960): Penetration rats of osmium tetroxyde with different fixation vehicles. Histochemie II. 1—4. — 3. BAKER, R. (1944): Quarterly J. of Microsc. Science *85*, Part 1. — 4. BAKER, R. (1957): The effect of acetic acid on cytoplasmic inclusions. Quarterly J. of Microsc. Science *98*, Part 4. — 5. BHARADWAJ, T. B.—LOVE, R. (1959): Staining mitochondria with hematoxylin after formalin-sublimate-fixation; a rapid method. — 6. CHANG, J. P. (1956): Staining mitochondria in frozen, dried tissues. Exper. Cell. Res. *11*, 643. — 7. ERGOCAK—BUCHER, O. (1960): Im Druck. — 8. FUJII, S. (1956): Methode zur selektiven und sehr distinkten Darstellung der Mitochondrien durch Versilberung. Arch. Hist. Jap. *11*, 303. — 9. HARMANN, J. W. (1950): The selective staining of mitochondria. Stain tech. *25*, 69. — 10. HOLMGREN, H. (1931): Beitrag zur Kenntnis der Leberfunktion. Z. Mikr. Anat. Forsch. *24*, 632. — 11. LADMANN, A. J.—MITCHELL, H. A. (1957): The demonstration of selective staining of mitochondria in the rats retina by means of Bodians Protagol-method as seen with the light- and electron microscope. Anat. Rec. *127*, Am. As. Anat. — 12. LIPP, W. (1954): Histochemische Methoden. Oldenburg-Verlag, München. — 13. MAYERSBACH, H. (1956): Proteinmetabolismus in Leber und Niere. Verh. Anat. Ges. *53*, 274—284. — 14. MÖLBERT, E.—DUSPIVA, F.—DEIMLING, O. (1960): Die histochemische Lokalisation der Phosphatase in der Tubulus-Epithel-Zelle der Mäuseniere im elektronenmikroskopischen Bild. Histochemie II. *5*. — 15. NOVIKOFF, A. B.—WOO-JUNG, CHIN—DRUCK, J. (1960): Cold acetone fixation for enzyme localisation in frozen sections. J. Hist. Cytochem. *8*, 37. — 16. PEARSE, A. G. E. (1959): Histochemistry, theoretical and applied. II. Edition, Churchill, London. — 17. ROBERTS, S. H. (1949): Changes in mitochondrial forms. Anat. Rec. *104*, 163. — 18. ROMEIS, B. (1948): Mikroskopische Technik. Oldenburg-Verlag, München. — 19. ZOLLINGER, H. U. (1950): Über hyalintropfige Veränderung als Ausdruck von Eiweißspeicherung. Schw. Z. Path. und Bact. *13*. 145.

ПРОБЛЕМЫ ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО ВЫЯВЛЕНИЯ МИТОХОНДРИЙ

Х. МАЙЕРСБАХ

При гистологических исследованиях митохондрий в печени и почках лучше всего оправдывался фиксирующий раствор Рего. Благодаря быстрому проникании этого раствора фиксация тканей происходит до возникновения посмертных изменений митохондрий.

Необходимых для удачной осмиевой фиксации весьма тонких тканевых кусочков, по разным причинам не всегда удается получить и расположенные только поверхностно, хорошо сохраненные слои в большинстве случаев недостаточны. Даже в тканевых кусочках толщиной только 2—3 мм, возникают вследствие медленного проникновения осмиевой кислоты значительные посмертные изменения из-за распада и округления палочковидных митохондрий почки, в то время как в печени эти изменения сопровождаются набуханием и образованием пузырьков митохондрий.

Предложенная *Барадваем* смесь сулемы с формалином не очень пригодна для сохранения естественной формы митохондрий, так как она также обусловливает их превращение в шаровидную форму. Однако, предложенное *Барадваем* экстрагирование рибонуклеиновых кислот, мешающих окрашиванию железным гематоксилином, представляет превосходный метод для выявления митохондрий, в фиксированных формалином, смесью формалина и кальция или смесью формалина и сахара, богатых рибонуклеиновой кислотой клетках. Правда, что только весьма сильные экстрагирующие вещества оказались эффективными, причем время экстрагирования — в зависимости от органа — должно быть очень продолжительным. Возможное уменьшение окрашиваемости митохондрий, вызванное форсированным извлечением рибонуклеиновой кислоты можно восстановить дополнительным хромированием срезов. Благодаря этому предоставляется возможность выявить не только митохондрии в срезах из одного единственного тканевого кусочка, но и провести окрашивания и определенные гистологические реакции, что несоменно — наряду с экономией времени и труда — является весьма желательным и даже для некоторых сравнительных исследований почти необходимым.

LE PROBLÈME DE LA REPRÉSENTATION HISTOLOGIQUE DES MITOCHONDRIES

H. MAYERSBACH

Pour l'examen histologique des mitochondries dans le foie et le rein le matériel de fixation de Regaud et celui de choix. Par sa pénétration rapide la fixation des tissus survient encore avant que les changements postmortals des mitochondries puissent survenir. Pour la réussite d'une fixation d'osmium les blocs de tissus doivent être mince comme du papier, ce que, pour de différentes raisons ne peut pas toujours être réalisé, et des couches superficielles bien conservées sont le plus souvent insuffisantes. Même dans les blocs de tissu d'une épaisseur de seulement 2—3 mm de forts changements postmortals surviennent, due a la pénétration lente de l'acide osmique, tandisque par ce fait les mitochondries dans le foie montrent un engonflement et une formation vésiculeuse.

Le composé sublimat-formol décrit par BHARADWAJ ne se prête pas trop à la conservation fidèle des mitochondries, puisqu'il cause également une transformation globiforme. BHARADWAJ propose également l'extraction des acides ribonucléaires, qui perturbent la coloration ferro-hématoxyline, ce qui est une méthode excellente pour représenter des mitochondries dans des cellules riches en ARN fixées dans du formol, formol-calcium et formol-sucre. Cependant ce ne sont que des matériels d'extraction d'un effet très vigoureux qui sont efficaces et la durée de l'extraction-dépendant de l'organe doit être bien prolongée. Un affaiblissement éventuel de la coloration des mitochondries due à l'extraction forcée de l'ARN peut-être corrigé par la coloration supplémentaire des coupes. Voilà donc une possibilité pour représenter des mitochondries dans les coupes d'un seul bloc de tissu, tout en effectuant aussi des colorations et certaines réactions histochimiques, — ce qui est sans doute très désirable du point de vue d'épargne de temps et de travail. Cet avantage est donc presque indispensable dans des études comparatives.

Dr. H. MAYERSBACH, Institut d'Histologie et d'Embryologie, Université de Lausanne, Suisse

Department of Histology and Embryology, University Medical School, Budapest
(Director: Prof. I. TÖRŐ)

STUDIES ON FEEDING AND DIGESTION IN PROTOZOA II. FOOD VACUOLE CYCLE IN TETRAHYMENA CORLISSI

M. MÜLLER and P. RÖHLICH

(Received July 16, 1960)

Introduction

Holozoic feeding, *i. e.* intake and intracellular digestion of particulate food, living organisms or non living material, is common among the protozoa. Our knowledge of this process as shown by the thorough review of KITCHING [5], is rather incomplete and scanty in comparison to the rapid progress made in several other fields of protozoan physiology in the last two decades. Among others the absence of papers concerning the electron microscopy of the protozoan digestion is apparent. Recent papers on the fine structure of protozoa contain micrographs revealing details of food vacuoles in several groups (Rhizopoda [1, 4, 7, 15], Sporozoa [19, 20], Ciliata [16] etc.) but only one comprehensive paper has come to our attention which discusses the complete food vacuole cycle [17, 18]. This work on *Pelomyxa* emphasizes the changes in the food organisms *(Paramecium* or *Tetrahymena)* and in the membrane of the food vacuole.

For some years we have been studying certain aspects of protozoan digestion with the primary aim to obtain information on the mechanism of intracellular breakdown of the materials ingested [11, 12, 14]. The histophagous *Tetrahymena corlissi* [21] proved to be a favourable organism in this work. The food intake and digestion in histophagous ciliates has not been discussed in the literature in spite of the great possibilities they offer in the study of protozoan feeding [9]. We have been studying these processes both by light and electron microscopy. In the present paper only the electron microscopic data will be presented. Light microscopic findings and a general discussion will be presented in a forthcoming publication. A short abstract of this work has been reported elsewhere [13].

Materials and preparation

Tetrahymena corlissi THOMPSON, strain W[1] has been cultivated axenically in a solution of following composition: Bacto-Tryptone (Difco) — 1%, Bacto Yeastextract (Difco)[2] — 0,05%. Heavy cultures were harvested by a hand driven centrifuge and twice washed prior to feeding in Prescott solution.

[1] Obtained through the courtesy of Dr. J. O. CORLISS of Illinois University, Urbana, Ill., U.S.A.

[2] Kindly supplied by Difco Co., Inc.

The washed individuals were being fed on fresh frozen sections of rat or mouse spleen for different times (30 minutes to 4 hours). Some samples were starved after a feeding of 30—60 minutes. Unfed and fed samples as well as individuals starved after feeding were fixed in buffered osmic acid according to PALADE. The organisms were dehydrated, infiltrated and embedded in methacrylate. All steps were performed in conical centrifuge tubes. The early phases of ingestion were studied in animals fixed while feeding and embedded together with the food. Thin sections were cut on a Porter-Blum microtome and examined with a Tesla electron microscope using a 60 kV beam.

Observations

T. corlissi readily and rapidly ingests mammalian tissues, *e.g.* spleen sections. This results in the rapid formation of numerous food vacuoles. All the animals fixed at different times, with the exception of the early moments, contain vacuoles in different phases of digestion. Thus a critical timing could not be achieved and the food vacuole cycle was reconstructed on the basis of the relative frequencies of the different vacuolar types in the different samples.

Structure of the mouth parts[3] *participating in food vacuole formation.* The ciliated buccal cavity (Figs. 1 and 2, BC) ends in a narrow opening, the cytostome (Figs. 1 and 2, CS). This very conspicuous structure is formed by ridge-like protoplasmic processes. The pellicle of the buccal cavity does not end abruptly at the level of the cytostome but continues on the vacuolar side of the ridge (Fig. 2, P). Several fibrils or tubular structures strengthen this area (Figs. 1 and 2, F) which is most probably identical with the cytopharynx. The newly formed food vacuole, *i.e.* the ingestion vacuole follows distally (Figs. 1 and 2, IV) limited by a thin membrane (Fig. 2, VM).

Contents of food vacuoles. The very large ingestion vacuoles (Figs. 1 and 2, IV) contain more or less granular-fibrillar material evenly distributed in their lumen. The space between the individual particles seems empty. In no instances are traces of the original structure of the ingested tissues discernible in these vacuoles.

The great majority of the digestion vacuoles is filled with a homogeneous dark material (Fig. 3), a condensation and dehydration product of the content of the ingestion vacuoles. In later vacuoles the homogeneous mass breaks up into dark granules and at the same time intergranular spaces reappear (Figs. 3 and 7). These granules disappear also from the older vacuoles and leave behind nothing but a finely dispersed, light, filamentous granular material (Figs. 5, 6 and 8, DV).

Vacuolar membrane. All food vacuoles are surrounded by a smooth vacuolar membrane (Figs. 1 to 8, VM) displaying identical fine structure in early and late vacuoles. In some micrographs (Fig. 7, insert) its doubleness is

[3] In the naming of mouth parts the usage recommended by CORLISS [2] has been followed.

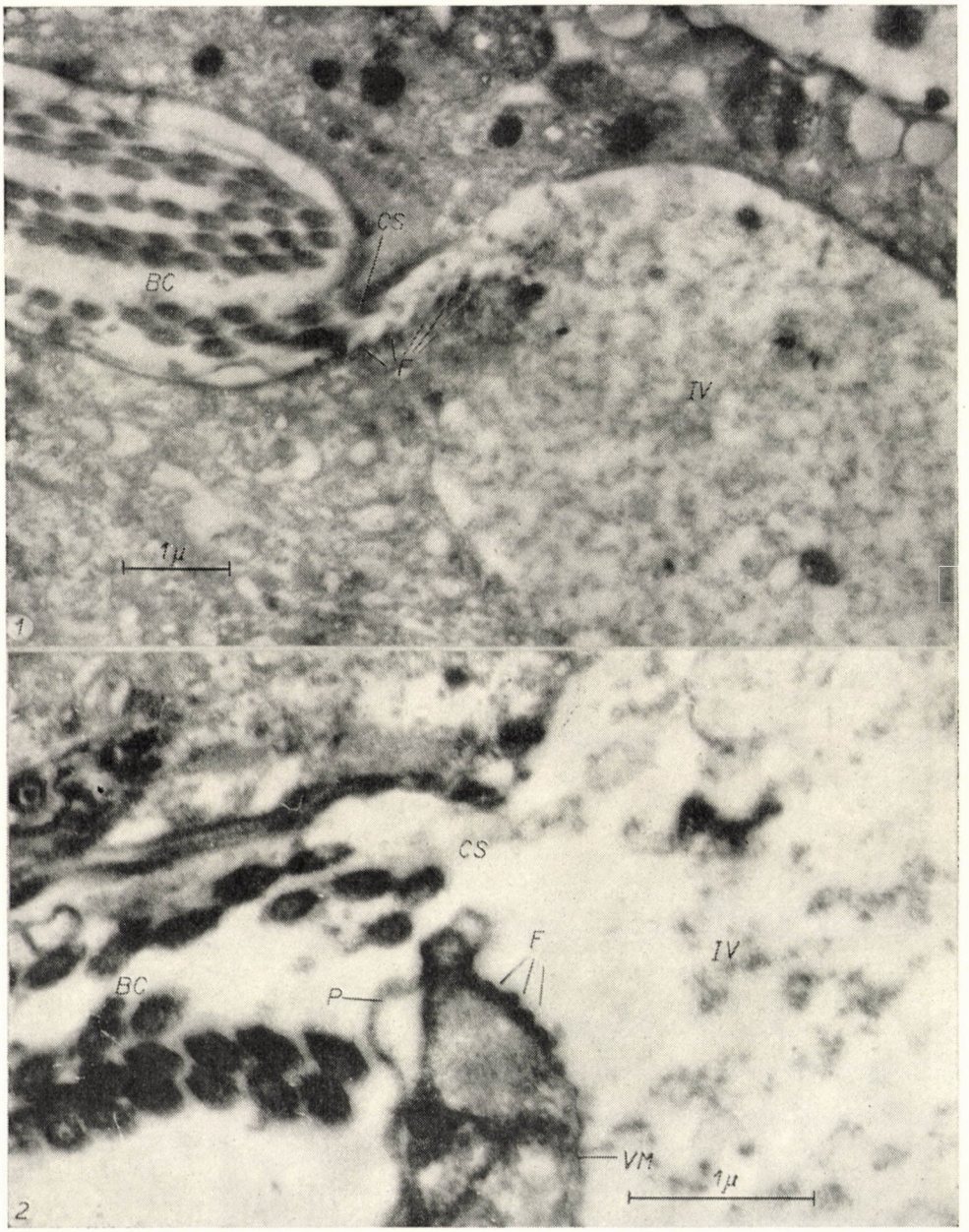


Fig. 1. Longitudinal section through mouth area of *Tetrahymena corlissi.* The ciliated buccal cavity (BC) and the ingestion vacuole (IV) are separated by the cytostome (CS). Note the oblique sections (F) of fibrils or tubular structures right of the latter. The ingestion vacuole (IV) contains granular material. ×14.500

Fig. 2. A similar section of *T. corlissi.* The pellicle (P) of the buccal cavity (BC) shortly continues on the right side of the cystostome (CS). The dark round structures (F) are possibly identical with the fibrils (F) in Fig. 1. VM — membrane of the ingestion vacuole (IV) containing less granular material. ×24.000

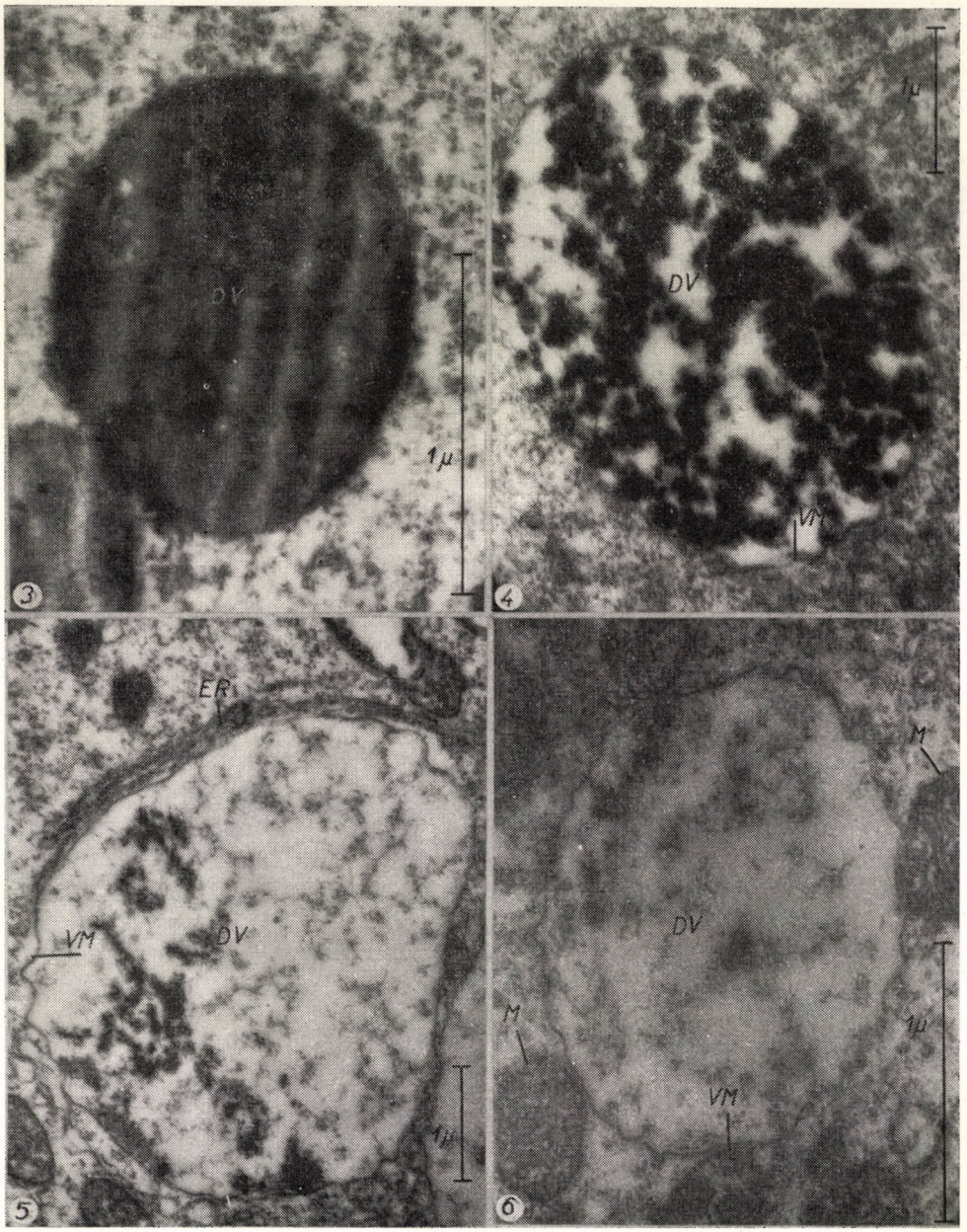


Fig. 3. Section of digestion vacuole (DV) in its most compact form. ×44.000
Fig. 4. Digestion vacuole (DV) containing large dense granules. Note the distinct vacuolar membrane (VM). ×19.200
Fig. 5. Food vacuole (DV) with dark, granular and light, more fibrillar, content. Endoplasmic reticulum (ER) is adhering the vacuole membrane (VM). ×15.750
Fig. 6. Digestion vacuole (DV) in a later phase of digestion. M — mitochondria. ×36.000

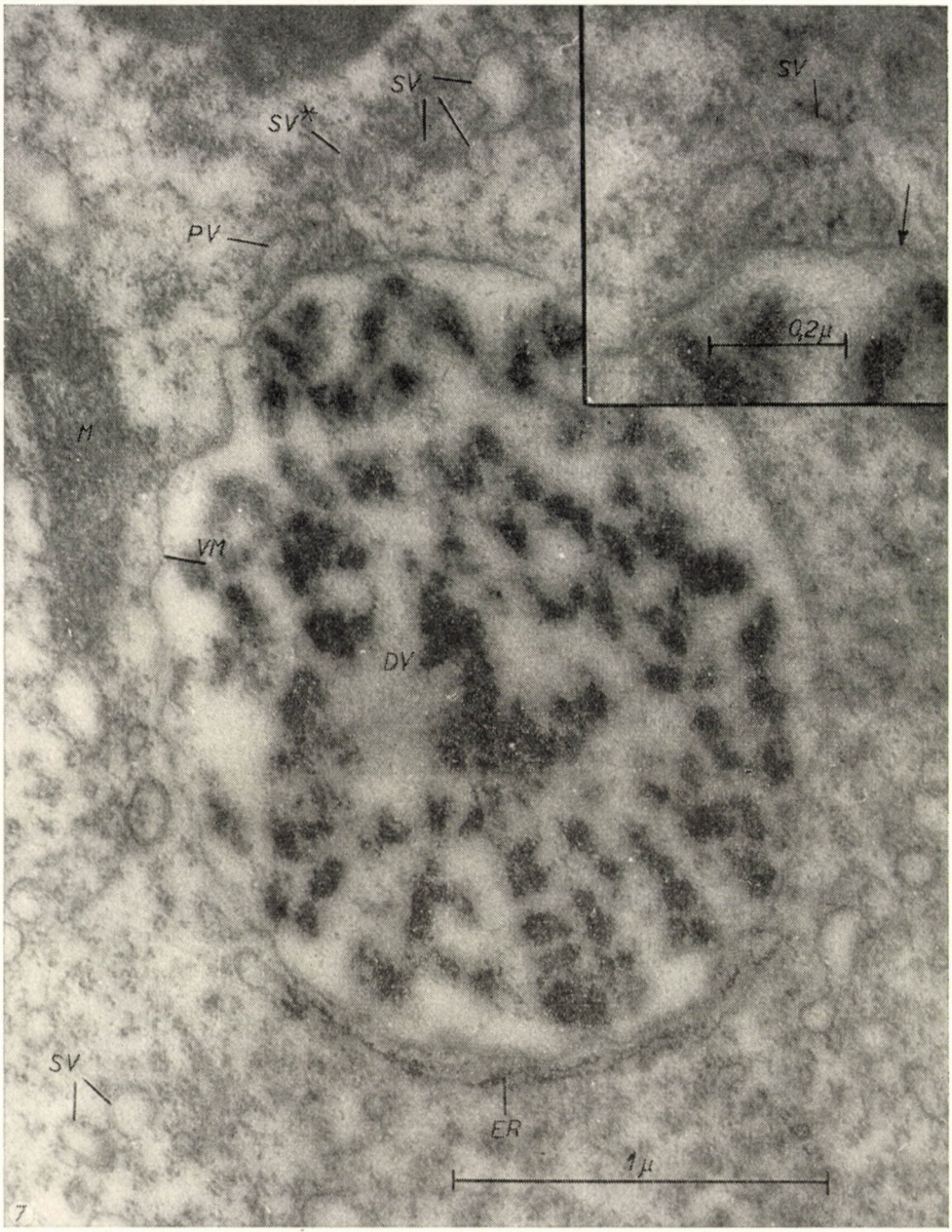


Fig. 7. Late digestion vacuole (DV) with dense granular content. The cytoplasm contains several small vacuoles (SV), some of which with particulate material (SV*). At PV the membrane forms a small vacuole by pinocytosis. ×49.600
Insert. Higher magnification of pinocytotic area (PV). Arrow points to double vacuolar membrane. ×88.000

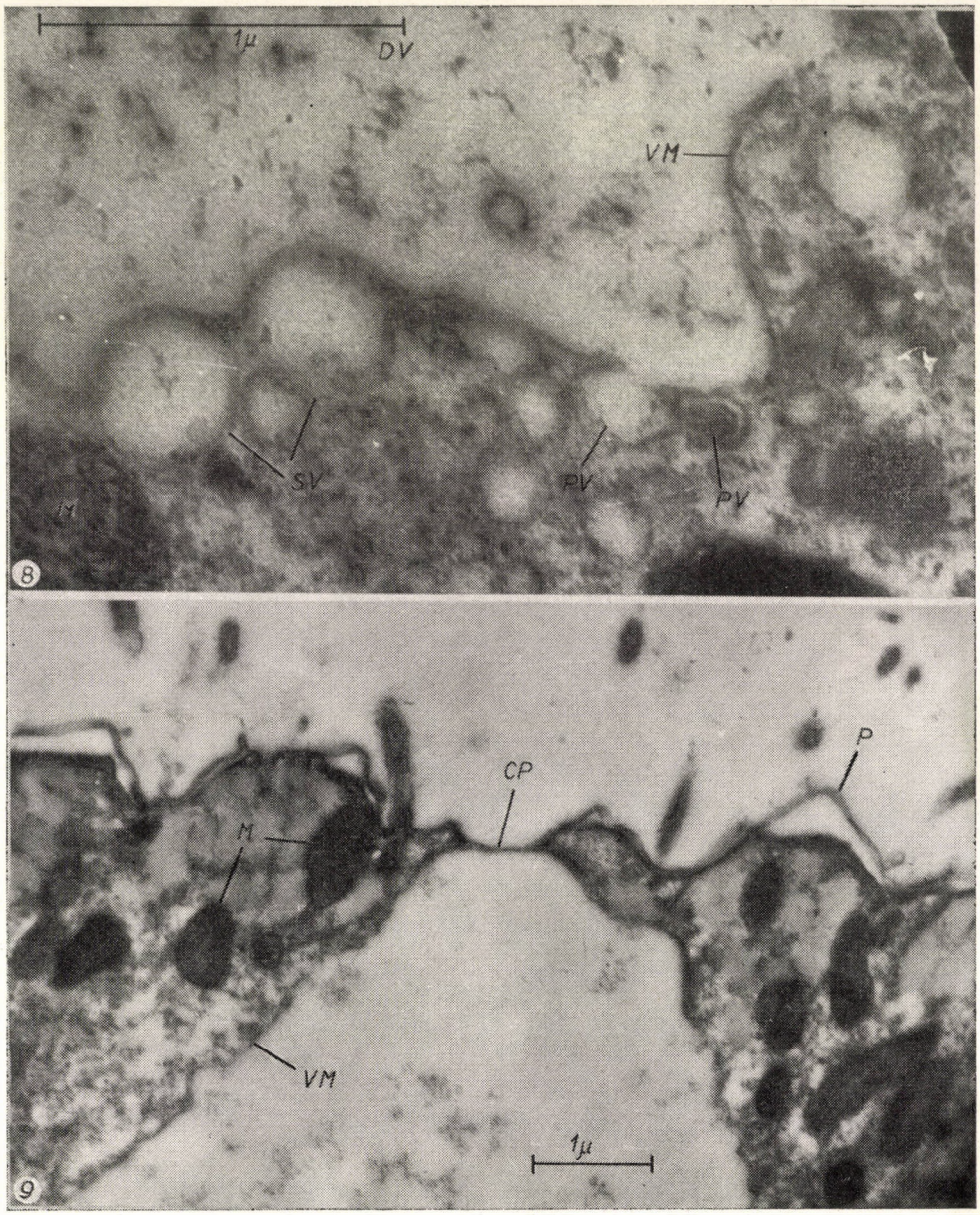


Fig. 8. Late digestion vacuole (DV). Pinocytotic formation (PV) of small vesicles (SV) some of which contain particles. ×46.500

Fig. 9. Surface area of *T. corlissi* representing a structure (CP) possibly identical with the cytoproct. ×15.000

conspicuous. This membrane does not show in the most dense early vacuoles because it is close-fitting to the food mass (Fig. 3). The membrane of the late vacuoles containing dense granules or fibrillar material has an appearance which suggests the involvement of intracellular pinocytosis. Small vacuoles are observed closely associated with the membrane (Figs. 7 and 8, SV). While some of them contain no visible structures, others are filled with granules (Fig. 7, SV*). Here and there the vesicles are connected with the food vacuole (Figs. 7 and 8, PV) budding off from it. Most probably the membrane of the small vacuoles is a derivative of the food vacuole membrane.

Cytoproct. In some micrographs (Fig. 9, CP) points of the animal's surface are to be found where a large vacuole with fibrillar material adheres to the surface pellicle. This point is perhaps the cytoproct but we cannot yet exclude the possibility that it represents the contractile vacuole pore. To differentiate these structures further investigations are required.

Discussion

Micrographs of the mouth parts could not be taken in sufficient number to obtain a clear picture of their organisation. All typical parts [2, 3] of a hymenostome mouth, *i. e.* buccal cavity, cytostome and cytopharynx have, however, been found. At the level of the cytopharynx fibrils or tubular structures are conspicuous which may be identical with the pharyngeal fibrils seen in silver preparations [3] and with the fan of fibres described by METZ and WESTFALL [8]. No structural details have been found which would account for the peculiar feeding mechanism. As in other *Tetrahymena* species, the feeding of *T. corlissi* can only be accomplished in a "Strudler" mode which necessitates the extracellular breaking down of tissues prior to ingestion. An extracellular gelatinase may play a definite role in this process [10].

This view is further supported by the fact that no original structure of the food is preserved even in very early ingestion vacuoles. Their content is represented by irregular fibrillar-granular material. These particles are probably the products of the assumed extracellular "predigestion". They are absorbed together with a considerable amount of water, thus forming the rather large ingestion vacuoles.

The ingestion vacuoles are rapidly transformed into early digestion vacuoles found in great number in all individuals except those starved for a longer time. The change is accomplished by the dehydration and condensation of the content. The early vacuoles are filled with a dark, homogeneous material. The disappearance of discernible structures during early digestion has been noted also in light microscopical work on *Amoeba proteus* [11, 12]. Attacked by digestive fluids this material is broken down into dark, rather large granules,

a process accompanied by the rehydration of the vacuole, and later into finely dispersed, filamentous material. The latter is to be found in the late vacuoles. No light amorphous mass has been found adhering to the late vacuole membrane which is regarded as a digestion product by some authors [7, 15]. The changes observed clearly point to the role of de- and rehydration and the production of digestive enzymes in the digestion of the food praticles [18]. The decreasing amount of material in the vacuoles is explained by the intake of digestion products in the cytoplasm.

The vacuole membrane is a derivative of the mouth parts. As to the mode of its formation nothing definite can be said as yet. We may, however, assume that the depth of the mouth is limited by an undifferentiated plasma membrane which produces the vacuolar wall by extension and constriction [6]. Most authors [4, 7, 15, 16, etc.] do not differentiate a finer substructure in this membrane and regard it as single layered. RUDZINSKA and TRAGER [20] found a double membrane around the food vacuoles in *Plasmodium berghei*. In some of our micrographs the wall appeared double.

The membrane surrounding the early vacuoles is smooth or wavy without any indication of greater activity [18]. The late vacuoles containing granular-fibrillar material have a membrane exhibiting an intense pinocytotic activity. Regarding this phenomenon we may accept the view of ROTH [18] that the results of this process are the modification of the vacuolar membrane and the increased surface area for diffusion. Thus the benefit derived by the organism from this process is chiefly the rapid uptake of digestion products.

Summary

Axenically grown *Tetrahymena corlissi* cells readily ingest mammalian tissues, *e. g.* spleen. The ingestion and digestive vacuoles are surrounded by a (double) membrane 75 ÅU in thickness, differing from the differentiated cell membrane. The original structure of the ingested tissues is unrecognisable, a fact pointing to a certain extracellular "predigestion". The early ingestion vacuoles contain granular material, rapidly condensated to a dark homogeneous mass. Later the vacuole walls are lifted from the dark vacuolar content. The latter slowly breaks up and then almost disappears. At the same time a great number of small secondary vacuoles are budding off from the wall of the digestion vacuole. This process of intracellular pinocytosis must play a prominent role in the uptake of digestion products.

REFERENCES

1. ANDERSON, E.—BEAMS, H. W. (1960): The Fine Structure of the Heliozoan, *Actinosphaerium nucleofilum*. J. Protozool. *7*, 190—199. — 2. CORLISS, J.O. (1959): An Illustrated Key to the Higher Groups of the Ciliated Protozoa with Definition of Terms. J. Protozool. *6*, 265—281. — 3. GELEI, J. (1935): *Colpidium glaucomaeforme* n. sp. (Hymenostomata) und sein Neuronemensystem. Arch. Protistenkde. *85*, 289—302. — 4. GREIDER, M. H.—KOSTIR, W. J.—FRAJOLA, W. J. (1958): Electron Microscopy of *Amoeba proteus*. J. Protozool., *5*, 139—146. — 5. KITCHING, J. A. (1956): Food Vacuoles. In *Heilbrunn-Weber*, Protoplasmatologia, *III*. D, 3b. Springer, Wien. — 6. MAST, S. O.—BOWEN, W. J. (1944): The Food Vacuole in Peritricha, with Special Reference to the Hydrogen-Ion Concentration of its Content and of the Cytoplasm. Biol. Bull. *87*, 188—222. — 7. MERCER, E. H. (1959): An Electron

Microscopic Study of *Amoeba proteus*. Proc. Roy. Soc., *B 150*, 216—232. — 8. METZ, CH. B.—WESTFALL, J. A. (1954): The Fibrillar Systems of Ciliates as Revealed by the Electron Microscope. II. *Tetrahymena*. Biol. Bull. *107*, 106—122. — 9. MUGARD, H. (1949): Contribution à l'étude des infusoires hyménostomes histiophages. Ann. sci. nat., Zool. (Sér. 11), *10*, 171—268. — 10. MÜLLER, M. (1960): Unpublished results. — 11. MÜLLER, M.—RAPPAY, GY. (1958): Cytological and Cytochemical Studies on Unfed and Fed *Amoeba proteus*. Acta Biol. Hung., Suppl. *2*, 31. — 12. MÜLLER, M.—RAPPAY, GY.—TÓTH, É.—TÓTH, J. (1961): Über die Nahrungsaufnahme und Verdauung bei den Protozoen. I. Abbau der Nahrungsorganismen in *Amoeba proteus*. Symp. Biol. Hung. *2*. (In press.) — 13. MÜLLER, M.—RÖHLICH, P. (1961): Electron Microscopy of Intracellular Digestion in a Ciliate *(Tetrahymena corlissi)*. Acta Biol. Hung., Suppl. *4*. (In press.) — 14. MÜLLER, M.—TÓTH, J.—TÖRŐ, I. (1960): Increase of Esterase Activity during Intracellular Digestion in a Histophagous Ciliate. Nature (Lond.), *187*, 65. — 15. PAPPAS, G. D. (1959): Electron Microscope Studies on Amoebae. Ann. N. Y. Acad. Sci. *78*, 448—473. — 16. ROTH, L. E. (1957): An Electron Microscope Study of the Cytology of the Protozoan, *Euplotes patella*. J. biophys. biochem. Cytol. *3*, 985—1000. — 17. ROTH, L. E. (1959): An Electron Microscopic Study of Food Vacuoles in Giant Amoebae. J. Protozool. *6*, Suppl. 31. — 18. ROTH, L. E. (1960): Electron Microscopy of Pinocytosis and Food Vacuoles in *Pelomyxa*. J. Protozool. *7*, 176—185. — 19. RUDZINSKA, M. A.—TRAGER, W. (1957): Intracellular Phagotrophy by Malaria Parasites: an Electron Microscope Study of *Plasmodium lophurae*. J. Protozool. *4*, 190. — 20. RUDZINSKA, M. A.—TRAGER, W. (1959): Phagotrophy and Two New Structures in the Malaria Parasite *Plasmodium berghei*. J. biophys. biochem. Cytol. *6*, 103—112. — 21. THOMPSON, J. C. JR. (1955): Morphology of a New Species of *Tetrahymena*. J. Protozool. *2*, Suppl. 12.

ЗАХВАТ ПИЩИ И ПИЩЕВАРЕНИЕ У ПРОСТЕЙШИХ II. ЦИКЛ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ВАКУОЛЕЙ У TETRAHYMENA CORLISSI

М. МЮЛЛЕР и П. РЕЛИХ

Аксеническая Tetrahymena corlissi охотно заглатывает ткани млекопитающих, напр. селезеночную ткань. Захватывательные и пищеварительные вакуоли выстиланы тонкой (75 Å) двойной оболочкой, имеющей иную структуру, чем дифференцированная пелликула. Пищевой материал теряет исходную структуру уже к моменту заглатывания. Этот факт, вероятно, объясняется известным внеклеточным «предпереариванием». Ранние вакуоли заполнены зернистым веществом, которое быстро конденсируется и превращается в гомогенную темную массу. Стенки вакуоли потом отдаляются от этой массы, который постепенно разрыхляет и почти полностью исчезает. Одновременно отшнуровываются многочисленные мелкие вторичные вакуоли от стенки пищеварительной вакуоли. Этот процесс внутриклеточного пиноцитоза играет, наверно, большую роль в деле всасывания продуктов переваривания.

ÜBER DIE NAHRUNGSAUFNAHME UND VERDAUUNG BEI DEN PROTOZOEN II. ZYKLUS DER VERDAUUNGSVAKUOLEN VON TETRAHYMENA CORLISSI

M. MÜLLER und P. RŐHLICH

Axenisch gezüchtete *Tetrahymena corlissi* nimmt Säugetiergewebe, z. B. Milzgewebe sehr leicht auf. Die Einverleibungs- und Verdauungsvakuolen sind von einem 75 Å dicken (doppelten) Häutchen umgegeben, dessen Struktur von dem Aufbau der differenzierten Zellmembran abweicht. Das Nahrungsmaterial hat seine ursprüngliche Struktur schon zur Zeit des Einverleibens verloren, was wahrscheinlich mit einer bestimmten extrazellulären »Vorverdauung« zu erklären ist. Die Vakuolen sind zuerst von granulärem Material ausgefüllt, welches schnell in eine homogene dunkle Masse kondensiert wird. Die Vakuolenwände heben sich später von der dunklen Masse ab, welche sich allmählich auflockert und fast vollständig verschwindet. Gleichzeitig schnürt sicht eine große Anzahl von kleinen Vakuolen von der Wand der Verdauungsvakuole ab. Diesem Vorgang der intrazellulären Pinozytose kommt wahrscheinlich eine führende Rolle in der Aufnahme der Verdauungsprodukte zu.

Dr. Miklós MÜLLER
Dr. Pál RŐHLICH
Budapest IX. Tűzoltó u. 58. Hungary

Department of Anatomy, University Medical School, Pécs
(Director: Prof. J. SZENTÁGOTHAI)

SOMATOTOPIC ARRANGEMENT OF SYNAPSES OF PRIMARY SENSORY NEURONS IN CLARKE'S COLUMN

J. SZENTÁGOTHAI

(Received August 18, 1960)

Some years ago the synapses of Clarke's column have been analyzed with experimental morphological methods by the author and ALBERT [6]. Three types of synapses have been described. (i) Large muscular afferent primary neurons establish very large and long parallel contact synapses with the Clarke neurons, which finally terminate in unusually large terminal knobs; they have been called "giant synapses". (ii) Another type are terminal knobs of ordinary size, the preterminal fibres of which reach the Clarke neurons mostly at right angles. Their intraspinal origin had been established in the paper mentioned, but as has been pointed out later [3] they are not recurrent collaterals from the dorsal spinocerebellar tract (DSCT), as supposed originally, but originate from spinal interneurons situated in the lower lumbar segments. (iii) A third type of synapse also from spinal interneurons is established by a meshwork of extremely fine fibers in close connection with the Clarke neuron surface. This type of synapse has recently been brought into connection with inhibition [5] exerted by spinal interneurons upon Clarke neurons as first shown by LAPORTE, LUNDBERG, and OSCARSSON [2], and investigated more exactly with the intracellular microelectrode technique by CURTIS, ECCLES and LUNDBERG [1]. — These three histological types of synapse fit fairly well with the physiological findings of the LUNDBERG group in Lund, according to which besides the direct monosynaptic action of predominantly muscular afferents, Clarke neurons are impinged upon by excitatory and inhibitory influences from spinal interneurons.

During more recent investigations on the intraspinal course of primary sensory neurons with the NAUTA technique an interesting somatotopic arrangement of primary sensory neuron synapses in Clarke's column has been noticed, a short account of which shall be presented in this paper.

Material and methods

The investigations were carried out on cats in which the dorsal roots L_3, L_4, L_5, L_6 and L_7 were transected separately. The cats were let to survive for 5 days. The spinal cord was fixed by perfusion with neutral formol and investigated in frozen sections according

to NAUTA's method. Transverse sections were prepared from each segment below Th_9, but the adjoining parts of the segments Th_{13}—L_1 and L_{2-3} were spared for longitudinal sectioning. Care was taken for exact orientation of the longitudinal sections in order to get the Clarke columns of both sides as far as possible into the same slides.

Results and conclusions

As known, primary sensory neuron collateras do not enter Clarke's column at the level of their entrance into the cord, but have to ascend for one or two segments in the dorsal fasciculus. This is of course natural in case of sensory neurons of the segments below L_4, where there is no Clarke column. From tracing of degenerated fragments after transection of the dorsal roots L_{3-4} it appears, however, that L_4 collaterals do not enter the column below L_2, and L_3 collaterals not below L_1. — The distribution of collaterals originating from a given segment (*e. g.* L_4) can best be understood from the schematic diagram on Fig. 1. Clarke's column is represented by a vertical cylinder with the nerve cells also oriented longitudinally, *i. e.* with long axes parallel to the axis of the spinal cord. After transection of the dorsal root L_4 signs of degeneration are found in the column between the segments L_2—Th_{10} within a well-defined space limited between two parallel nearly sagittal planes, slightly sloping upwards in medial direction. The distance of the planes from another is about a quarter of the diameter of Clarke's column or somewhat less in the case of the small roots from L_4 upwards, and considerably larger — to about half of the diameter in the case of the larger roots L_6—S_1. This means that direct dorsal root collaterals after having entered Clarke's column are shifted during their ascent gradually in medial direction, establishing thus synaptic contact with more and more medially situated Clarke neurons. Since, as has already been stated [6], collaterals from the different roots do not enter Clarke's column at the same level, this distribution of collaterals is not due exclusively to a medial shifting of collaterals inside the column but also to a similar shift of the ascending white dorsal column fibres. In sagittal sections of the cord of animals with previous lumbar radicotomy one encounters degenerated collaterals entering the gray matter from the dorsal fasciculus in large numbers as high as five or six segments above the level of the entrance of the sectioned root into the spinal cord. These collaterals are situated the more medial the higher they are above their segment of entrance.

However well defined the borders of the space in which the collaterals arising from any dorsal root are distributed in Clarke's column, these borders do not separate the distribution fields of two neighbouring or any other segments. On the contrary, there is a considerable overlap between collaterals of neighbouring segments. The collaterals derived from the large lower lumbar segments overlap not only with their adjacent, but even with the next and perhaps even more segments. This is demonstrated diagrammatically in Fig. 2,

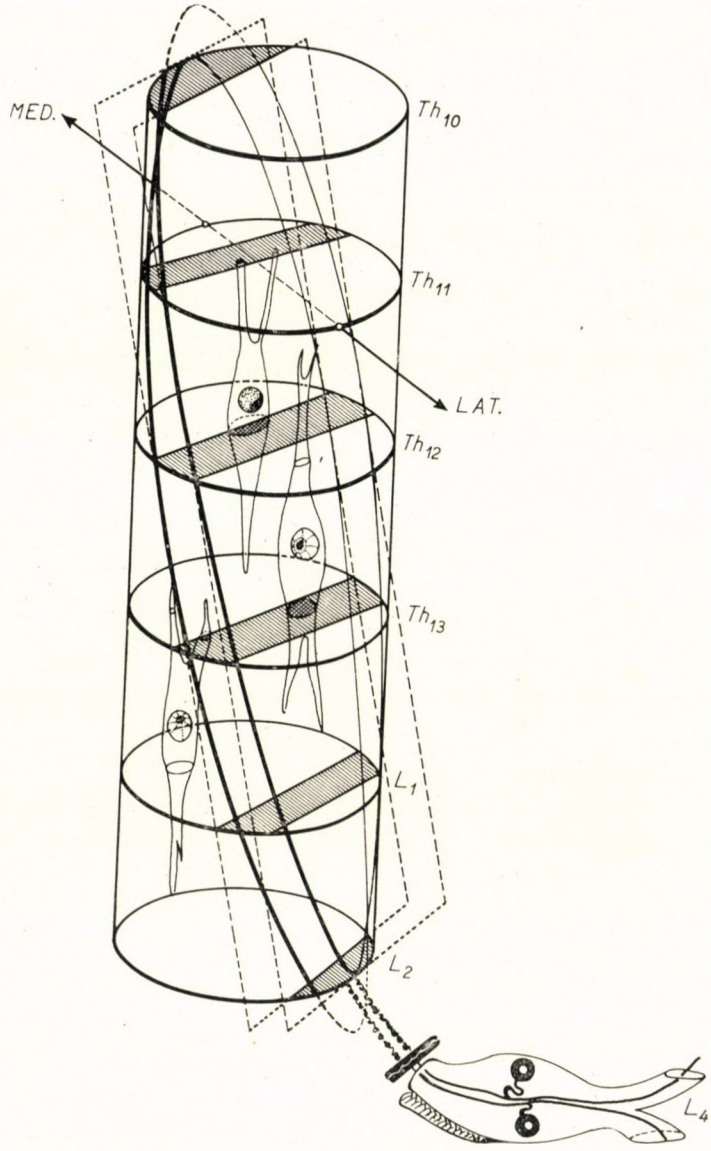


Fig. 1. Diagram showing the distribution of primary sensory collaterals in Clarke's column originating from the segment L_4. Further explanation in the text

with indication of the "giant (parallel contact) synapses" involved. — Thus it appears that synapses between primary sensory neurons of different segments with Clarke neurons are situated in parallel oblique slices of the column sloping upwards in medial direction and showing considerable overlap between neighbouring and even more distant segments.

The significance of this somatotopic arrangement of synapses would better be understood if we had more exact information on: (i) the distribution and termination of the distal branches of the neurons of a given segment which terminate in lower or upper parts of the column, and (ii) on the mode of termination of DSCT fibers in the cerebellum arising from different levels of Clarkes column. Unfortunately we do not know anything about these questions. Since according to LUNDBERG and OSCARSSON [3] most DSCT neurons are monosynaptically stimulated either by muscle spindle (I*a*) or Golgi tendon organ (I*b*) afferents, the possibility must be taken into account that the one of the two types might be localized more caudally than the other. This has already been tested experimentally by OSCARSSON [4] with descending longitudinal sectioning of the spinal cord to interrupt the Clarke neuron axons successively as they enter Flechsig's fasciculus. Since the discharges due to I*a* and I*b* stimulation decreased concomitantly in such experiments, this possibility has been ruled out. So we must suppose that Clarke neurons which are monosynaptically activated by I*b* afferents are situated in the same level as those impinged upon by I*a* afferents. — The mode of termination of dorsal spinocerebellar fibres originating from different levels of the cord is a question that remains to be investigated by appropriate methods.

Summary

The synapses of primary sensory collaterals of lumbar segments with Clarke neurons are situated in parallel oblique slices of the column sloping upwards in medial direction. There is considerable overlap in Clarke's column between the synaptic territories of neighbouring segments. In consequence of this arrangement the Clarke neurons monosynaptically excited by the primary sensory neurons of a given segment are generally the most lateral ones in the lower and the most medial ones in the upper part of the synaptic territory of that segment in Clarke's column.

REFERENCES

1. CURTIS, D. R.—ECCLES, J. C.—LUNDBERG, A. (1958): Intracellular Recording from Cells in Clarke's Column. Acta physiol. scand. *43*, 303—314. — 2. LAPORTE, Y.—LUNDBERG, A.—OSCARSSON, O. (1956): Functional Organization of the Dorsal Spinocerebellar Tract in the Cat. II. Single Fiber Recording in Flechsig's Fasciculus on Electric Stimulation of Various Peripheral Nerves. Acta physiol. scand. *36*, 188—203. — 3. LUNDBERG, A.—OSCARSSON, O. (1956): Functional Organization of the Dorsal Spinocerebellar Tract in the Cat. IV. Synaptic Connections of Afferents from Golgi Tendon Organs and Muscle Spindles. Acta physiol. scand. *38*, 53—75. — 4. OSCARSSON, O. (1957): Primary Afferent Collaterals and Spinal Relays of the Dorsal and Ventral Spinocerebellar Tracts. Acta physiol. scand. *40*, 222—231. — 5. SZENTÁGOTHAI, J. : Anatomical Aspects of Inhibitory Pathways and Synapses. Friday Harbor Symposium on Nervous Inhibition 1960 (in press). — 6. SZENTÁGOTHAI, J.—ALBERT, A. (1955): The Synaptology of Clarke's Column. Acta morph. hung. *2*, 43—48.

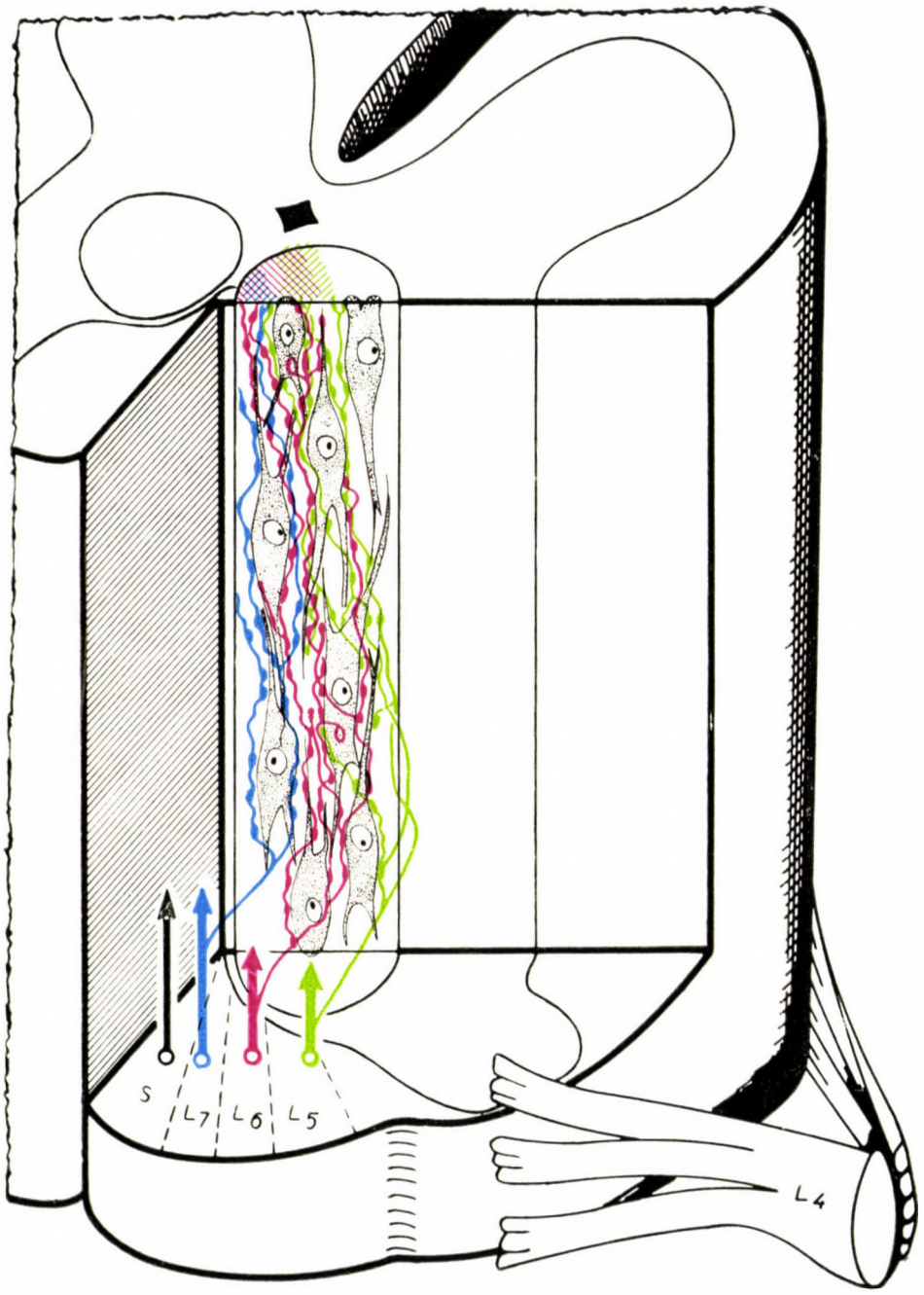


Fig. 2. Distribution and overlap of primary sensory collaterals derived from the segments L_{5-7}

СОМАТОТОПИЧЕСКОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ СИНАПСОВ ПЕРВИЧНЫХ ЧУВСТВУЮЩИХ НЕВРОНОВ В СТОЛБЕ КЛАРКЕ

Й. СЕНТАГОТАИ

Первичные чувствующие невроны поясничных срезов образуют в столбе Кларка в цилиндрических сегментах, разграниченных косыми, в верхнем направлении медиально наклоняющимися плоскостями, синапсы с находящимися в этих пространствах Кларковыми нервными клетками. Между подобными синаптическими областями соседних срезов наблюдается значительное совпадение. В результате этого распределения происходящие из определенного корня коллатерали образуют в нижней части относящейся к данному корню области непосредственные синапсы с боковыми, а в верхней части этой области с медиальными клетками Кларка.

SOMATOTOPISCHE ANORDNUNG DER SYNAPSEN VON DEN PRIMÄREN SENSORISCHEN NEURONEN IN CLARKESCHEN SÄULE

J. SZENTÁGOTHAI

Die Synapsen zwischen den primären sensorischen Neuronen der Lumbalsegmente und Clarkeschen Zellen sind in schiefen nach oben medialwärts geneigten durch parallele Ebenen begrenzten Zylinderschnitten der Clarkeschen Säule lokalisiert. Die zu benachbarten Segmenten gehörenden Scheibenterritorien der Clarkeschen Säule überdecken sich weitgehend. Dieser Anordnung zufolge werden durch die Kollateralen jeder Dorsalwurzel im kaudalen Verteilungsbereich der Clarkeschen Säule laterale, im kranialen Verteilungsbereich mediale Nervenzellen direkt erregt.

Prof. Dr. János SZENTÁGOTHAI, Pécs, Dischka Gy. u. 5. Hungary

I. Institut für Pathologische Anatomie und Experimentelle Krebsforschung der Medizinischen Universität, Budapest
(Direktor: Prof. J. Baló)

ZUR FRAGE DER FETTMOBILISIERUNG

J. Baló

(Eingegangen am 21. Mai, 1960)

Einleitung

Mit den physiologischen Reaktionen, auf deren Einwirkung das Depotfett in den Kreislauf gelangt, sowie mit den pathologischen Zuständen, die mit der Vermehrung des Fettgehalts im Blut einhergehen, beschäftigen sich Physiologen und Pathologen seit langer Zeit.

Mansfeld [16] untersuchte 1909 die Frage, wodurch die Fettmobilisierung in Gang kommt, indem er die Veränderungen des Blutfettgehalts nach akuter Säurevergiftung feststellte. Durch die Vena jugularis externa des Hundes ließ er n/10 Salzsäure oder n/4—n/8 normale Milchsäure strömen. Wenn der Fettgehalt auf die Bluttrockensubstanz bezogen wurde, so war eine Vermehrung des Fettgehalts im Blut zu beobachten. Hofmeister [13] wies 1912 darauf hin, daß das Fettgewebe nicht innerviert sei, die Fettmobilisierung somit nur die Folge einer chemischen Regulation sein könne. Es schien deshalb wichtig, die Rolle der Hormone klarzustellen.

Die Rolle des Nervensystems

Die These Hofmeisters, das Fettgewebe enthalte keine Nerven, konnte nicht akzeptiert werden und mehrere Autoren studierten daher die Frage, welche Wirkung das Nervensystem auf den Zustand des Fettgewebes ausübt. Eingehend befaßten sich Mansfeld und Müller [17] mit dieser Frage. Sie untersuchten 1913, wie sich die Denervation auf den Zustand des Fettgewebes auswirkt: An 2 fetten Hunden durchtrennten sie den N. ischiadicus und verglichen die Menge des Fettgewebes auf der denervierten Seite mit der auf der intakten Seite. Als Folge des Hungerns war auf der denervierten Seite mehr Fett erhalten geblieben als auf der intakten Seite. Anschließend führten sie Versuche an Meerschweinchen durch. Auf einer Seite wurde der N. ischiadicus und N. femoralis durchtrennt, und nach dem Hungern fanden sie auf der denervierten Seite mehr Fett als auf der intakten.

Wertheimer [30] untersuchte die Fettmobilisierung nach Phlorrhizin-Vergiftung, die bekanntlich Fettmobilisierung bewirkt. Wurde das Rücken-

mark der Hunde zwischen dem 1—7. Dorsalsegment durchtrennt, so kam unter der Wirkung des Phlorrhizins keine Fettleber zustande. Die fettmobilisierende Wirkung von Phlorrhizin geht mit Lipämie einher, aber nach der Rückenmarkdurchtrennung entstand auch keine Lipämie. Auch WERTHEIMER hat demnach die Rolle des Nervensystems im Zustandekommen der Fettmobilisierung bestätigt.

Im Jahre 1937 untersuchten BEZNÁK und HASCH [3] die Wirkung der Sympathektomie auf die Fettmobilisierung an Katzen, Kaninchen und Hunden. Sie resezierten das obere zervikale Ganglion, das Ganglion stellatum, durchtrennten unter dem Zwerchfell den Splanchnicus major und minor und entfernten außerdem die lumbalen und sakralen sympathischen Ganglien. Alle diese Eingriffe wurden unilateral ausgeführt und die Befunde mit dem Zustand auf der kontralateralen Seite verglichen. Außerdem verglichen sie die in einzelnen Zonen beobachteten Erscheinungen auch miteinander. Nach zervikaler Sympathektomie untersuchten sie das Verhalten des perikardialen Fettgewebes, nach Durchtrennung des Splanchnicus major und minor das perirenale Fettgewebe und nach Resektion der lumbalen und sakralen sympathischen Ganglien den Zustand des abdominalen und subkutanen Fettgewebes. Nach der zervikalen Sympathektomie fanden sie auf der operierten Seite mehr perikardiales Fettgewebe als auf der intakten. Nach unilateraler Durchtrennung des Splanchnicus major und minor hatte sich das perirenale Fettgewebe an dieser Seite auf das Doppelte oder Dreifache vermehrt, nach unilateraler Resektion der lumbalen und sakralen Ganglien war das abdominale und subkutane Fettgewebe auf dieser Seite massiver. BEZNÁK und HASCH stellten ferner fest, in dem der sympathischen Innervation beraubten Fettgewebe habe sich das Fett langsamer abgelagert, aber die Mobilisierung in noch stärkerem Maße verlangsamt.

BEZNÁK und HASCH verabreichten außerdem Versuchstieren mit Sudan gefärbtes Fett und wiesen nach, daß sich dieses zuerst perirenal ablagert. Das Fettgewebe der einzelnen Gegenden verhält sich somit nicht ganz gleichartig. Das geht auch aus STRANDBERGS [24] Beobachtung hervor, der das Schicksal eines auf den Handrücken transplantierten Bauchhautstückchens verfolgte und feststellte, daß das transplantierte Hautstückchen nach Gewichtszunahme am Handrücken ebenso Fettspeicherung aufwies wie die Haut der Bauchwand. KEN KURÉ und Mitarbeiter [15] untersuchten die sympathische und parasympathische Innervation des Fettgewebes. An 55 Hunden durchtrennten sie die vorderen oder hinteren Rückenmarkwurzeln und setzten sie mechanischer Reizung aus oder spritzten Cantharidin-Tinktur in die Wurzeln. Die sympathischen Fasern treten an den vorderen Rückenmarkwurzeln heraus, während die parasympathische Innervation an den hinteren Wurzeln verläuft. Nach ihrer Feststellung wirken die sympathischen Nerven hemmend auf die Fettablagerung, während von den parasympathischen die Fettmobilisierung stimuliert

wird. Nach totaler Denervation ist sowohl die Fettablagerung wie die Fettmobilisierung beeinträchtigt.

Endlich verweisen wir bezüglich der Rolle des Nervensystems in der Fettmobilisierung auf die Angaben von TORSKAYA [26], wonach die Denervation unter normalen physiologischen Verhältnissen keinen beträchtlichen Einfluß auf die Fettspeicherung und -mobilisierung ausübt, während des Hungerns jedoch die Fettmobilisierung durch die Denervation verzögert wird. TORSKAYA untersuchte auch, ob sich der Einfluß der Denervation verändert, wenn eine Verschiebung im endokrinen Milieu eintritt. Zu diesem Zweck wurde die Schilddrüse von Kaninchen exstirpiert und anderen Tieren Thyreoidin oder Insulin mit Glukose verabreicht. Mehrere Tiere wurden kastriert, bei anderen wurde das Ovarium oder der Hoden implantiert. Unter diesen Veränderungen der inneren Sekretion erfolgte die Denervation. Es stellte sich heraus, daß die Fettmobilisierung in den Fällen mit erhöhtem Stoffwechsel durch die Denervation verzögert wurde. Dieses Ergebnis trat zutage, wenn Hoden oder Ovarium implantiert oder Thyreoidin verabfolgt wurde. Die Erscheinung war aber auch zu beobachten, wenn nach Kastration oder Exstirpation der Thyreoidea bzw. nach Insulin-Glukoseverabreichung vermehrte Fettspeicherung eintrat.

Es unterliegt keinem Zweifel, daß auch die vegetativen Zentren des Hypothalamus Einfluß auf die Fettspeicherung oder Fettmobilisierung ausüben. Zum Beweise dieser Tatsache lassen sich klinische und pathologische Beobachtungen anführen.

Die Hormone

Von den Autoren, welche die Fettmobilisierung auf chemische Regulation zurückführen, wird hauptsächlich die Mitwirkung einzelner Hormone vorausgesetzt.

Laut LOMBROSO, sowie ALLEN und BLOOR hat die Bauchspeicheldrüse eine den Fettstoffwechsel regulierende innersekretorische Funktion. DRAGSTEDT, VAN PROHASKA und HARMS [8] haben 1936 ein fettstoffwechselregulierendes Hormon aus dem Pankreas isoliert und Lipocaic genannt. Mehrere Autoren nahmen an, bei der Fettmobilisierung spiele auch Adrenalin eine Rolle. Unter Wirkung von Adrenalin kommt es zur Mobilisierung der Fettdepots. Nach Adrenalinverabreichung erhöht sich der Fettgehalt im Blut normaler und an Phlorrhizin-Diabetes leidender Tiere und der Fettgehalt in der Leber hungernder Tiere.

Laut VERZÁR und LASZT [27] wird das Zustandekommen der infolge Phosphorvergiftung oder Hungern entstehenden Fettleber bei Ratten durch die Resektion der Nebenniere gehemmt. Phosphorvergiftung und Hungern führen nämlich zur Fettmobilisierung, und das Fett speichert sich in der Leber. Erneut speichert sich Fett in der Leber nach Phosphorvergiftung laut VERZÁR und

LASZT dann, wenn die adrenalektomierten Ratten Nebennierenrindenhormon erhalten.

ANSELMINO und HOFFMANN [1, 12] isolierten aus dem Hypophysenvorderlappen eine Substanz, die bei Ratten Ketonämie verursacht. Nach ISSEKUTZ JR. und VERZÁR [14] übt die Hypophyse ihren Effekt auf den Fettstoffwechsel über die Nebenniere aus.

Die Wirkung von Adrenalin oder Noradrenalin auf die Fettmobilisierung ist auch neuerdings von vielen untersucht worden. WADSTRÖM [29] injizierte Kaninchen intravenös Adrenalin. Vor und nach der Einspritzung bestimmte er die Tri-, Di- und Monoglyzeride im Fettgewebe der Regio pubica, wobei er feststellte, daß sich unter Adrenalinwirkung die niedrigeren Glyzeride vermehrt hatten, was so interpretiert wurde, daß Adrenalin im Fettdepot Lipolyse zustande bringt.

WHITE und ENGEL [31] prüften die Wirkung von Adrenalin und Noradrenalin in vitro und stellten fest, daß beide die Bildung der nicht esterifizierten Fettsäuren stimulieren und diese Wirkung für das l-Isomer spezifisch sei.

ENGEL, ENGEL und MCPHERSON [9] untersuchten den ketogenen und adipokinetischen Effekt der Hypophysenhormone. Laut CAMPBELL und BEST [4] übt auch das Wachstumshormon der Hypophyse eine derartige Wirkung aus. WHITE und ENGEL stellten dasselbe in bezug auf ACTH und TSH fest.

Fettmobilisierung bei experimenteller Hypercholesterinämie

Meine Mitarbeiter DÖMÖSI und EGYED [7] haben 1939 Atherosclerose-Versuche an Kaninchen vorgenommen und dabei im allgemeinen in Öl gelöstes Cholesterin verwendet. Wir wollten indessen auch untersuchen, welche Wirkung Cholesterin allein ausübt. Zu diesem Zweck bereiteten wir eine wäßrige Cholesterinsuspension, indem wir das in Eisessig gelöste Cholesterin kaltem destilliertem Wasser zugaben, wodurch eine Cholesterinsuspension mit sehr feiner Dispersion entstand, die von Essigsäure befreit und den Kaninchen durch die Magensonde gegeben wurde. Auf diese Weise konnte eine sehr hohe Hypercholesterinämie herbeigeführt und bei den Kaninchen Atherosklerose durchschnittlich in 2 Monaten herforgerufen werden. Wie dieser Versuch ergab, wird Cholesterin in wäßriger Suspension gut resorbiert, so daß es keines Öls zur Cholesterinresorption bedarf.

Mein Schüler POPJÁK [22] hat dieses Verfahren in London weiterentwickelt und nachgewiesen, daß nach Verabreichung der wäßrigen Cholesterinsuspension nicht nur Hypercholesterinämie entsteht, sondern sich auch die Phospholipide und neutralen Fette im Blut vermehren. Unter Wirkung der wäßrigen Cholesterinsuspension verringern sich trotz ausreichender Ernährung

die Fettdepots, und die Tiere magern stark ab. POPJÁK fand, daß Cholesterin Fettmobilisierung in den Fettdepots bewirkt, zugleich die Synthese der Phospholipide in der Leber zunimmt und die Fettsäuren in gesteigertem Maße verbraucht werden. Er gelangte zu dem Schluß, Cholesterin sei der Regulator der Lipoidbestandteile des Blutplasmas.

Unlängst hat mein Mitarbeiter SZALAY [25] auf dem Kongreß der Physiologischen Gesellschaft 1959 über unsere diesbezüglichen Untersuchungen referiert, welche ergaben, daß sich nach Verabfolgung von Cholesterin in wäßriger Suspension außer der Erhöhung des Cholesterinspiegels im Blutplasma die Gesamtlipoidfraktion, die Phospholipid- und neutrale Fettfraktion sowie die β-Lipoproteinfraktion in gleicher Weise vermehren, ja zugleich auch der Serumeiweißwert ansteigt und sich das pH des Serums in saurer Richtung verschiebt.

Das pathologisch-anatomische und histopathologische Bild der Fettmobilisierung

Die Untersuchung der Fettmobilisierung führt u. a. zu der Frage, ob pathologisch-anatomische und histopathologische Zeichen dieses Prozesses angetroffen werden können. Die Verminderung des Fettgewebes ist bei der Sektion von Menschen oder Tieren oft zu beobachten. Das Bild des atrophischen Fettgewebes ist gut bekannt. Die von der Fettmobilisierung verursachten Veränderungen sind in den verschiedenen Fettdepots deutlich wahrnehmbar, lassen sich aber am besten im Knochenmark untersuchen.

VIRCHOW [28] hat 1859 darauf hingewiesen, daß sich das Fettgewebe unter dem Perikard, perirenal und anderswo bei der Abmagerung zu gallertartigem Bindegewebe umgestaltet. Laut PONFICK [21] wird das an und für sich schwefelgelbe fettige Knochenmark infolge von Marasmus senilis, erschöpfenden Krankheiten, Tuberkulose, Krebs und Inanition honigartig oder bernsteinartig. Nach ASKANAZY [2] sei rotes und gelbes Knochenmark als normal, gallertartiges jedoch als pathologisch zu betrachten. Das gallertige Knochenmark ist glasartig, apfelgelee- oder himbeergeleeartig. Die Färbung beruht offenbar darauf, in welchem Maße es neben der Veränderung des fettigen Knochenmarks zu der des roten Knochenmarks gekommen ist. v. RECKLINGHAUSEN [23] hielt die gallertartige Umwandlung für Ödem ex vacuo. ASKANAZY [2] betonte, das gallertartige Knochenmark enthalte keine schleimige Substanz, aber in der serösen Flüssigkeit sei Fibrinogen anzutreffen, von dem Fibrinfäden ausscheiden.

Das gallertartige Knochenmark wurde auch von ORSÓS [20] untersucht, der vor allem mit Hilfe von Imprägnationsverfahren das retikuläre Netz des Knochenmarks sowie die Tatsache nachwies, daß dieses Netz mit den Fettzellen und mit den Gefäßen netzartig zusammenhängt. Außerdem fand er

Nerven und sogar Nervenendigungen im Knochenmark. ORSÓS nahm an, daß die Fettzellen im gallertigen Knochenmark Schleim sezernieren und daß sie feine Drainkanäle enthalten.

Eigene Untersuchungen

Mit der Frage der Fettmobilisierung habe ich mich seit 1937 befaßt, und es gelang mir an menschlichem Material und in Tierversuchen nachzuweisen, daß das gallertartige Knochenmark die bezeichnendste Form der Fettmobilisierung sei. Während die Veränderungen anderer Fettdepots mit der Reduktion oder dem Verschwinden des Fettgewebes, mit der Bildung von ödematösem Fettgewebe einhergehen, ist das Fettgewebe im Knochenmark in fixiertem Zustand, und das sich aus dem Verschwinden des Fetts ergebende Vakuum füllt sich mit Flüssigkeit an, so daß sich die histologischen Veränderungen im Zeitpunkt der Fettmobilisierung gut untersuchen lassen. Die Erscheinungen der Fettmobilisierung sind auch in anderen Fettdepots vorzufinden, wenn auch nicht in so anschaulicher Form wie im gallertartigen Knochenmark.

Wir haben 12 Fälle eingehend aufgearbeitet (Tabelle I), in denen ausgedehnte gallertige Knochenmarkumgestaltung nachgewiesen werden konnte. Es handelte sich teils um ältere Menschen, die an einer bösartigen Geschwulst litten, doch haben wir gallertartiges Knochenmark auch bei einem 5jährigen Kind beobachtet, so daß es also nicht als eine senile Veränderung angesehen werden kann. Am häufigsten haben wir gallertartiges Knochenmark im Femur, oft aber auch im Sternum, in Wirbeln oder im Beckenbein angetroffen.

Das Material wurde mit oder ohne Entkalkung aufgearbeitet und anschließend Fettfärbung mit Sudan III, Ölrot und Fettrot sowie FISCHLERsche Fettsäurefärbung angewandt. Außerdem dienten Färbung nach MALLORY und mit Toluidinblau zum Nachweis des Bindegewebes, die PAS-Reaktion zu dem der neutralen Mukopolysaccharide und die HALE-Reaktion zur Darstellung der sauren Mukopolysaccharide. Ferner benutzten wir die WEIGERTsche Fibrinfärbung sowie die Imprägnation nach BIELSCHOWSKY zur Imprägnation der Zellen, die Bindegewebsimprägnation nach BIELSCHOWSKY—MARESCH, die GÖMÖRIsche Bindegewebsimprägnation und die PAPsche Imprägnation.

Ergebnisse

Unter den im Gallertmark wahrnehmbaren Veränderungen ist die der Fettzellen am auffallendsten. Während die Fettzellen unter normalen Verhältnissen im fettigen Knochenmark oder dort, wo rotes Knochenmark und Fettgewebe vermischt vorkommen, die übliche Siegelringform zeigen, d. h. das

Tabelle I

Das Untersuchungsmaterial

1. F. I.	53 jährig	56/937	Szeged	Carcinoma cardiae	gallertartiges Knochenmark in Rippen und Wirbeln
2. F. J.	42 jährig	78/937	Szeged	Bronchiektasie, Lungengangrän	gallertartiges Mark in Femuren, Rippen und Wirbeln
3. Z. J.	67 jährig	83/937	Szeged	Amyloidose	gallertartiges Knochenmark im Sternum und Beckenbein
4. L. S.	72 jährig	110/937	Szeged	Laennec-Zirrhose	Knochenmark in Femur und Sternum, subkutanes Fettgewebe gallertartig
5. K. J.	40 jährig	142/937	Szeged	Kraniopharyngiom	in großer Ausdehnung gallertartiges Knochenmark in Femuren, Rippen, Wirbeln
6. T. L.	58 jährig	436/953	Budapest	Carcinoma pulmonalis	gallertartiges Mark in beiden Femuren
7. Frau K. L.	61 jährig	249/957	Budapest	Carcinoma recti	gallertartiges Mark im Femur
8. Frau G. K.	41 jährig	41/959	Budapest Gisela	Carcinoma uteri	gallertartiges Mark im rechten Femur
9. K. J.	62 jährig	110/959	Budapest	Leukaemia lymphatica	Blutungen und gallertartiges Mark in Sternum und Femur
10. Frau R. Á.	70 jährig	217/959	Budapest	Carcinoma papillae Vateri	gallertartiges Knochenmark
11. Frau Cs. I.	84 jährig	218/959	Budapest Gisela	Carcinoma ventriculi	gallertartiges Mark in beiden Femuren
12. S. J.	5 jährig	52/960	Budapest	Duodenalstenose	gallertartiges Mark im rechten Femur

Fett einen einzigen, die ganze Zelle anfüllenden Tropfen bildet, ist der Fetttropfen im gallertartigen Knochenmark kleiner. Im Verlauf der Verkleinerung des Fetttropfens verändert der von ihm zur Seite gedrückte Kern seine Form und wird oval. Während der Verkleinerung des Fetttropfens wandert der Kern in das Zentrum der Zelle, und er erreicht seine zentrale Lage, wenn das Fett ganz aus der Zelle verschwunden ist. Im Verlauf seiner Wanderung in das Zentrum bilden sich um den Kern Fortsätze, die sich bis zur ursprünglichen Grenze der Fettzelle erstrecken, so daß die Zelle die Form einer Spinne annimmt. Zwischen den Fortsätzen, die den Beinen der Spinne entsprechen, befindet sich Serum in der weder neutrale, noch saure Mukopolysaccharide nachzuweisen sind. Die Behauptung von ORSÓS, in den Fettzellen finde Schleimsekretion statt, vermögen wir nicht zu bestätigen. In der ursprünglichen Fettzelle liegt der sich verkleinernde Fetttropfen meistens exzentrisch, und in den nebeneinander befindlichen Zellen geht die Verkleinerung des Fetttropfens nicht auf einmal vor sich. Nebeneinander kommen Fettzellen vor, in denen sich der Kern bereits im Zentrum befindet, und solche, in denen noch kaum eine Verkleinerung des Fetttropfens stattgefunden hat (Abb. 1, 2, 3 und 4).

An der Grenze der sich verkleinernden Fettvakuole ist mit PAS-, MALLORY- oder Toluidinblaufärbung an der Grenze der ursprünglichen Fettzelle eine sich auf den ganzen Umfang des Querschnitts ausdehnende oder an der Grenze der Fettvakuole in Halbmondform erstreckende, heller gefärbte Zone zu sehen. An der Oberfläche derselben Zelle kommen oft mehrere derartige halbmondförmige Zonen vor (Abb. 5 und 6). Diese Halbmonde sind entweder ziemlich homogen, oder enthalten feine, durchschnittlich 1 μ große Granula, die mit PAS-, Toluidinblau-, MALLORY- und FISCHLERscher Färbung nachgewiesen werden können (Abb. 7). Infolge Verkleinerung des Fetttropfens vergrößern sich die Halbmonde und nach Verschwinden des Fetttropfens sind auch Zellen vorzufinden, deren ganzes Protoplasma mit feinen Granula angefüllt ist. Diese feinen Granula lassen sich mit Fettfärbungsmitteln nicht darstellen, aber auch in dem paraffineingebetteten Material nachweisen.

An der Grenze der sich verkleinernden Fettvakuole vermag man demnach die feinen Granula am besten mit der FISCHLERschen Fettsäurefärbung nachzuweisen (Abb. 8). Bei Anwendung der FISCHLERschen Fettsäurefärbung färbt sich bekanntlich auch die Lipoproteinhülle der Erythrozyten. Ebenso färbt sich auch der Kalk. Obschon LISON die FISCHLERsche Fettsäurefärbung nicht für elektiv hält, glauben wir, daß es sich in Analogie zur Lipoproteinhülle der Erythrozyten bei den mit der FISCHLERschen Färbung in den Fettzellen nachgewiesenen feinen Granula um Fettsäure bzw. an Protein gebundene Fettsäure handelt. Wahrscheinlich erfolgt der Fetttransport aus den Fettzellen in Form dieser Granula.

ORSÓS konnte mit der ACHUCARRO—RANKEschen Imprägnation zwei verschiedene argyrophile Netze in den Fettzellen nachweisen. Das eine,

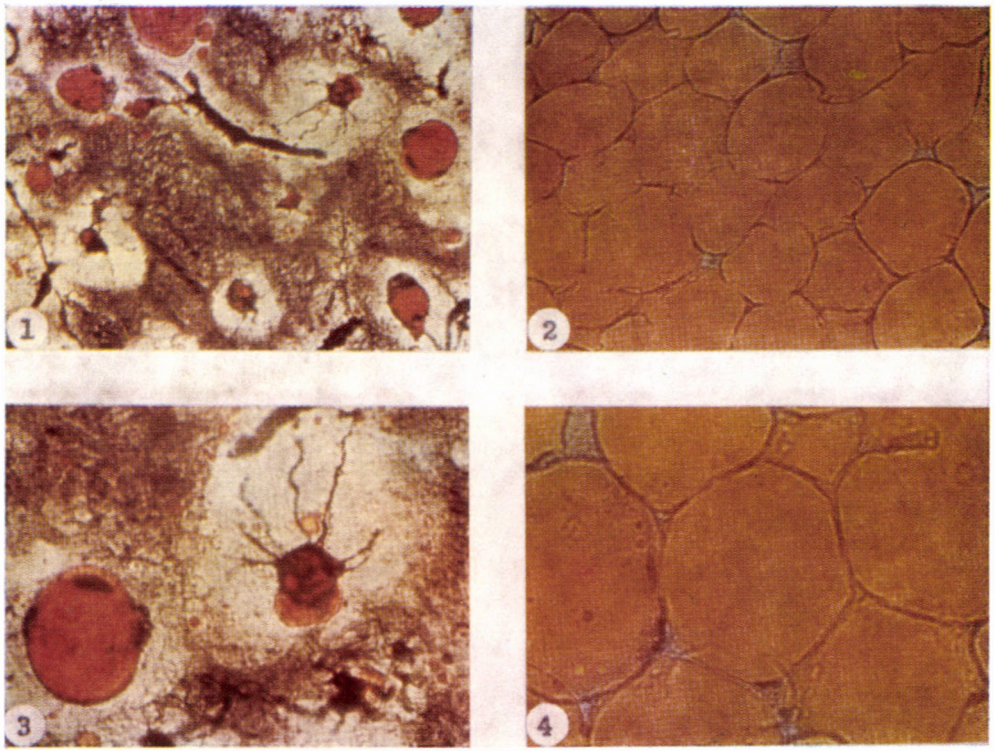


Abb. 1. Das Bild der Fettmobilisierung im Knochenmark. *Gömöri*sche Silberimprägnation in Kombination mit Sudan III
Abb. 2. Intakte Fettzellen des Knochenmarks. Vergrößerung wie Abb. 1
Abb. 3. Verschiedene Grade der Mobilisierung in stärkerer Vergrößerung
Abb. 4. Intakte Fettzellen. Vergrößerung wie Abb. 3

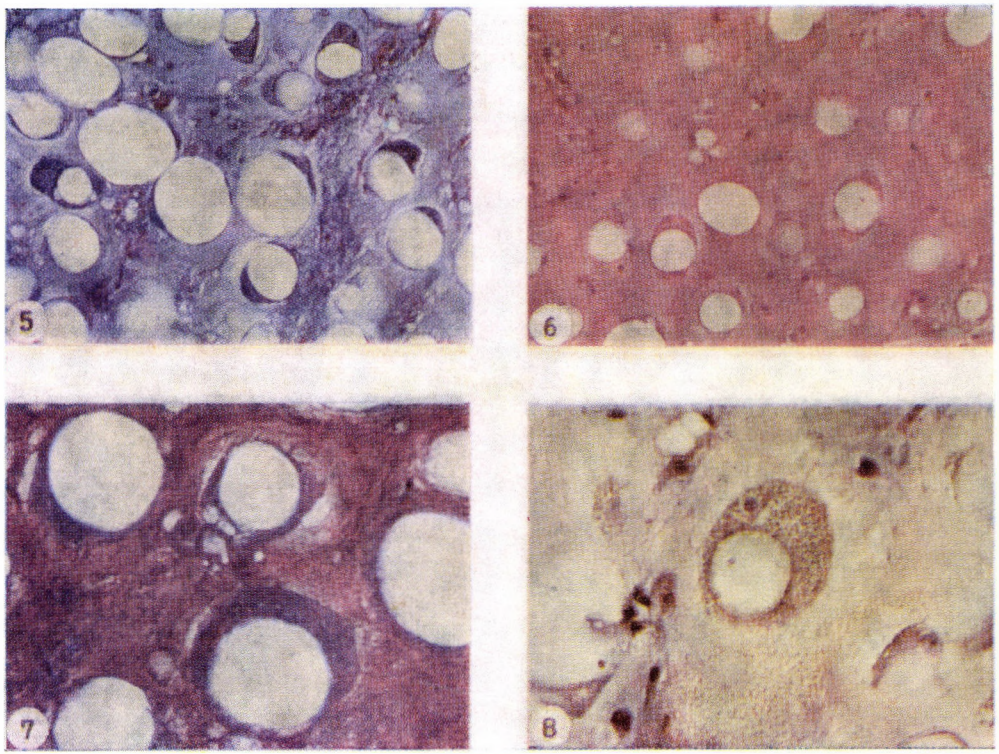


Abb. 5. An der Grenze der sich verkleinernden Fettzelle halbmondartige Gebilde. Färbung nach *Mallory*
Abb. 6. Dasselbe wie in Abb. 5. PAS-Färbung
Abb. 7. Dasselbe wie in Abb. 5. Toluidinblau-Färbung
Abb. 8. Die *Fischler*sche Fettsäurefärbung zeigt deutlich den Kern der Fettzelle und die feinen Granula rings um die Fettvakuole

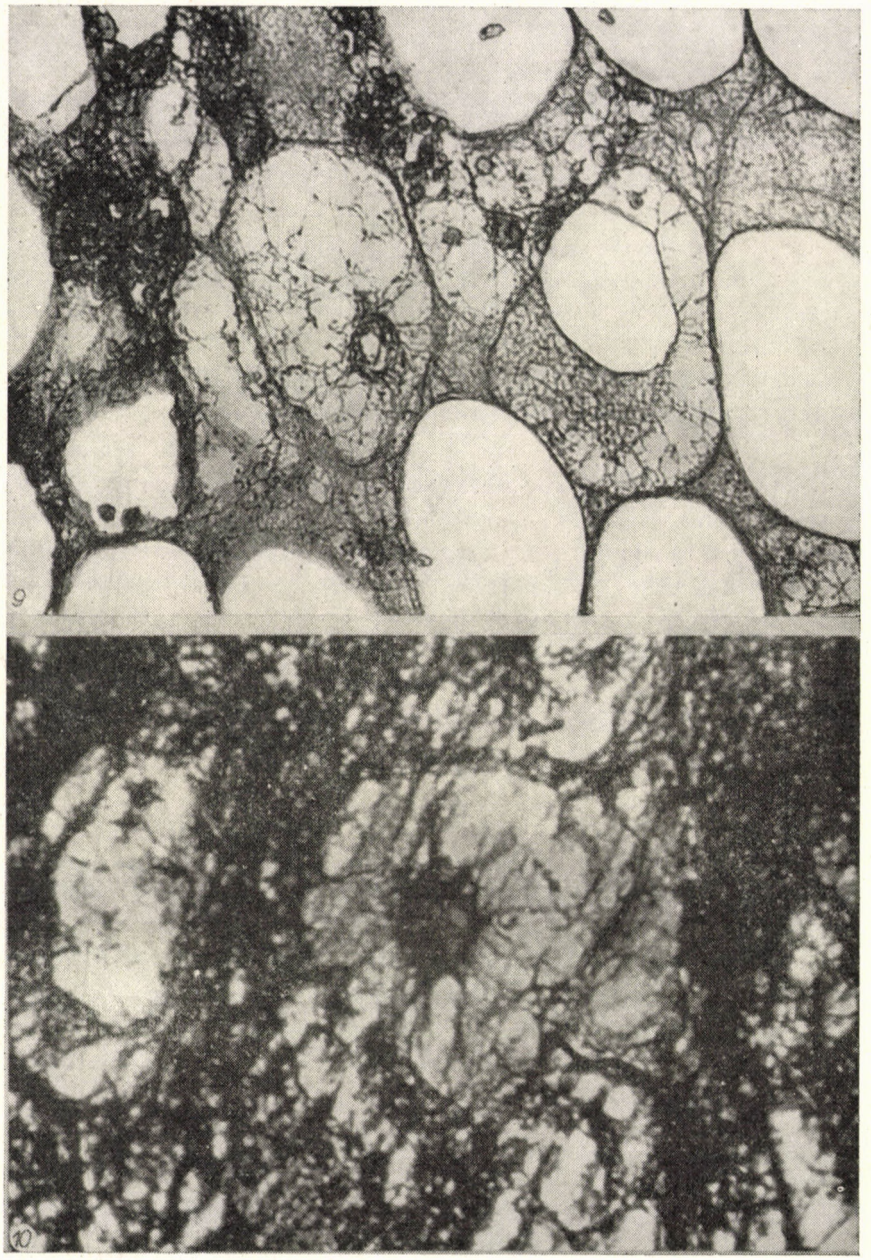


Abb. 9. Hier sind hauptsächlich zwei Fettzellen beachtenswert. Aus einer ist das Fett ganz verschwunden, der Kern liegt im Zentrum; bei der anderen sieht man um die verkleinerte, aber herausgelöste Fettvakuole das mit der Silberimprägnation nach *Gömöri* dargestellte feine Netz

Abb. 10. Spinnenförmige Fettzelle, aus der das Fett infolge Mobilisierung verschwunden ist

welches ORSÓS perivakuoläres Netz nennt, liegt um den Fetttropfen und hat gröbere Struktur. Das perivakuoläre Netz scheint mit der Zone identisch zu sein, die den sich verkleinernden Fetttropfen umgibt oder in Form von Halbmonden erscheint. Das andere Netz, das wir mit den Beinen der Spinne verglichen haben (Abb. 9) und ORSÓS als Drainröhrchen bezeichnete, befindet sich im peripheren Abschnitt der ursprünglichen Fettzelle. In oder außerhalb der perivakuolären Zone sind keine Fetttropfen anzutreffen. Die an der Peripherie der in Umwandlung begriffenen Fettzelle befindlichen Fortsätze, die Beine der Spinne, sind unserer Meinung nach keine Kanäle, sondern einfach Fortsätze der mesenchymalen Zelle, die mit dem die Fettzellen umgebenden retikulären Bindegewebe in Verbindung stehen (Abb. 10).

Allem Anschein nach kommt dem Tempo der Fettmobilisierung große Bedeutung zu. Auf Grund des histologischen Bildes muß angenommen werden, daß die Fettmobilisierung in raschem Tempo vor sich gehen kann. In diesem Falle üben die Zersetzungsprodukte Reizwirkung aus, und es bildet sich fibrinöses Exsudat. Hin und wieder können mit Fibrinfärbung große Massen von Fibrinfäden nachgewiesen werden. Anderseits läßt sich besonders in Gebieten, wo sich kein reines Fettgewebe befindet, sondern inmitten des Fettgewebes auch Inseln von rotem Knochenmark vorkommen, die Degeneration der Erythrozyten feststellen, die sich in ihrer Hämolyse manifestieren kann. ORSÓS schrieb, daß das Ektoplasma der Fettzellen die benachbarten Markzellen umschließt und verdaut. Die Hämolyse der Erythrozyten muß auf Grund der von Hämoglobin gefärbten Tümpel vorausgesetzt werden, die mikroskopisch klein, aber mitunter auch so ausgedehnt sind, daß sie dem gallertartigen Knochenmark einen himbeergeleeartigen Charakter verleihen. Hierbei kommt es neben der ödematösen Imbibition des Knochenmarks zum völligen Verblassen der Erythrozyten im roten Knochenmark, oder zwischen den Fibrinfäden zeigen nur einzelne eosingefärbte Flecke mit verschwommener Grenze den Platz der Erythrozyten im Serum an. Die Myeloidelemente im ödematösen Knochenmark bleiben eher erhalten, doch kommen Gebiete vor, wo nur ausgelaugte Erythrozyten und unter diesen Myeloidzellen nur vereinzelt anzutreffen sind. Zur Zeit der Fettmobilisierung dürfte das beim Fettabbau entstehende Glyzerin bei der im Knochenmark vor sich gehenden Hämolyse eine Rolle spielen.

Besprechung

Die Fettmobilisierung im Fettdepot könnte man sich nach zwei Mechanismen vorstellen. 1. Es wäre denkbar, daß das Fett aus dem Fettgewebe in Form feiner Tropfen in die Blutkapillaren gelangt. In diesem Fall müßte sich das in den Fettzellen enthaltene Fett emulgieren. 2. Oder das in den Fettzellen

befindliche Fett spaltet sich in Glyzerin und Fettsäure, und die Spaltungsprodukte verlassen die Fettzelle.

Einen Teil der im Blutplasma anwesenden Fettsäuren, der 5—10% sämtlicher Fettsäuren ausmacht, hat man freie Fettsäure genannt. Dieser Fraktion hat man früher keine Bedeutung zugeschrieben. Statt der Bezeichnung »freie Fettsäuren« benutzt DOLE [5, 6] neuerdings den Ausdruck »nicht esterifizierte Fettsäure«. Nach DOLE sind diese Fettsäuren im Blut an Albumin gebunden, und durch diese Beziehung werde die toxische Wirkung der Fettsäuren vom Organismus abgewehrt. Nach dem Ultrazentrifugieren sind die nicht esterifizierten Fettsäuren in der Albuminschicht enthalten, und bei der Papierelektrophorese wandern sie ebenfalls mit dem Albumin. Nach Insulin- oder Glukoseverabreichung kommt es zur Verminderung, nach Adrenalingabe zur Vermehrung der nicht esterifizierten Fettsäuren im Plasma. Wie bereits erwähnt, verursacht Adrenalin Fettmobilisierung. DOLE nimmt an, die Fettwanderung aus den Fettzellen des Depots erfolge in Form nicht esterifizierter Fettsäure, d. h. Triglyzerid werde in Form nicht esterifizierter Fettsäure mobilisiert.

Die Untersuchungen von GORDON und CHERKES [10, 11] zeigten, daß der nicht esterifizierte Fettsäuregehalt im Serum des Menschen nach einer Adrenalininjektion sogleich ansteigt. Daraus geht hervor, daß Adrenalin direkt auf das Fettgewebe wirkt und die Hydrolyse der Triglyzeride fördert, wodurch Fettsäure freigesetzt wird.

Bei der Untersuchung des Fettgewebes von Ratten in vitro gelangten GORDON und CHERKES zu derselben Feststellung. Sie hielten das Fettgewebe in einem geeigneten Medium 4 Stunden bei 37° C, und als sie Adrenalin zugaben, trat die signifikante Erhöhung des Gehalts an nicht esterifizierter Fettsäure ein. Nach den eigenen Untersuchungen werden bei Fettmobilisierung die Fettvakuolen der Fettzellen nicht emulgiert, sondern sie verkleinern sich allmählich. An der Grenze der sich verkleinernden Fettvakuolen lassen sich mit FISCHLERscher Fettsäurefärbung feine Granula nachweisen, die nur durch Fettspaltung entstehen können. Diese Granula können mit Fettlösemitteln nicht ausgelöst werden; es muß daher angenommen werden, daß sich die aus dem Fettabbau stammenden Fettsäuren an das Eiweiß des Transsudates binden, das den Platz des gespaltenen Fetts einnimmt, und der Transport der Fettsäure auf diese Weise erfolgt.

F. MIESCHER [18, 19] hat 1880 festgestellt, daß der Rheinlachs, während er in der Laichzeit aus dem Meer in den Fluß wandert, keine Nahrung aufnimmt, sondern aus der Liquidation seiner Fett- und Eiweißstoffe lebt. Laut MIESCHER beruht die Liquidation des Fetts und der Organeiweiße auf der infolge Veränderung der Blutverteilung zustande kommenden Anämie.

Zusammenfassung

Das gallertartige Kochenmark entspricht dem schwersten Grad der Fettmobilisierung. Aus diesem Grunde lassen sich die Erscheinungen der Fettmobilisierung am besten im gallertartigen Knochenmark untersuchen. Obschon es in jedem Fettdepot zur Fettmobilisierung kommen kann, treten ihre Erscheinungen im Gallertmark deshalb so ausgeprägt zutage, weil angesichts der Stabilität des Knochenmarks durch das Verschwinden des Fetts Oedema ex vacuo entsteht.

Obgleich das Gallertmark oft im hohen Alter vorkommt und auf Marasmus beruhen kann, läßt es sich dennoch nicht als senile Veränderung bezeichnen, weil es als Folge von Inanition und Kachexie auch im jugendlichen Alter beobachtet wird.

Die sich infolge der Fettmobilisierung in der Fettzelle verkleinernde Fettvakuole wird nicht emulgiert, und das Fett tritt nicht in Form feiner Tropfen in die Kapillaren ein, sondern durch die Fettspaltung wird Fettsäure freigesetzt, die sich an das Transsudateiweiß bindet und so in die Kapillaren gelangt. Die Fettzelle, aus der das Fett ausgetreten ist, gestaltet sich zu einer Mesenchymzelle, und der Raum zwischen ihren Fortsätzen ist mit Blutserum angefüllt. Zur Zeit der Fettmobilisierung können im Knochenmark weder saure noch neutrale Mukopolysaccharide nachgewiesen werden, doch scheiden aus dem fibrinogenreichen Serum Fibrinfäden aus. Die Fettmobilisierung geht in rascherem oder langsamerem Tempo vor sich. Im Falle rascher Mobilisierung sind im roten Knochenmark auf Hämolyse deutende Erscheinungen anzutreffen.

LITERATUR

1. Anselmino, K. J.—Hoffmann, F. (1931): Das Fettstoffwechselhormon des Hypophysenvorderlappens. I. Klin. Wschr. *10*, 2380. — 2. Askanazy M. (1927): Aus der Pathologie des Fettmarks. In Henke und Lubarsch, Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie. Springer, Berlin. I/2, S. 845. — 3. Beznak, A. —Hasch, Z. (1937): Quart. J. exp. Physiol. *27*, 1. — 4. Campbell, J.—Best, Ch. H. (1956): Physiologic Aspects of Ketosis. Metabolism *5*, 95. — 5. Dole, V. P. (1956): A Relation Between Non-Esterified Fatty Acids in Plasma and the Metabolism of Glucose. J. clin. Invest. *35*, 150. — 6. Dole, V. P. (1958): Transport of Non-Esterified Fatty Acids in Plasma. In Chemistry of Lipids as related to Atherosclerosis. Ed. Irvine H. Page, Thomas, Springfield. S. 189. — 7. Dömösi, P.—Egyed, M. (1939): A cholesterin felszívódása házinyulak tápcsatornájából vizes suspensio alakjában. Magy. Orv. Arch. *40*, 242. — 8. Dragstedt, L. R.—Van Prohaska, J.—Harms, H. P. (1936): Observation on a Substance in Pancreas (A Fat Mobilizing Hormone) Which Permits Survival and Prevents Liver Changes in Depancreatized Dogs. Amer. J. Physiol. *117*, 175. — 9. Engel, F. L.—Engel, M. G.—McPherson, H. T. (1957): Ketogenic and Adipokinetic Activities of Pituitary Hormones. Endocrinology *61*, 713. — 10. Gordon, R. S.—Cherkes, A. (1956): Unesterified Fatty Acid in Human Blood Plasma. J. clin. Invest. *35*, 206. — 11. Gordon, R. S.—Cherkes, A. (1958): Production of Unesterified Fatty Acids from Isolated Rat Adipose Tissue. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) *97*, 150. — 12. Hoffmann, F.—Anselmino, K. J. (1931): Das Fettstoffwechselhormon des Hypophysenvorderlappens. II. Klin. Wschr. *10*, 2383. — 13. Hofmeister, F. (1912): Chemische Steuerungsvorgänge im Tierkörper. Schr. Wiss. Ges. Strassburg, H. 17. — 14. Issekutz, B. jr.—Verzár, F. (1938): Die Rolle des Hypophysenvorderlappens und der Nebenniere bei der Fettwanderung. Pflügers Arch. ges. Physiol. *240*, 624. — 15. Kuré, K.—Oi, T.—Okinaka, S. (1937): Beziehungen des Spinalparasympathicus zu der trophischen Innervation des Fettgewebes. Klin. Wschr. *16*, 1789. — 16. Mansfeld, G. (1909): Die Fette des Blutplasmas bei akuter Säurevergiftung. Pflügers Arch. ges. Physiol. *129*, 63. — 17. Mansfeld, G.—Müller, F. (1913): Der Einfluß des Nervensystems auf die Mobilisierung von Fett. Ein Beitrag zur Physiologie der Fettwanderung. Pflügers Arch. ges. Physiol. *152*, 61. — 18. Miescher, F. (1881): Über das Leben des Rheinlachses im Süsswasser. Arch. Anat. Physiol. Anat. Abteilung 193. — 19. Miescher, F. (1897): Die histochemischen und physiologischen Arbeiten. 2 Bände, Vogel, Leipzig, Bd. II, S. 192. — 20. Orsós, F. (1927): Fettgewebsstrukturen im Gallertmarke. Beitr. path. Anat. *78*, 551. — 21. Ponfick, E. (1872): Über die sympatischen Erkrankungen des Knochenmarkes bei inneren Krankheiten. Arch. path. Anat. *56*, 534. — 22. Popják, G. (1945): The Effect of Feeding Cholesterol without Fat on the Plasma-lipids of the Rabbit. The Role of Cholesterol in Fat Metabolism. Biochem. J. *40*, 608. — 23. Recklinghausen zit. Askanazy. — 24. Strandberg zit. Beznák und Hasch. — 25. Szalay, E.—Baló, J. (1960): Cholesterin adagolás házinyulaknak vizes suspensio alakjában. Kísérl. Orvostud. *12*, 630. — 26. Торская, И. В.: (1957) Влияние выключения нервных воздействий на

процессы резорбции и депонирования жира при условии изменения эндокринного фона. Физиологичний журнал Акад. Наук Украиньской ССР, т. III, № 3, 92. — 27. VERZÁR, F.—LASZT, L. (1936): Nebennierenrinde und Fettwanderung. Biochem. Z. *288*, 356. — 28. VIRCHOW, R. (1859): Die Bindegewebsfrage. Virchows Arch. path. Anat. *16*, 15. — 29. WADSRÖM, L. B. (1957): Lipolytic Effect of the Injection of Adrenaline on Fat Depots. Nature (Lond.) *179*, 259. — 30. WERTHEIMER, E. (1926): Stoffwechselregulation. I. Regulation des Fettstoffwechsels. Die zentrale Regulierung der Fettmobilisierung. Pflügers Arch. ges. Physiol. *213*, 262. — 31. WHITE, J. E.—ENGEL, F. L. (1958): A Lipolytic Action of Epinephrine and Norepinephrine on Rat Adipose Tissue in vitro. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) *99*, 375.

ПРОБЛЕМА МОБИЛИЗАЦИИ ЖИРА

Й. БАЛО

Студенистый костной мозг означает самую тяжелую степень мобилизации жира и поэтому явления мобилизации жира удобнее всего можно изучать в студенистом костном мозге. Несмотря на то, что мобилизация жира может иметь место во всех отложениях жира, ее явления в студенистом костном мозге особенно выражены по той причине, что ввиду зафиксированности костного мозга вследствие исчезновения жировой ткани возникает oedema ex vacuo.

Хотя студенистый костный мозг весьма часто наблюдается в старческом возрасте и может быть последствием истощения, все же его нельзя рассматривать старческим изменением, так как он встречается также в молодом возрасте вследствие истошения и кахексии.

Уменьшающаяся в жировой клетке вследствие мобилизации жира жировая вакуоля не эмульгируется, и жир вступает в капилляры не в виде мелких каплей, а в результате расщепления жира освобождается жирная кислота, которая, присоединяясь к белкам транссудата, вступает в капилляры. Жировая клетка, из которой жир выступил, превращается в мезенхиматозную клетку, пространство между отростками которой заполнено сывороткой. Во время мобилизации жира в костном мозге нельзя выявить ни кислых, ни нейтральных мукополисахаридов, но из богатой фибриногеном сыворотки выделяются нити фибрина. Мобилизация жира может происходить быстро или медленнее. В случае быстрой мобилизации в красном костном мозге наблюдаются явления, указывающие на гемолиз.

THE PROBLEM OF FAT MOBILIZATION

J. BALÓ

Gelatinous bone marrow represents the gravest form of fat mobilization and thus offers the best means to study the problems connected with the mobilization of fat. Although mobilization may occur in any fat depot, its signs are especially pronounced in the gelatinous marrow since — on account of the latter's fixation — the disappearance of fat occasions there oedema ex vacuo.

While medullary gelatinization often occurs in old age and may be a sequel of marasmus, it need not be regarded as a senile alteration: inanition and cachexia may induce it also in young patients.

Vacuoles in the fat cells, diminished by fat mobilization, are not emulsified, so that fat does not enter the capillaries in the form of fine droplets; the splitting of fat liberates fatty acids which enter the capillaries combined with the protein of the transudate. Fat cells depleted of fat change into mesenchymal cells, the interstices of processes are filled with serum. Neither acid nor neutral mucopolysaccharides can be demonstrated in the bone marrow during the mobilization of fat, while threads of fibrin are formed in the fibrinogen-rich serum. Mobilization of fat may be rapid or slow. Signs of haemolysis can be observed in the red marrow if the process takes a rapid course.

Prof. Dr. József BALÓ, Budapest VIII. Üllői út 26. Ungarn

Institut de Médecine et de Chirurgie expérimentales, Université de Montréal, Montreal, Canada

HISTOGENESIS OF EXPERIMENTAL CUTANEOUS CALCINOSIS*

H. SELYE and K. NIELSEN

(Received June 29, 1960)

Experimental models of disease, as produced in animals, greatly facilitate the analysis of the factors that participate in the genesis of the morbid lesions seen in the clinical counterpart; they can also serve as convenient test objects for potential therapeutic procedures. This thought guided our earlier studies on the experimental production of nephrosclerosis, periarteritis nodosa, standardized inflammatory responses ("topical irritation arthritis", "granuloma pouch"), anaphylactoid inflammation, and stress-induced peptic ulcers or cardiac necroses [1—3].

There are few corresponding experimental models of dermatoses. The reactivity of the human skin differs so essentially from that of most animals that it is difficult to establish conditions under which the latter would react like the former. Besides, few animal experimenters are sufficiently familiar with the problems of practical dermatology and, conversely, few dermatologists are well versed in the techniques of experimentation on animals.

These were the considerations that led us to attach enough importance to observations on the experimental induction of cutaneous calcinosis to present them here, as a token of our admiration for the great Hungarian experimental morphologist, Professor IMRE TÖRŐ, whose jubilee this volume celebrates.

Soon after the discovery of vitamin D, one of us (while still a medical student) undertook systematic studies on the structural changes induced by excessive amounts of irradiated ergosterol. It was found that, in adult rats, this preparation produced widespread calcification in various tissues (particularly the cardiovascular system, kidneys, lungs, and intestine), but only minor changes in the skeleton. However, the young of rats so treated during pregnancy or lactation responded to vitamin D (received through the milk or placenta) with an altogether different syndrome. In them, soft-tissue calcification was absent or negligible, but the bones became so brittle that multiple spontaneous fractures occurred; simultaneously, the skin lost its elasticity and adhered to

*This work was supported by the Gustavus and Louise Pfeiffer Research Foundation and by the U. S. Army Medical Research and Development Command, Office of the Surgeon General, Contract No. DA-49-193-MD-2039.

the subjacent tissues, so that the young rats became "hidebound" [4, 5]. Since these newborn animals also suffered from malnutrition and dehydration, we attached little importance to the skin lesions at that time and devoted our interest more to the skeletal changes.

A little later, we observed a patient in whom multiple organ calcifications — very similar to those induced in adult rats with vitamin D — developed presumably as a result of excessive endogenous parathyroid hormone secretion. As this man had a parathyroid adenoma, nephritis, and colitis, we thought that the parathyroid stimulation might be due to an adaptive hormonal reaction, an attempt to rectify calcium and phosphate metabolism when the organs normally concerned with the absorption and excretion of these materials are largely incapacitated. This interpretation could not be proven and other possibilities also had to be considered, but we thought our case might throw a new light upon VIRCHOW's classical concept of "metastatic calcification" in the presence of severe renal disease. In uremia, calcification may be largely mediated through the parathyroids as a consequence of a partly pathogenic adaptive reaction, that is, what we would now call a "disease of adaptation" [6].

Subsequent experiments showed that, in the rat, parathyroid hormone can produce a cutaneous calcinosis with sclerosis resembling a certain type of clinical scleroderma, the so-called "sclérodermie calcaire" [7]. This condition can also be produced in the same species with dihydrotachysterol (DHT), a vitamin-D derivative that closely imitates the actions of parathyroid hormone [8]. However, whether produced by parathyroid hormone or by DHT, these cutaneous lesions are not practical models of disease; they are accompanied by high mortality, develop only on the scalp and neck (not wherever the experimenter wants to induce the lesions), and occur only during the first few days of life, and even at that, irregularly. Still, these observations were repeatedly confirmed by others and eventually induced LERICHE and co-workers [9—11] to remove the parathyroids in patients with severe scleroderma. The results of this operation were rather inconstant, but in some cases, marked improvement did occur.

In view of what we have since learned about the importance of "conditioning factors" in the determination of adaptive hormonal reactions [1, 12], it seemed that further work on this experimental simile of calcareous scleroderma would be rewarding if the technique could be perfected. Continuation of this work revealed that topical trauma can cause local calcification in the internal organs of DHT-treated rats [13]. Clinical scleroderma also tends to develop at sites of local injury [14]. Therefore, we were particularly interested to note that cutaneous calcinosis with sclerosis can be produced at will in predetermined skin regions, even in adult rats, if the selected area is lightly traumatized (*e. g.*, by epilation) at a critical time of DHT-treatment (usually the fourth day) [15].

The present communication reports detailed studies on the histogenesis of this peculiar experimental dermatosis.

Materials and techniques

Twenty-four female Sprague-Dawley rats, with a mean initial body weight of 100 g (range: 96—104 g), were given 200 μg of DHT ("Calcamin," Wander) in 0.5 ml of corn oil by stomach tube, once daily, on four consecutive days. On the fourth day, a dual type of trauma was produced in each of these animals by epilation and mechanical compression of the skin. Epilation was performed by plucking the hair from an area of the back approximately 60 mm in length (craniocaudally) and 30 mm in width. The remaining dorsal hair was then shaved with electric clippers and compression trauma was applied by pinching the skin with a hemostat (at right angles to the longitudinal axis of the animal) twice on the epilated area and once below it on the shaved surface. These two types of trauma were applied because preliminary experiments had shown that, in DHT-sensitized animals, cutaneous calcinosis is most readily obtained by mild irritation (*e. g.*, epilation or rubbing with a hard brush), while strong trauma (*e. g.* prolonged squeezing with a hemostat or intracutaneous injection of strong irritants) is ineffective locally, although it may elicit a halo of calcinosis in the immediately surrounding skin area (Fig. 1).

For control purposes, similar trauma was applied in a series of rats not previously sensitized by DHT. However, in these, calcification never occurred and the reaction of the skin was limited to mild desquamation in the region injured with the hemostat.

Throughout the experiment all animals received only "Purina Fox Chow" (Ralston Purina Co., Ltd.) and tap water. For histologic study, three of the DHT-treated rats were killed immediately after trauma (on the fourth day of DHT treatment) and three more 2, 4, 6, 8, 10, 15, and 20 days later, respectively. Immediately after autopsy, one-half of the traumatized region was fixed in alcohol-formol (80% alcohol and 20% of the standard [10%] neutral formalin solution), which is particularly suitable for demonstrating traces of tissue calcium [16]. The other half of each tissue specimen was fixed in Susa solution saturated with picric acid, a fluid we found to be particularly suitable for connective-tissue studies, especially as related to the skin.

The material was subsequently embedded in paraffin and sectioned at 5 μ. Normally, rat skin so treated is very brittle and difficult to cut, but excellent thin sections can be obtained if the paraffin blocks are first cooled by contact with solid blocks of carbon dioxide snow.

Eleven staining techniques were used: (1) hematoxylin-phloxine, (2) PAS, (3) Van Gieson, (4) phosphotungstic acid fibrin, (5) fuchsin, (6) cresyl violet, (7) elastica, (8) mucicarmine, (9) von Kóssa, (10) celestin blue, (11) osmic acid. For the first seven of these techniques, we used material fixed in either alcohol-formol or Susa-picric, but only alcohol-formol-fixed slices were stained with mucicarmine (for the demonstration of mucoid material), von Kóssa, or celestin blue (for the demonstration of calcium). Osmication was employed for the detection of fats.

Most of these are standard techniques, so we may limit ourselves here to a description of the two procedures that were specially developed for this study.

Celestin-blue staining technique (for calcium). — (1) Fix for 48 hours in alcohol-formol solution; (2) Embed in paraffin; (3) Bring sections to water, as usual; (4) Mordant for 30 minutes in following solution: 90 ml aluminium-potassium sulfate 1% + 10 ml of 1/100 dilution of ammonium hydroxide 28%; (5) Rinse in running water, 2 minutes; (6) Stain 30 minutes in following solution, prepared on day of use: celestin blue B 0.02% in alcohol 50%; (7) Rinse in running water; (8) Counterstain lightly in phloxine or eosin; (9) Dehydrate and mount.

Fuchsin staining technique (for skin). — (1) Fix for 24 hours in Susa saturated with picric acid; (2) Embed in paraffin; (3) Deparaffinize and treat sections with iodine and thiosulfate in the usual manner; (4) Oxidize, 1 minute, in permanganate 0.25% + sulfuric acid 0.5%; (5) Rinse in running water; (6) One minute in oxalic acid 3%; (7) Rinse in running water, 10 minutes; (8) Fifteen seconds in alcohol 70%; (9) Stain (length of time depending upon age of solution: 10 minutes in 3—4 days-old solution) in Gomori's aldehyde fuchsin until elastic fibers stand out clearly; (10) Rinse in 3 changes of alcohol 70%; (11) Rinse in running water, 5 minutes; (12) Five minutes in 1 gm Wright's prepared powder in 2000 ml distilled water; (13) Rinse in running water, 1 minute; (14) Fifteen minutes in phosphotungstic acid 1%; (15) Rinse in running water, 1 minute; (16) Thirty minutes in following solution: 90 ml distilled water + 8 ml acid fuchsin 1% + 2 ml oxalic acid 1%; (17) Rinse rapidly in

one change of distilled water and 2 changes of absolute alcohol; (18) Fourty minutes in a saturated solution of saffron in absolute alcohol; (19) Rinse rapidly in absolute alcohol and in 3 changes of xylol, and mount.

Results

All the DHT-treated rats developed more or less intense cutaneous calcinosis at the site of trauma. The lesions were essentially of the same type throughout, so in our description we need not discuss the response to epilation and to compression, separately. It is noteworthy, however, that only epilation gave pronounced and constant results. Where epilated skin was compressed, a band corresponding to the thickness of the hemostat remained protected in the otherwise massively calcified patch. On the other hand, the same degree of skin compression, when applied to shaved skin, actually produced calcification. Apparently, the mild damage caused by epilation alone or pinching alone elicits calcium deposition, while the stronger injury that results from the combination of these agents inhibits it.

This interpretation was confirmed by a number of additional experiments (not described here in detail), in which we produced various degrees of skin trauma by applying the hemostat for varying lengths of time or by intracutaneously injecting varying concentrations of chemical irritants. It was found, for example, that if the hemostat is applied for more than 20 seconds to the shaved, not epilated, skin of a DHT-sensitized animal, the directly traumatized area does not calcify, but a halo of cutaneous calcinosis appears around it. If, on the other hand, a 10% aqueous solution of egg-yolk is injected intracutaneously, calcification does not appear in the central area (which was presumably exposed to the greatest amount of damage), but a ring of cutaneous calcinosis appears around the margin of the treated patch, so that a regular, circinate lesion is formed (Fig. 1).

For the sake of simplicity, we shall limit our description to changes observed in merely epilated skin regions as they appear when the most instructive staining techniques are employed. The first obvious signs of calcinosis were seen in skin specimens taken on the second and fourth days after trauma. Here, there was edema of the cutis and subcutis, with only very occasional inflammatory cells, but fine calcium deposits could be detected around the dermal collagen and elastic fibers with the von Kóssa and celestin blue stains (Figs. 2, 3 and 12). In other cases — and sometimes in other regions of the same skin specimen — the calcification commenced in the hair follicles, leaving the connective-tissue elements intact (Figs. 4 and 5). These differences in the early distribution of the calcium deposits may depend upon accidental variations in the intensity of the trauma inflicted on diverse structures.

There were some individual variations in the speed with which the skin

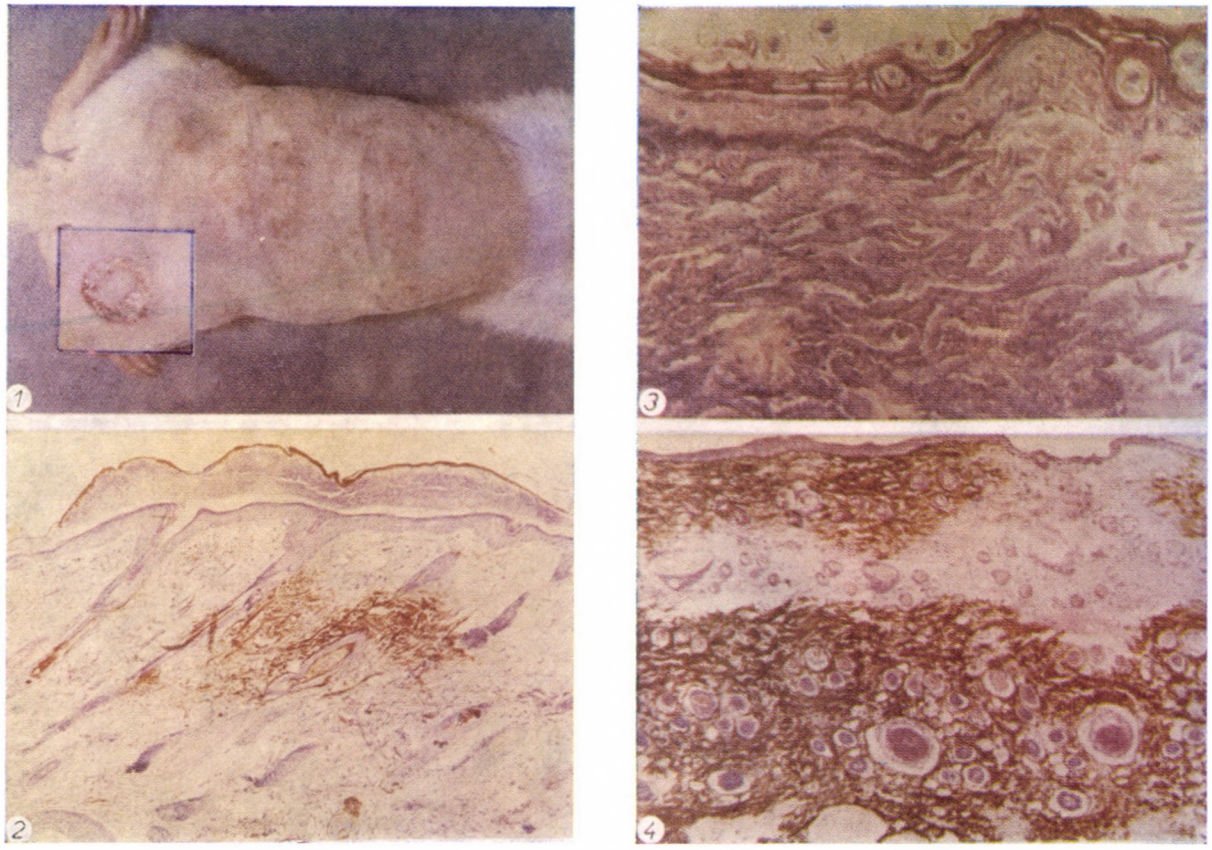


Fig. 1. — Halo of cutaneous calcinosis surrounding each of three linear hemostat pinches. The directly traumatized area itself is not affected. *Insert in lower left corner:* Circinate exulcerating cutaneous calcinosis, in another rat, on the margin of a skin patch infiltrated with 10% egg-yolk

Fig. 2. — Beginning calcification of slightly swollen dermal collagen fibres. Pronounced parakeratosis with calcification in the most superficial layer of the exfoliating skin (von Kóssa, ×110)

Fig. 3. — Beginning calcification of dermal collagen fibres. The celestine blue stain clearly shows that, in addition to diffuse calcium deposition, regular, round or oval granules of lime salts appear within the collagen fibres. Additional calcium deposits are seen along the basement membrane of the epidermis (Celestine blue, ×490)

Fig. 4. — Calcification of the dermal connective tissue is very pronounced and reaches deep into the derma, but avoids the hair follicles (von Kóssa, ×110)

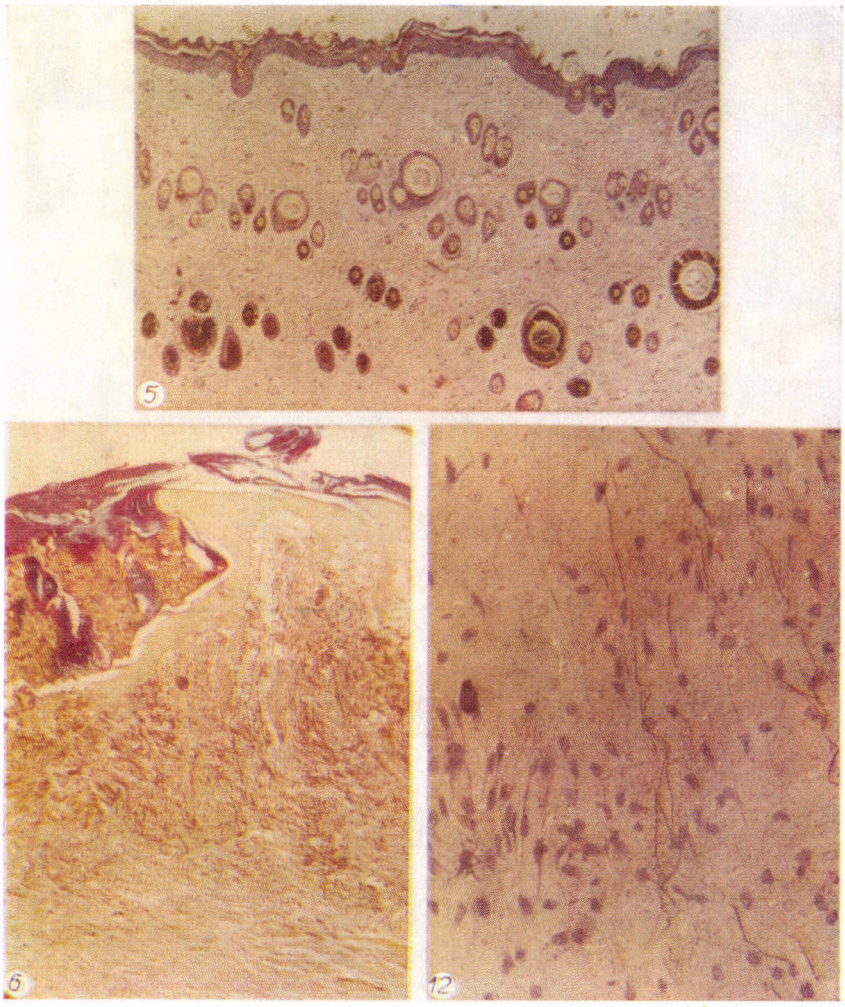


Fig. 5. — Skin region adjacent to that shown in Fig. 4. Here, there is selective calcification of the hair follicles, while the connective tissue is spared (von Kóssa, ×110)

Fig. 6. — Advanced exulceration with beginning epithelialization of the wound surface. The normal collagen fibers (center) stain red; the swollen, degenerating fibers (edge of the field) take on a yellowish tinge (Fuchsin stain, ×110)

Fig. 12. — One normal and one disintegrating mastocyte near lower edge of the field. Mastocyte granules are also diffusely distributed throughout the tissue in this region in which the elastic fibers have undergone selective calcification. The mastocyte granules (particularly in the mastocytes themselves) stain distinctly purple with the hematoxylin-phloxine counterstain. The mast cells and granules have been identified on adjacent sections by their metachromatic staining with cresyl violet and the elastic fibers by the phosphotungstic-elastica stain (von Kóssa, ×490)

lesions developed, but the changes just mentioned were fully apparent by the fourth day and gave way to more severe lesions between the sixth and fifteenth days. By then, the collagen fibers began to swell and often formed closely packed, solid masses within the derma; at the same time, their tinctorial properties changed. This was particularly obvious on sections stained with our fuchsin stain, which colors normal collagen fibers a bright red, while the affected swollen collagen takes on a yellowish tinge (Fig. 6). At the same time, the elastic fibers of the cutis become fragmented and eventually disappear, while large masses of calcium are being taken up by the damaged tissue.

This process progresses and eventually leads to complete necrosis in the more seriously affected regions, which subsequently exulcerate. Over the least markedly affected skin regions, there is merely intense desquamation with parakeratosis and hyperkeratosis, but when exulceration occurs, the epithelium tends to creep under the necrotic skin regions, so as to cover the underlying healthy derma (Fig. 6). If necrosis progresses farther into the deeper strata of the cutis, then on the surface, the epithelium grows down along the edge of the ulcer and tends to turn around following the borderline between the healthy and necrotic tissue. Thereby apparently, the epidermis attempts to cover the undersurface of the still healthy, superficial skin layer. Consequently, the strata of the newly-formed epithelium are reversed; the stratum malpighii is closest to the surface and in contact with the still healthy, superficial part of the derma, which, on the outside, is also covered by the original epidermis (Fig. 7). This tendency for the epidermis to creep down along the newly-created wound surfaces sometimes results in highly irregular, almost neoplasm-like, epithelial formations. However, these changes occur only where the dermal lesions exulcerate and, even there, they disappear after the necrotic parts are eliminated.

At the height of its development, cutaneous calcification may affect all layers of the derma and even result in the formation of large subcutaneous calcareous masses (Figs. 8 and 9). These resemble the calcium deposits seen in certain types of calcareous scleroderma or exulcerating acrosclerosis.

By the 15th or 20th day, all the heavily calcified, superficial regions are usually extruded, while isolated, deep deposits of calcium tend to become surrounded by a granuloma, which often contains foreign-body giant cells and gradually absorbs the mineral deposits. During this final stage of healing, there is intense proliferation of fibroblasts and connective-tissue fibers. The surface epithelium is greatly thickened and desquamating, but the cutaneous appendages are slow to regenerate. Hence, at this time, the skin consists of a thick epidermis and an underlying, rather homogeneous, dense layer of connective tissue, almost totally devoid of fat cells, hair, and sebaceous glands (even normal rat skin contains no sweat glands); cutaneous papillae are flattened or absent (Figs. 10 and 11).

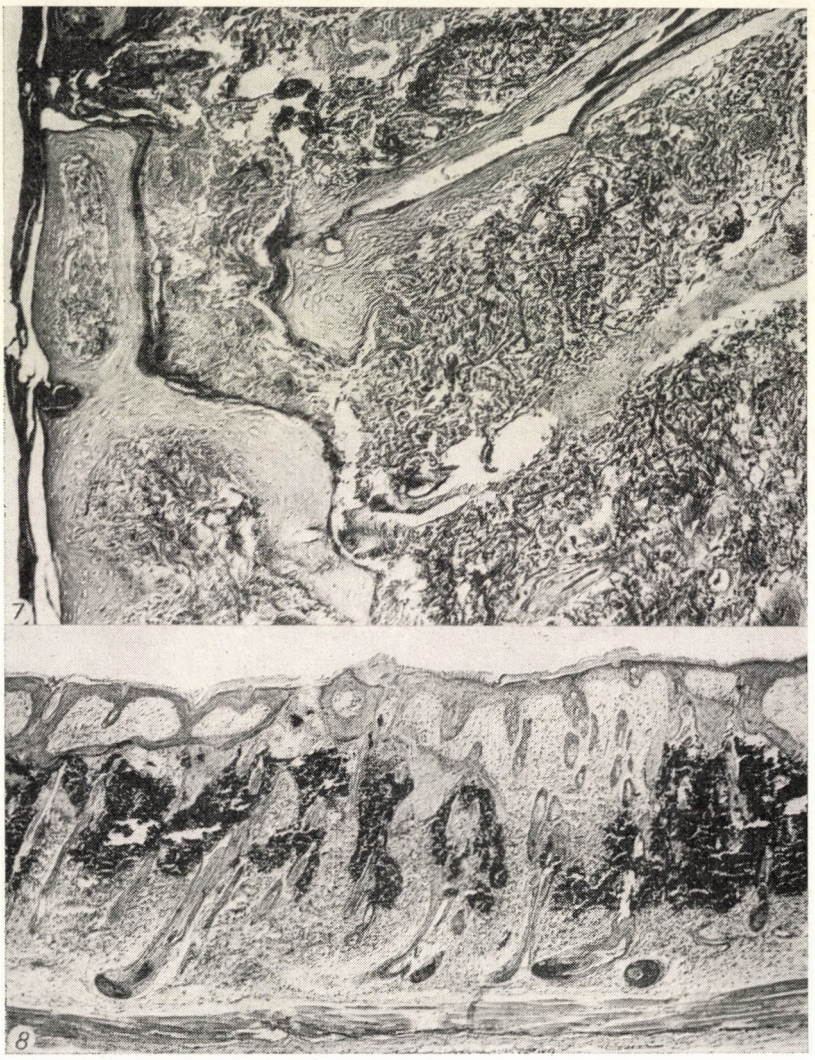


Fig. 7. — Here, the necrosis progresses farther in depth than in surface. The epidermis turns around the edge of the ulcer following the borderline between healthy (superficial) and necrotic (deep) tissue; consequently, the strata of the newly formed epithelium are reversed (Fuchsin stain, ×110)

Fig. 8. — Intense cutaneous calcification affects all layers. The process of "reverse epithelialization" is especially obvious (von Kóssa, ×30)

In comparing the experimental dermatosis with clinical scleroderma, it is important to bear in mind that, in man as in the rat, there may be calcification without sclerosis and *vice versa*. In the rat, the lesion roughly evolves in three stages: (1) edema with slight inflammatory in-

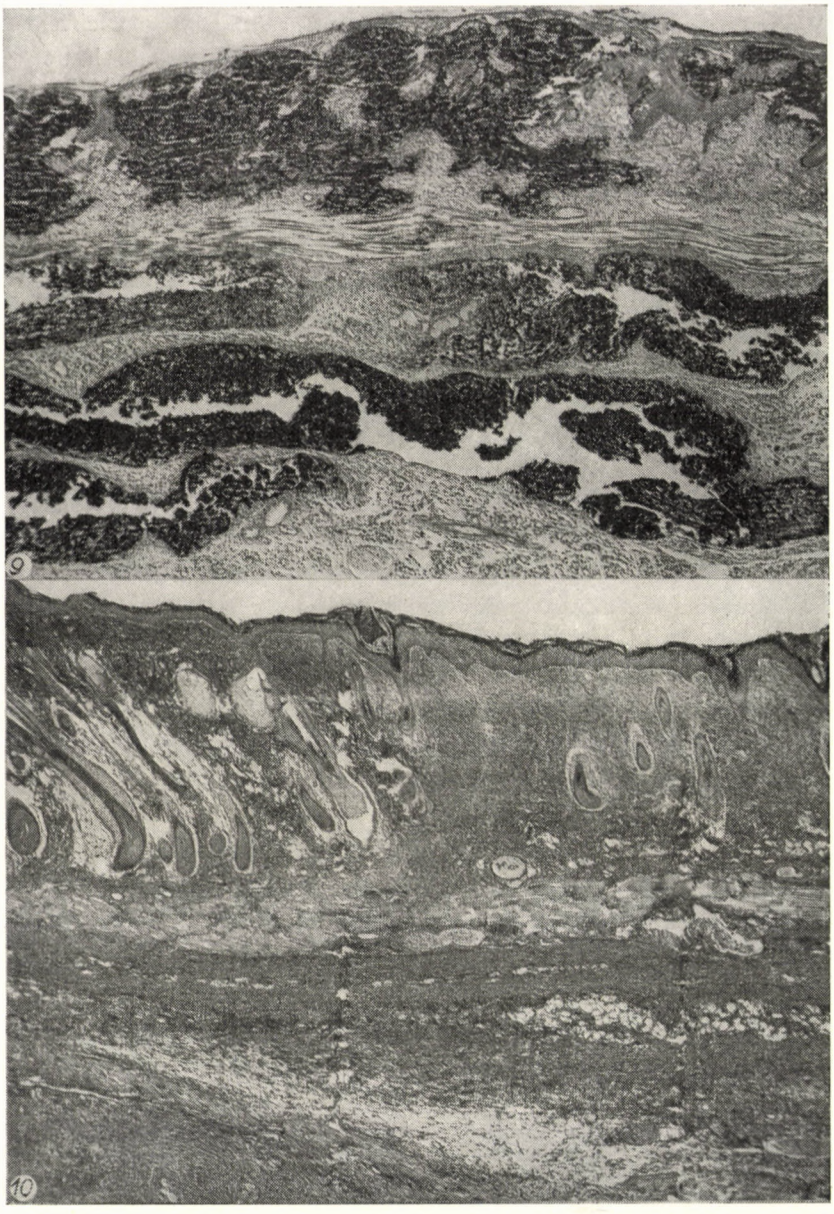


Fig. 9. — Extensive subcutaneous calcareous masses, separated from a calcified dermal patch by the skin muscle layer (von Kóssa, ×30)

Fig. 10. — Borderline between healthy and sclerosed skin during period of healing. In the affected region (left), there is dense connective tissue, sebaceous glands are absent, hair follicles rare, and the epidermis is thickened (Fuchsin stain, ×30)

filtration, (2) calcification and (3) sclerosis. Essentially, calcification appears to be an intermediate stage between the original tissue damage and the eventual healing. It remains to be seen whether minute calcium precipitates — histologically detectable only under perfect conditions of fixation and staining — or even still slighter increases in skin calcium that could only be revealed by chemical analysis, play a part in stimulating connective-tissue proliferation. Theoretically, this may be the case, not

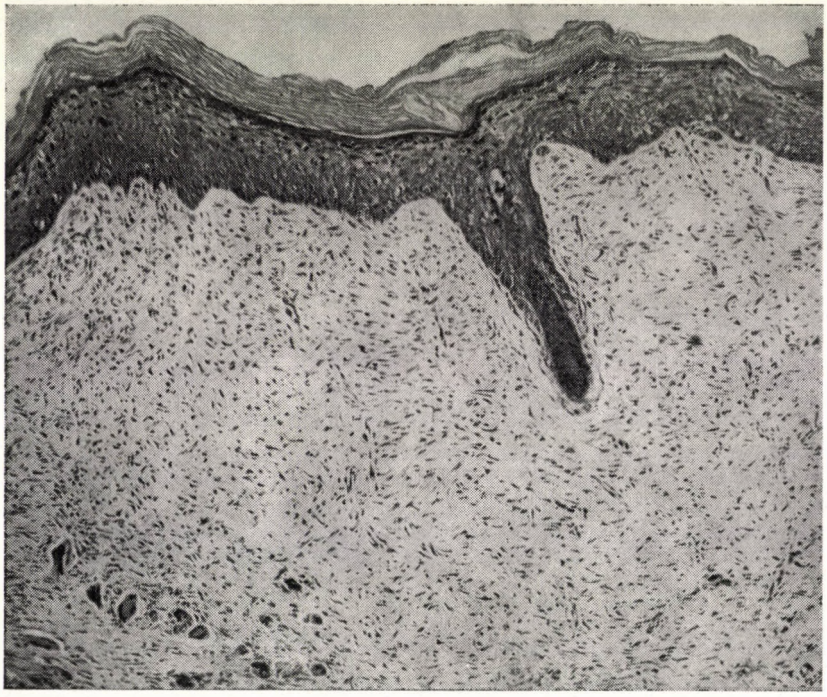


Fig. 11. — Calcium is no longer visible in the dense connective tissue of this healing patch. Only a few remaining calcified granules can be detected in the foreign-body giant cells near the lower left corner (von Kóssa, ×110)

only in scleroderma but also in other types of collagen diseases, particularly in systemic lupus erythematosus and dermatomyositis, where even grossly visible calcifications of the skin do occasionally occur.

Sections stained with hematoxylin-phloxine, PAS, Van Gieson and the elastica stain merely confirmed the previously mentioned findings. The fibrin stain colors only the calcified and necrotic areas intensely, while cresyl violet frequently reveals large numbers of often disintegrating mastocytes and free mastocyte granules in the vicinity of the damaged skin regions. Curiously, here

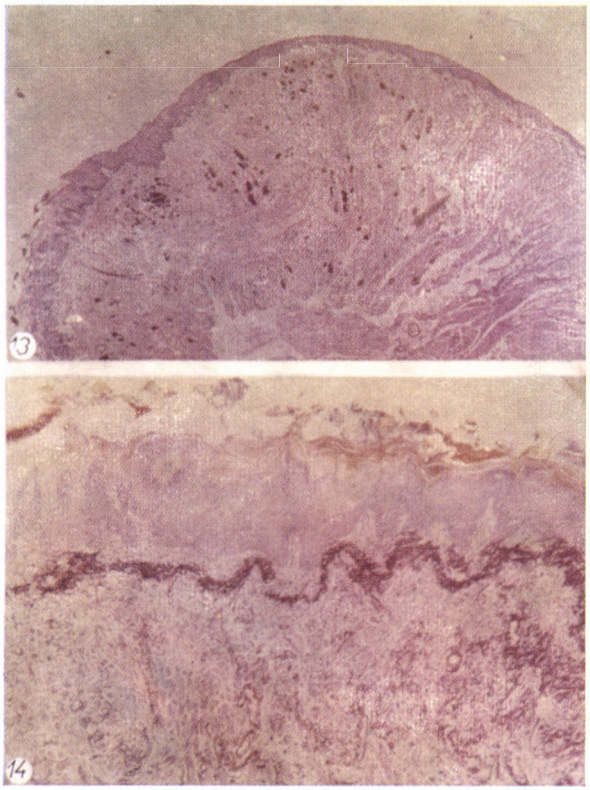


Fig. 13. — Typical lingual lesion. Some of the muscle cells are calcified, others involuted; there is marked connective-tissue proliferation and the lingual papillae are flattened (von Kóssa, ×30)

Fig. 14. — Lingual lesion in which calcification occurs predominantly underneath the epithelial surface, but to some extent, also in the proliferating intermuscular connective-tissue stroma (von Kóssa, ×110)

the mastocytes and the free mastocyte granules appear to stain slightly metachromatically even with hematoxylin (Fig. 12). Mucicarmine-tingible material was found particularly in severely damaged or necrotic skin regions. It will be recalled that mucoid substances are also found in many cases of clinical scleroderma. Osmication revealed no evidence of an initial fat deposition, preparatory to calcification.

Of all our techniques, the fuchsin stain proved to be the most informative: with it, the normal collagen fibers stain bright red (as with Van Gieson) and in addition, initial stages of degeneration show up in them by a change of the color towards yellow. Elastic fibers are stained as clearly with the elastica stain and mast cells are also quite evident. Incidentally, the technique gives excellent pictures of cross-striation in the cutaneous striated musculature.

The demonstration of calcium with the celestin blue technique deserves particular mention, since this stain does not tend to "bleed" into surrounding tissues and, hence, gives a much more precise definition than the von Kőssa stain. It is curious, however, that only the very recent calcium deposits and the borderline that delimits the calcified from normal tissue are tingible with celestine blue. Perhaps this dye is indicative, not of calcium itself, but of some chemical phenomena involved in the process of incipient calcification.

Perhaps the most noteworthy extracutaneous lesion in our rats was the rather frequent occurrence of calcification with sclerosis (and sometimes necrosis) along the lateral margins of the tongue and more or less diffusely in other parts of the skeletal musculature (Figs. 13 and 14). It remains to be seen whether there is any relationship between this change and the well-known predisposition for muscular lesions in patients with dermatomyositis and scleroderma.

Summary

In the rat, marked cutaneous calcinosis with sclerosis can be produced by topical skin trauma, following sensitization with dihydrotachysterol (DHT). The histogenesis of this lesion and its possible relationship to certain collagen diseases, especially the calcifying type of scleroderma, are discussed.

REFERENCES

1. Selye, H. (1950): Stress. Acta, Inc., Med. Publ., Montreal. — 2. Selye, H.—Horava, A.—Heuser, G. (1951—55/56): Annual Reports on Stress, vols. 1—5. Acta, Inc., Med. Publ., Montreal. — 3. Selye, H. (1958): The Chemical Prevention of Cardiac Necroses. Ronald Press Co., New York. — 4. Selye, H. (1929): Knochenveränderungen bei den Jungen Vigantol-behandelter Tiere. (Verein deutscher Ärzte in Prag, 26. Oktober 1928). Med. Klin. *24*, 167. — 5. Selye, H. (1928): Morphologische Studie über die Veränderungen nach Verfütterung von bestrahltem Ergosterin (Vigantol) bei der weissen Ratte. Krankheitsforschung *7*, 289. — 6. Selye, H. (1929): Zur Kenntnis der Kalkgicht (M. B. Schmidt) an Hand eines selbstbeobachteten Falles. Med. Klin. *10*, 379. — 7. Selye, H. (1932): A condition stimulating human scleroderma in rats injected with parathyroid hormone. J. A. M. A. *99*, 108. — 8. Selye, H. (1957): Experimental production of cutaneous calcinosis and sclerosis with dihydrotachysterol (AT-10). J. Invest. Dermat. *29*, 9. — 9. Leriche, R.—Jung, R.—DeBakey,

M. M. (1937): The surgical treatment of scleroderma. Rationale of sympathectomy and parathyroidectomy. Surgery *1*, 6. — 10. LERICHE, R.—JUNG, R.—SUREYYA, C. (1935): La peau dans l'hyperparathyroidïsme expérimental. Etude de la sclérodermie expérimentale. Presse méd. *43*, 777. — 11. LERICHE, R.—JUNG, R. (1935): Recherche sur la nature de la sclérodermie. Les traductions tissulaires de l'hyperparathyroidïsme dans la sclérodermie. Presse méd. *43*, 1361. — 12. SELYE, H.—BAJUSZ, E. (1960): A stress-kutatás újabb eredményei és a stress-elmélet szerepe a modern kórtani kutatómunkában. I. Mi a stress. Orv. Hetil. *101*, 1. — II. Kondicionáló tényezők az infarktoid cardiopathiák pathomechanizmusában. Orv. Hetil. *101*, 145. — 13. SELYE, H. (1957): Über den Einfluss lokaler Faktoren bei der Entstehung von Nierensteinen und Gewebsverkalkungen. Ztschr. Urol. *50*, 440. — 14. SELYE, H. (1932): Die Sklerodermie und ihre Entstehungsweise. Virchow's Arch. f. path. Anat. *286*, 91. — 15. SELYE, H.—JEAN, P.—VEILLEUX, R. (1960): Role of local trauma in the production of cutaneous calcinosis by dihydrotachysterol. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., *104* 409 — 16. RENAUD, S. (1959): Superiority of alcoholic over aqueous fixation in the histochemical detection of calcium. Stain Technol. *34*, 267.

ГИСТОГЕНЕЗ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО КАЛЬЦИНОЗА КОЖИ

Г. ШЕЛЬЕ и К. НИЛСЕН

При помощи кожной травмы можно на крысах после сенсибилизации дигидротахистеролом (ДГТ) вызвать значительный кальциноз кожи и склероз. Обсуждается гистогенез вызванного таким путем повреждения и его предположительная связь с определенными коллагенными заболеваниями, в частности с обызвествляющимся типом типом склеродермим.

HISTOGENESE DER EXPERIMENTELLEN HAUTKALZINOSE

H. SELYE und K. NIELSEN

An Ratten wurde nach Sensibilisierung mit Dihydrotachysterol mit Hilfe von lokaler Hautschädigung bedeutende Hautkalzinose und Sklerose hervorgerufen. Die Histogenese der auf diese Weise zustandegekommenen Hautschädigung und deren vermutlicher Zusammenhang mit gewissen Kollagenerkrankungen, insbesondere mit dem verkalkenden Typ der Sklerodermie werden erörtert.

Prof. Dr. Hans SELYE
Kai NIELSEN
Montréal, Case postale 6128, Canada

Oncopathological Research Institute, Budapest

PROGRESSION OF TUMOUR GROWTH AND FORMATION OF METASTASES

B. KELLNER

(Received June 7, 1960)

Metastases are formed from tumour cells set free in the lymph or blood stream and carried to lymph nodes or organs where, taking root, they begin to multiply. All data support the cellular theory and no observations to the contrary are known to the author. Literature would no longer consider it a theory but rather a proven fact. However, no unequivocal view has been formed as to most of the details such as the way cells are set free from tumours and the way they pass into the lymph and blood stream, respectively; nor are the conditions of their taking root or the process of metastasis formation sufficiently known.

In the course of studying the lipid morphology of cancerous growths, the author observed that the necrobiotic areas and their immediate vicinity always undergo a process of resolution. The epithelial cells, released from the cell-to-cell arrangement, are rounded off. The author called the cell release occurring through degenerative process "disjunction". In some tumours, disjoined cells are seriously injured and picnotic while in others a large number of rounded-off tumour cells with retained structure can also be seen; if these reach a suitable ground substance, they are probably capable of multiplication and so of metastasis formation. On studying human tumours, the author has long come to hold the view that the difference that can be shown in the quality of disjoined cells is related to the development of the tumour: with the progression of tumour growth more and more cells invade the organism; among these cells there is an increasing number of disjoined ones with unchanged structure.

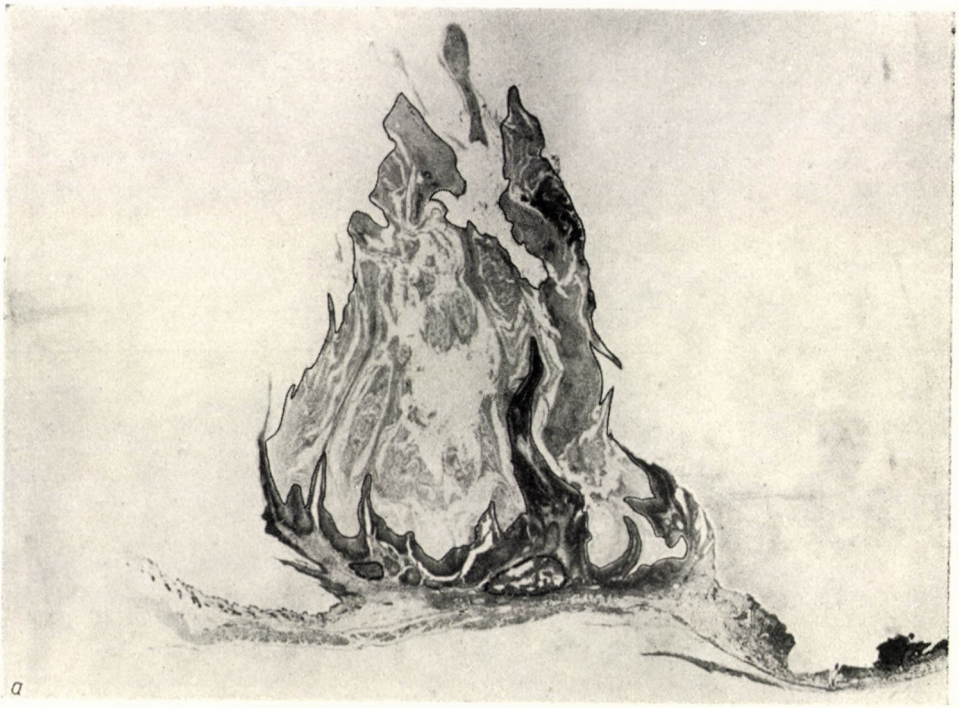
The idea of progression was first used by ROUS and KIDD. FOULDS studied the biological alterations occurring as a consequence of increasing malignancy in various types of tumour, primarily in spontaneous mammary carcinoma. In the course of tumour development, the increasing anaplasia of involved cells and the absence of differentiation have long been known as important biological indications of progression; these, however, also include the cessation of hormonal dependence, the absence of secretion, the increasing independence of tumour metabolism of systemic metabolism, *i. e.* the intensification of the autonomous character, increasing transplantability, etc. The author's investi-

gations indicated that a change in the character of the growth and the constant change of the tumour's structure and architecture show the degree of progression more conclusively than any other morphological features. At its inception, the tumour shows a structure similar to the ground substance (O). After the commencement of invasive growth and with its continuous extension, the tumour grows into its environment in a reticular manner. This type of growth has accordingly been called reticular growth (R). During progression, the biological behaviour of the tumour is constantly changing. Finally, during the period of metastasis formation metastases are also formed in the immediate vicinity of the tumour and the hitherto continuous growth becomes discontinuous (metastasising growth, [M]).

The author, in the course of his investigations in metastasis formation, was primarily interested in how the degenerative process takes place during progression, how the degenerative release, *i. e.* disjunction, of tumour cells keeps changing, whether the disjoined cells with retained structure increase in number and whether the metastasising tendency of the tumour is changing simultaneously. For the study of morphological changes during progression, mouse skin carcinoma induced by carcinogenic substances has proved a most suitable object as the growth of the tumour on the skin can be followed with the naked eye and the loosening of the cells can very clearly be observed owing to the disappearance of the tonofibrillar structure and intercellular bridges, respectively. The author first published his findings in 1942; he showed on human material that morphological changes occurring during progression are a more reliable indicator of progression than the methods employed previously.

Tumour growth is usually preceded by the formation of multiple papillomas of which some generally survive while the others dry up. The epithelium of the growing papilloma soon shows atypical development (malignant papilloma, carcinomatoid). On its surface, a dead horny mass similar to cornu cutaneum is formed, slowly dispersing towards the environment or becoming detached in one mass. The epithelium, however, soon grows into the underlying tissue in the form of more or less deep columns (Fig. 1). In their centre hornifying pearls are formed; these enlarge while part of the epithelial margin surrounding them undergoes atrophy; the pearls then invade the peritumoral connective tissue and decompose there through leukocytic-hystiocytic and giant-cell reactions. In the centre of large columns, pseudolumina are often formed; in these, sometimes mixed among wandering cells, sometimes floating in protein-containing fluid, disjoined cells, freed from cellular connections yet retaining their structure, can be seen. After the rupture of the epithelium, these cells erupt into the connective tissue as if they were flowing out of a receptacle (Figs. 1 and 2).

The infiltrative growth of tumour tissue involves the complete transformation of structure in a short time. On the surface, there is less and less papil-



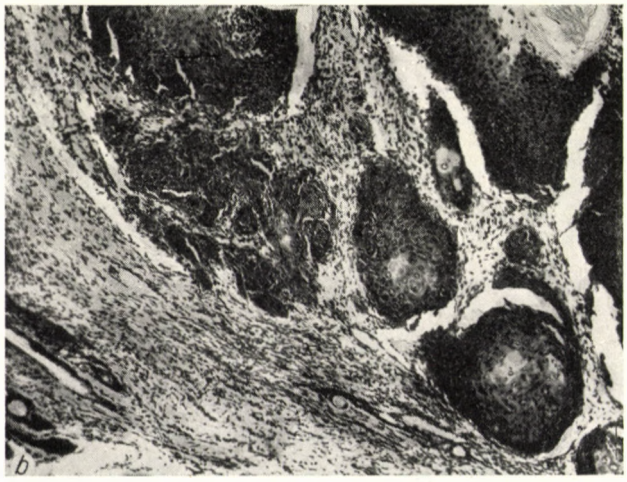
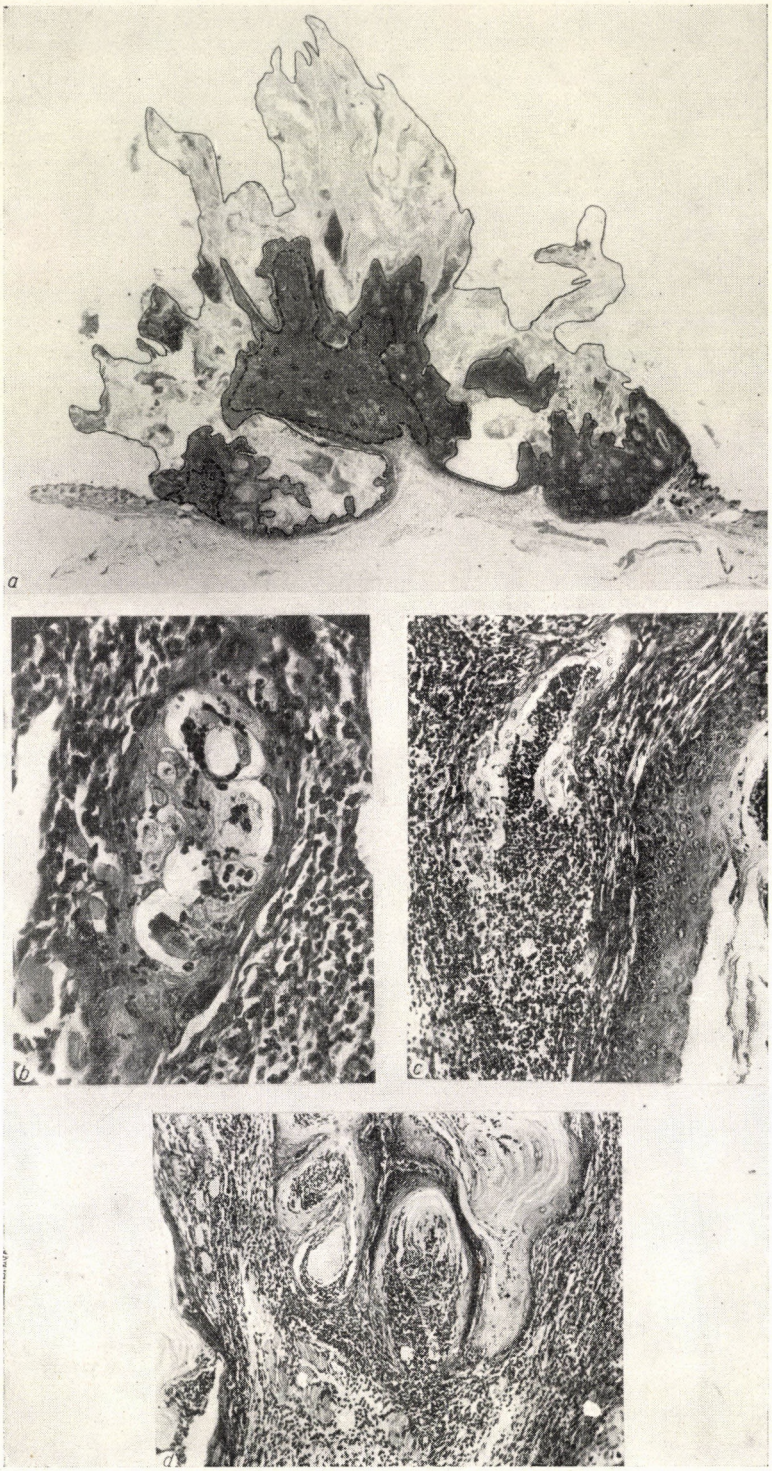


Fig. 1

a) Papilloma of increasing malignancy. On the surface, necrotic areas (———) below, reticularly growing (R) bundles (— — — —) (approx. ×20)

b) Detail of the above preparation (80×)


a
b
c
d

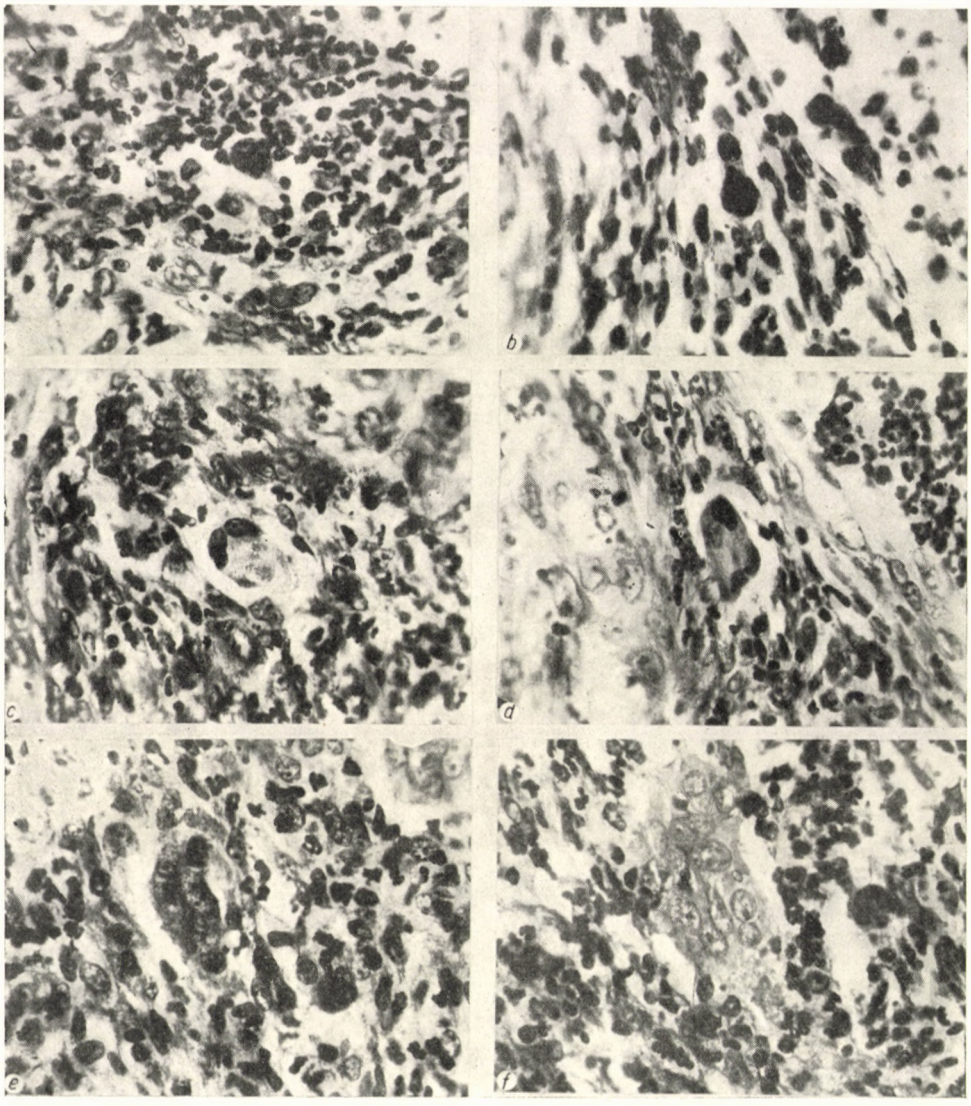


Fig. 3
Binuclear and muitinuclear giant epithelial cells, paracarcinomatous metastases in the vicinity of induced mouse skin carcinoma (×875)

Fig. 2

a) Induced mouse skin carcinoma; over large area of anaplastic growth (R); in other areas, anaplastic differentiated growth (dif. R) —·—·—·— In the connective tissue, many minute metastases (approx. ×30)

b) Column lumen replete with disjoined cells (×480)

c) Similar area; leucocytes invade the lumen of the column which has invaded the connective tissue (×205)

d) Disjoined tumuor cells invading the connective tissue as if flowing out of a horn of plenty (×260)

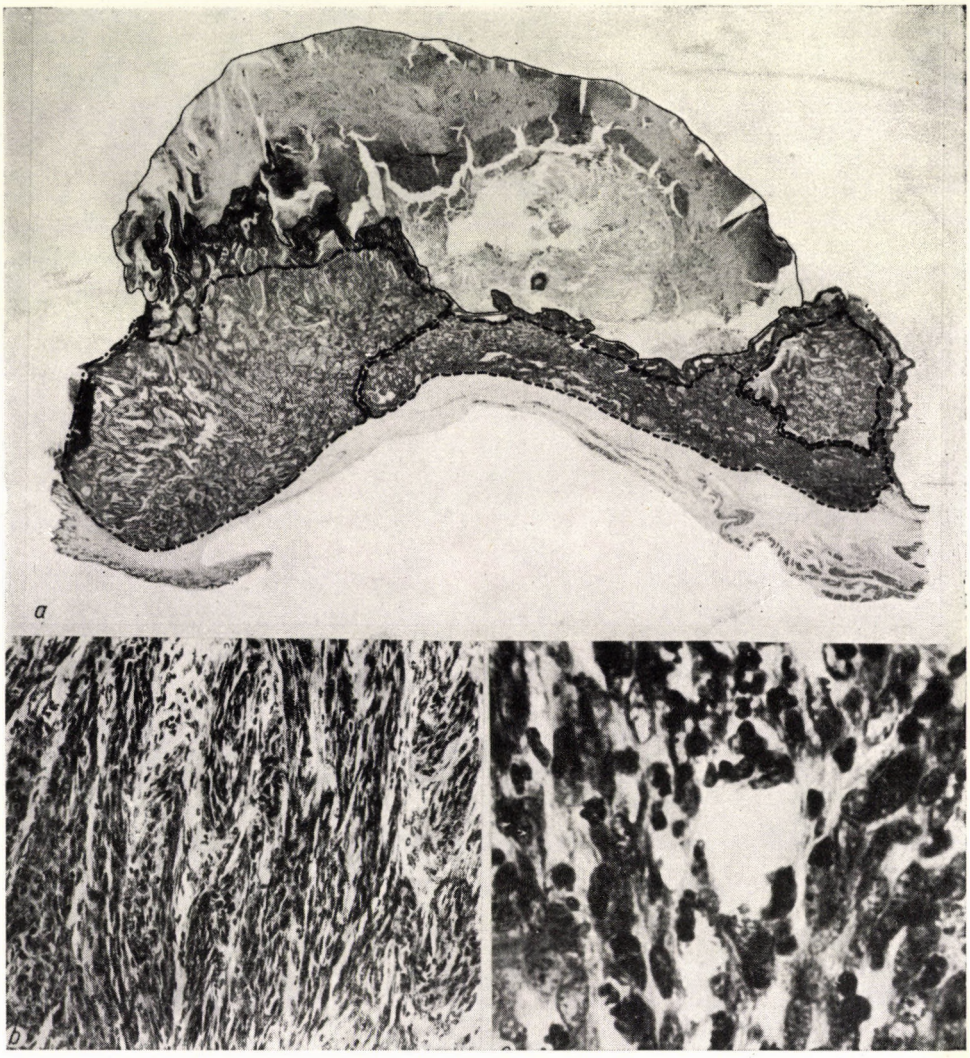


Fig. 4
a) Almost wholly R-type growth, differentiating in parts (approx. ×25)
b) Dedifferentiated tumour fraction resembling sarcoma (×260)
c) Blood-vessel within same, with dissolved tumour cells in its vicinity, some of which have already reached the lumen (×680)

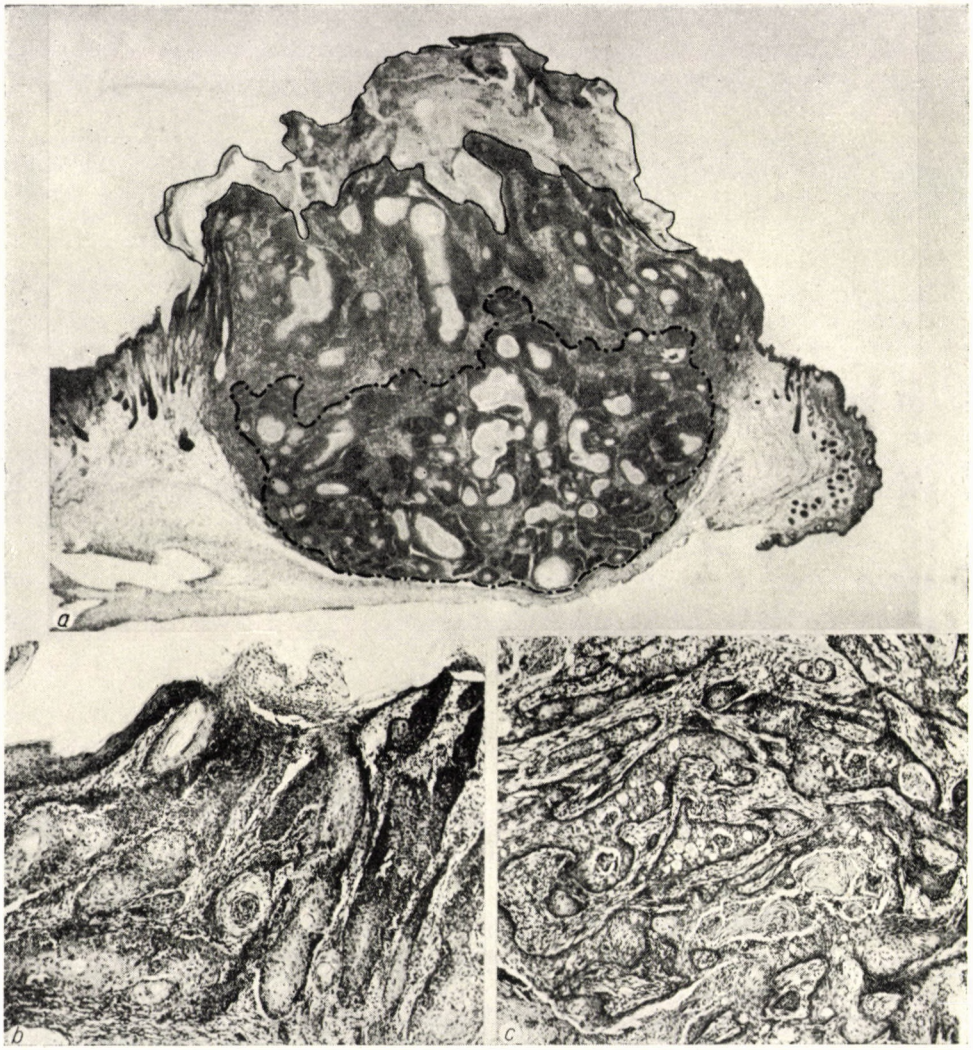
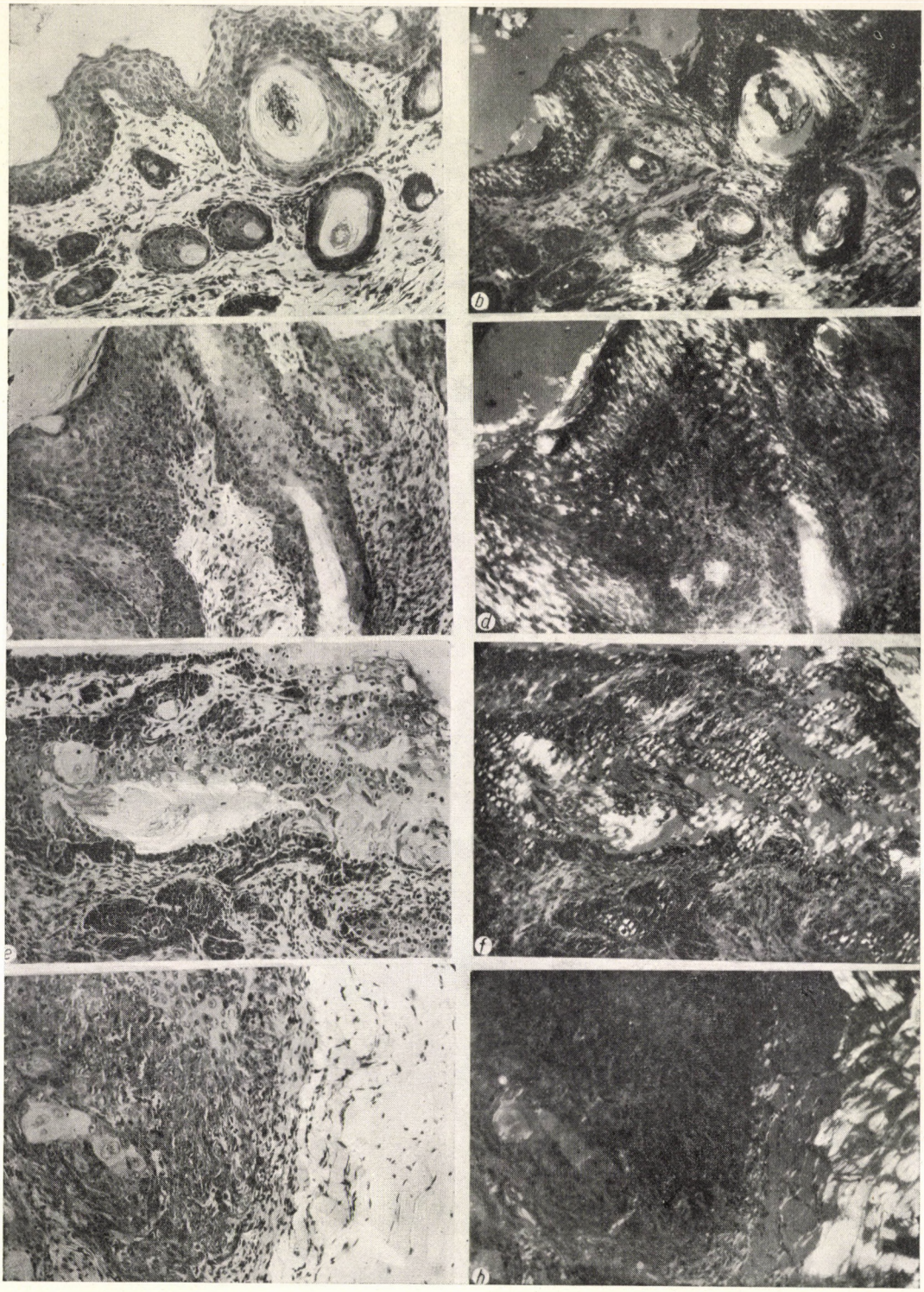


Fig. 5
a) Differentiated (O) and immature (dif. R) mouse skin carcinoma (×35)
b) O-type growth detail (×260)
c) Dedifferentiated (dif. R) growth detail (×80)


a
b
c
d
e
f
g
h

lomatous organotypic tissue with structure corresponding to that of the ground substance. The tumour would at this juncture grow into the underlying tissues in the form of reticular cell rows and undifferentiated bundles among which one can find traces of connective tissue (R growth); differentiation is either totally absent or refers to some scattered cells only. Under these unusual circumstances, epithelial cells become fusiform and the tissue thus resembles sarcoma for which it was mistaken for a long time (Fig. 4). Sharply circumscribed tumour areas often undergo secondary differentiation; in such cases the reticular epithelial bundles cornify and frequently large-size cornified cavities are formed, being full of disjoined cells (Fig. 5).

In the reticular part many large areas of fatty tissue, minute fat-containing foci and single fat cells are seen; these quickly disintegrate while around them the tumour cells are rounded off and separated. Thus it is especially in such areas that tumour cells become disjoined in great numbers. Besides, tumour portions of various sizes also dissociate into single cells. Accordingly, the cells in tumour portions of reticular growth are not only set free in great numbers but many of them also retain their structure. The extracellular fluid pervading the tumour carries these cells along and so they break into either the peritumoral tissue interstices or the sinusoid blood-vessels (Fig. 4 C).

SUGÁR observed that in hyperplastic papillary tumour portions the tonofibrillar and intercellular bridges become thickened whereas in undifferentiated areas they are either absent or decreased in number. This difference between mature and anaplasic portions is significant in understanding the setting free of tumour cells. (The findings by KROMPECHER, BECK and KREIKER suggest the same.)(Fig. 6).

The safest way to follow the fate of released cells is to trace their course in the immediate vicinity of a tumour. There the major part of disjoined cells undergoes resolution within a very short time. They are sometimes surrounded by wandering cells while another time no leukocytes or macrophages are seen in or around them. In the latter case they probably undergo resolution by humoral means. Careful examination of the immediate vicinity of the tumour also shows that before minute metastases would be formed from tumour cells reaching there,

Fig. 6

In mouse skin carcinoma, the tonofibrillar structures show fundamental differences in the course of progression of tumour growth. (Investigations by SUGÁR. Gallocyanine-chrom-alum stain, in polarised light (×200)

a) Hyperplastic skin

b) Under the polarising microscope, strong proliferation of the tonofibrillar structure is seen

c) O-type cancerous growth

d) Double refraction shows intensive tonofibrillar proliferation

e) Tumour differentiated in its upper and anaplasic in its lower portion

f) Tonofibrillar structure, thickened in the differentiated portions. Below, structure absent

g) R-type tumour growth

h) Tonofibrillar structure altogether absent

binuclear and multinuclear cells appear. Pericarcinomatous metastasis formation is invariably accompanied by amitosis and giant tumour cell formation (Fig. 3).

The formation of peritumoral metastases, as observed on extensive human material and in animal experiments, commences when the lodging at distant sites of embolic cells begins too; in other words, when the organism passes from the pre-metastatic to the metastasising stage. There are many indications that this change takes a short time and that metastatisation entails a fundamental biological change in the whole organism. In the absence of a suitable method, the tracing of the fate of tumour cells meets with great difficulties.

Valuable information was obtained by following the fate of intravenously transplanted tumour cells. The author first used histological methods to establish their fate. For one or two hours after the injection, the tumour cells could be identified without fail in the form of sub-pleural groups located in pulmonary capillaries. After the lapse of 24 hours, however, they were no longer identifiable; at best, an occasional multinuclear cell could be seen, of the type encountered in peritumoral metastasis formation.

What is the fate of tumour cells introduced into the blood stream? It is conceivable that from the pulmonary capillaries they reach the systemic circulation and become disseminated in the organism. The findings, however, rather suggest that they undergo resolution in the lungs and only an occasional tumour cell would survive in the form of multinuclear epithelial giant cell (Fig. 7). If the fate in the lungs of intravenously introduced cells is followed hour by hour, cells can be seen in the capillaries either enclosed in fine fibrous reticulum, or moving freely. The protoplasm of the latter cells swells and their nucleus becomes quite pale. On the other hand, tumour cells introduced into the blood stream could very seldom be identified in arterial blood and practically never in organs. Therefore several experiments were carried out consisting in killing one-third to one-quarter of the tumour cells and staining them black with haematoxylin before introducing them into the organism and trying to follow their course. In such cases, the cells were detectable within a few minutes in the lungs; part of them found their way to the systemic circulation, too, and a few were to be found in the kidneys, in the liver, etc. Beside the stained cells, the live tumour cells were somewhat easier to identify. The stained cells also disappear but take longer in dissolving in the tissue fluids.

It has also been tried to follow the fate of P^{32} labelled Ehrlich ascites tumour cells after intravenous introduction. Activity soon accumulated in the lungs while the liver showed low activity. Then activity disappeared gradually from the lungs in a few hours and accumulated in the liver. After 24 hours, activity was equally low in both organs (Table 1).

Since with the methods hitherto employed, the identification of tumour cells was uncertain, a more reliable method had to be sought for. The presence of

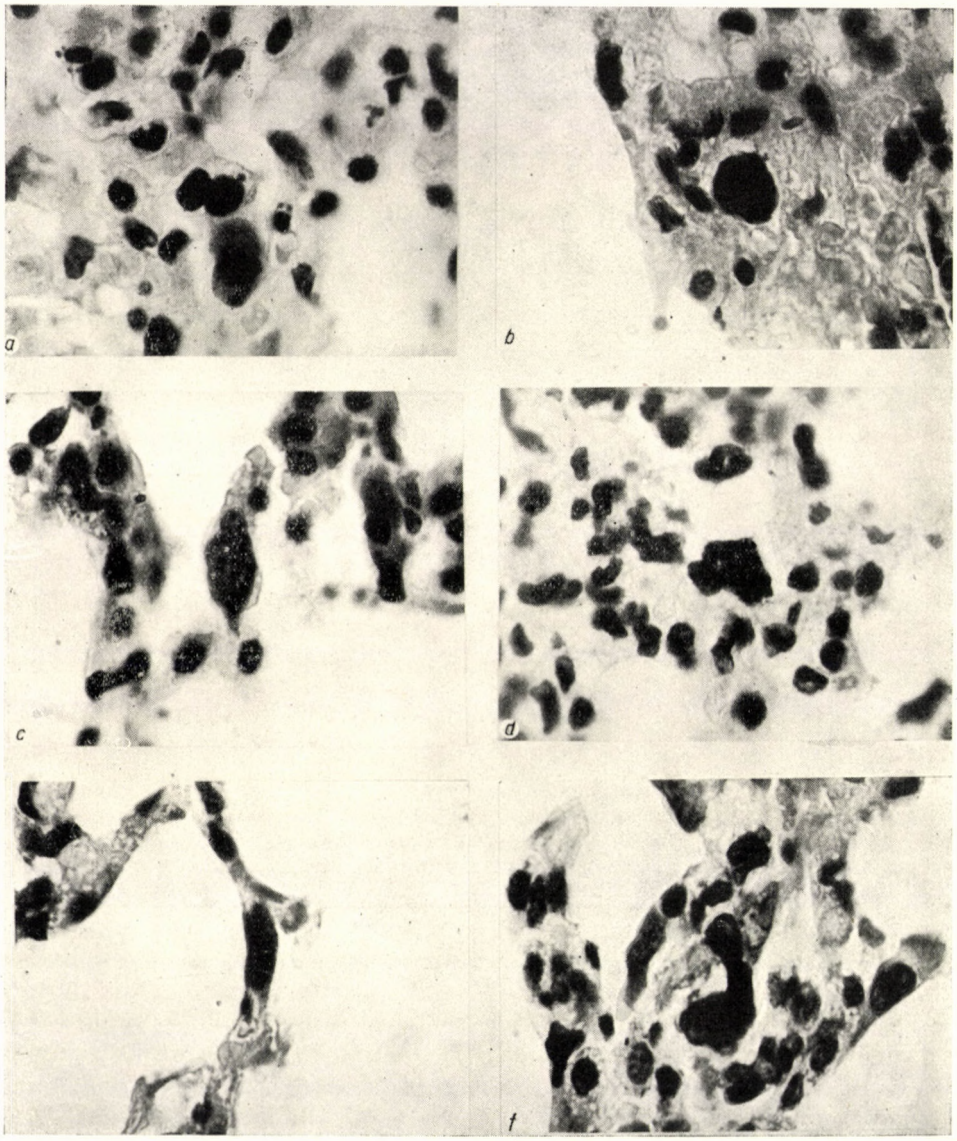
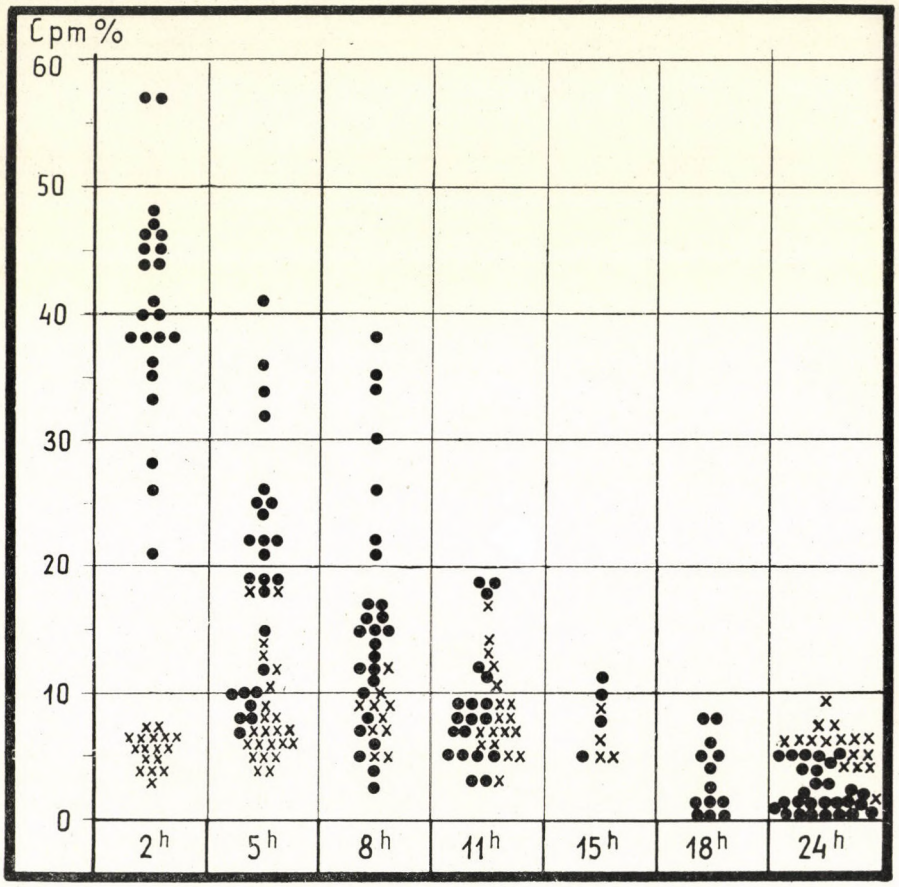


Fig. 7

Intraperitoneal inoculation of Ehrlich ascites tumour cells
1—6 hours after injection, binuclear and multinuclear giant epithelial cells in the pulmonary capillaries
Above: for comparison, binuclear alveolar cell (×1600)

Table 1

Intravenously transplanted Ehrlich ascites cells labelled with P^{32}. Activity measured at regular intervals in lungs and liver is indicated in percentual relation to the initial value



tumour cells in an organ can only be ascertained without fail if a fragment of it is transplanted into another animal. If within two or three weeks a tumour identical in type develops from the transplant, it can be safely stated that tumour cells were present in it. A negative result provides no definite proof; it merely indicates that there were not enough tumour cells to effect a successful transplant or the condition of the cells was not adequate. The transplantation will be more successful if the subject is pre-treated with cortisone.

Experiments were carried out by transplanting intravenously a known number of homogenised cells from various tumours (Table 2). The findings were essentially the same regarding all three tumours but there were differences in the progression. For a day or two, the tumour cells could be demonstrated in various organs as a proof that they had penetrated from the pulmonary capil-

laries into the circulation. As from the second day, the transplanted organs did not take and the presence of tumour cells could be demonstrated only from the lungs of mice inoculated with Ehrlich's ascites cells. The negative period lasted 1 to 3 weeks. However, as soon as the first metastases appeared, almost every organ gave rise to tumour if transplanted. This was true also when no tumour cells could be found in the sections of those organs, only some binuclear or multinuclear cells. It should be emphasized that by such means the presence of tumour cells could be shown in organs where metastasis formation never occurs. As an explanation one might suppose that during the negative phase the tumour cells become so reduced in number or are reduced to such a state that they cannot be shown even by transplantation. Everything tends to show that most of the tumour cells are destroyed but one or two survive in the form of giant cells. It is much more difficult to understand why and how tumour cells appear again. Some immune-biological process might have a decisive part in this.

In the next series of experiments, the same method was employed to show the continuous dissemination of cells from subcutaneously or intraperitoneally inoculated tumours. For a long time, transplanted tumours were thought to form no metastases and were accordingly considered unsuitable for experimental purposes. This view turned out to be untrue, but the general experience was that they form metastases late and sporadically, first of all in the lymph nodes and the lungs. 20 years ago, FLAX using the transplantation method demonstrated tumour cells in the lymph nodes well in advance of the appearance of metastases. When transplanting lymph nodes into animals pretreated with cortisone, the present author could demonstrate tumour cells very shortly after transplantation. It was surprising that tumour cells should be present in the lungs and other organs well before metastases were formed, even in advance of the growth of the transplanted tumour (Table 3). In the organs, one or two giant cells are found, again pointing to the fact that the cells carried away by the blood stream are transformed into multinuclear giant cells before the appearance of definite metastases. In the ultimate analysis, the transplantation experiments have thus also proved the continuous dissemination of tumours.

The examination of induced tumours with the same method has not produced a similarly consistent result. It was not possible to transplant either mouse skin carcinoma or the organs of the animal affected by tumour. The experiments remained unsuccessful even when animals of the same strain were used and they had been pre-treated not only by cortisone but also by whole body irradiation. Transplantation of the dedifferentiated tumour and of the organ certain to contain metastases, also remained unsuccessful. On the other hand, histological examinations yielded very interesting results. Well before the appearance of metastases, giant tumour cells were found in the lungs, proving

Table 2

Following the introduction of 2.5 million Ehrlich ascites cells or 8 million Guérin or 20 million Yoshida tumour cells, the organs were transplanted under the dorsal skin of animals pretreated for a week with two doses of cortisone

Time		1 hour		3 hours		6 hours		12 hours		1 day		2 days		3 days		4 days		5 days		6 days		7 days		9 days		10 days		11 days		14 days		16 days		21 days	
Blood	E																																		
	G	−	+								+			−	−							−	−							−	−			+	+
	Y	−	+							−	−			−	−							−	+			+	+			+	−				
Lung	E	+	+	+	+	−	+	+	−	−	−	−	−	+	+	−	+	+	+	−	−	+	−	−	−			−	+	+	+	−	+		
	G	−	−							−	−			−	−							−	−							+	−			+	+
	Y	−	+							−	−			−	−							+	+			+	+				+				
Mediastinal Lymph Node	E	−	+	+	+	+	+	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−			−	−	−	+	−	−		
	G	+	−							−				−									−							−	−			+	+
	Y																																		
Axillary Lymph Node	E	−	−	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−			−	−	+	+	−	−		
	G																																		
	Y																																		
Liver	E	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−			−	−	−	−	−	−		
	G	−								−	−			−	−								−							−	−			+	+
	Y	−								−				−	−							+	+			+	+			−	+				

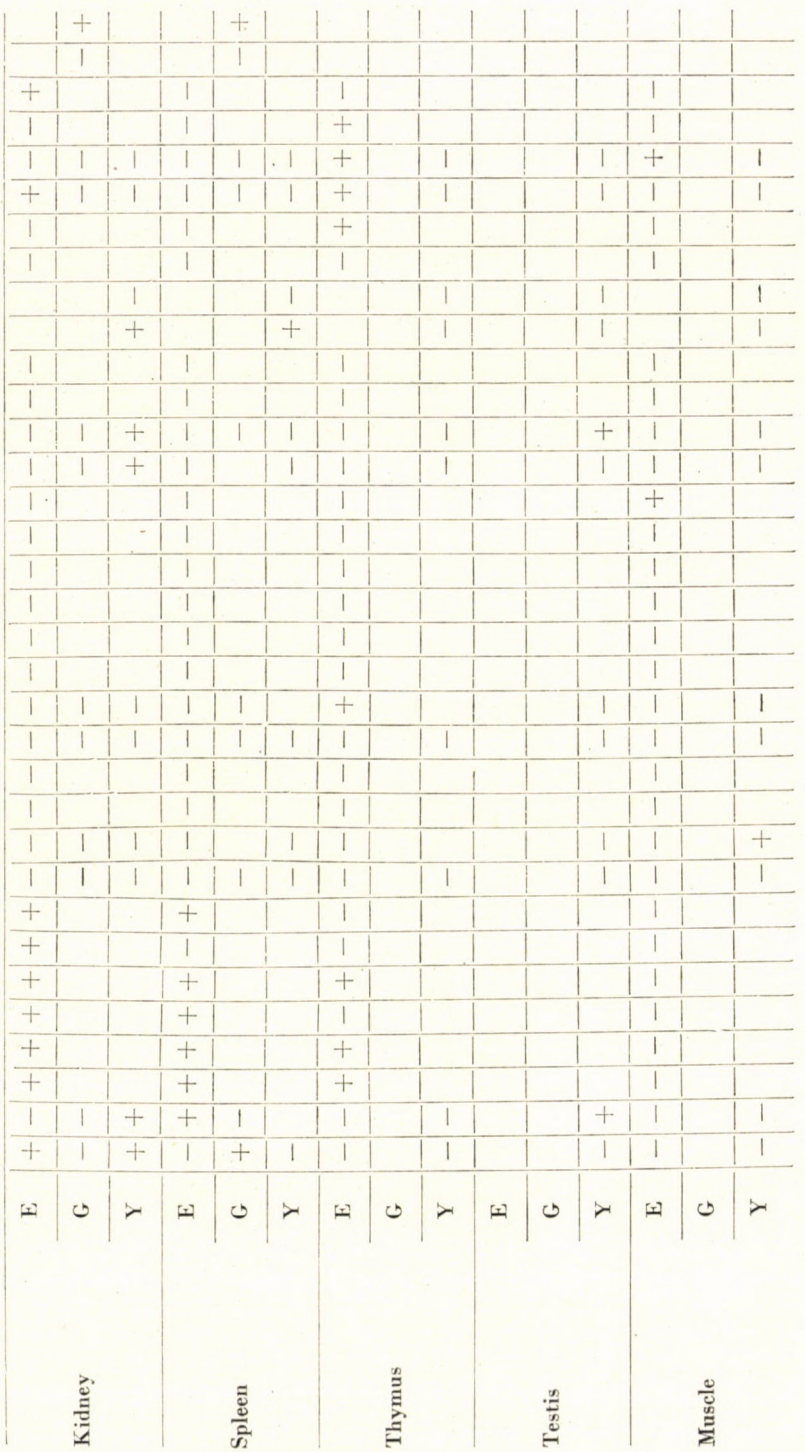

Kidney
Spleen
Thymus
Testis
Muscle
E
G
Y

Table 3

Following the intraperitoneal transplantation of Ehrlich ascites tumour or subcutaneous transplantation of Guérin or Yoshida tumour, the organs were transplanted into animals pre-treated with cortisone

Days		1		3		5		7		10		14.		21		24	
Blood	E			+	+		−	−			+						
	G								−−			−−	−−	+	+	+	+
	Y									+		+	+				
Lung	E	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+						
	G								−−			−−	+−	+	+	+	−
	Y			−	−	+	+	+	+	−	+	+	+				
Mediastinal Lymph Node	E	+	+	−	−	−	+	+	+	+	+						
	G								−−			+−	−−	+	+	−	−
	Y			−	−	−	−	−	−								
Axillary Lymph Node	E	−	−	−	−	−	+	+	−	−	+						
	G																
	Y			−	−	−	−	−	−								
Retroperitoneal Lymph Node	E	+	−	+	−	+	+										
	G																
	Y																
Liver	E																
	G								−−			+−	−−	+	+	−	−
	Y									+		+	+				
Kidney	E																
	G								−−			−−	−−	+	+	−	−
	Y									+		+	+				
Spleen	E																
	G								−−			++	−−	+	+	−	−
	Y									−	−	−	+				
Adrenal gland	E																
	G								−−			−−	−−	+	+	+	+
	Y																
Thymus	E							+	+	+	+						
	G																
	Y									−		+	+				
Muscle	E							−	+	+	+						
	G																
	Y									−	−	+	+				
Testis	E							+	+	+	−						
	G																
	Y											+					

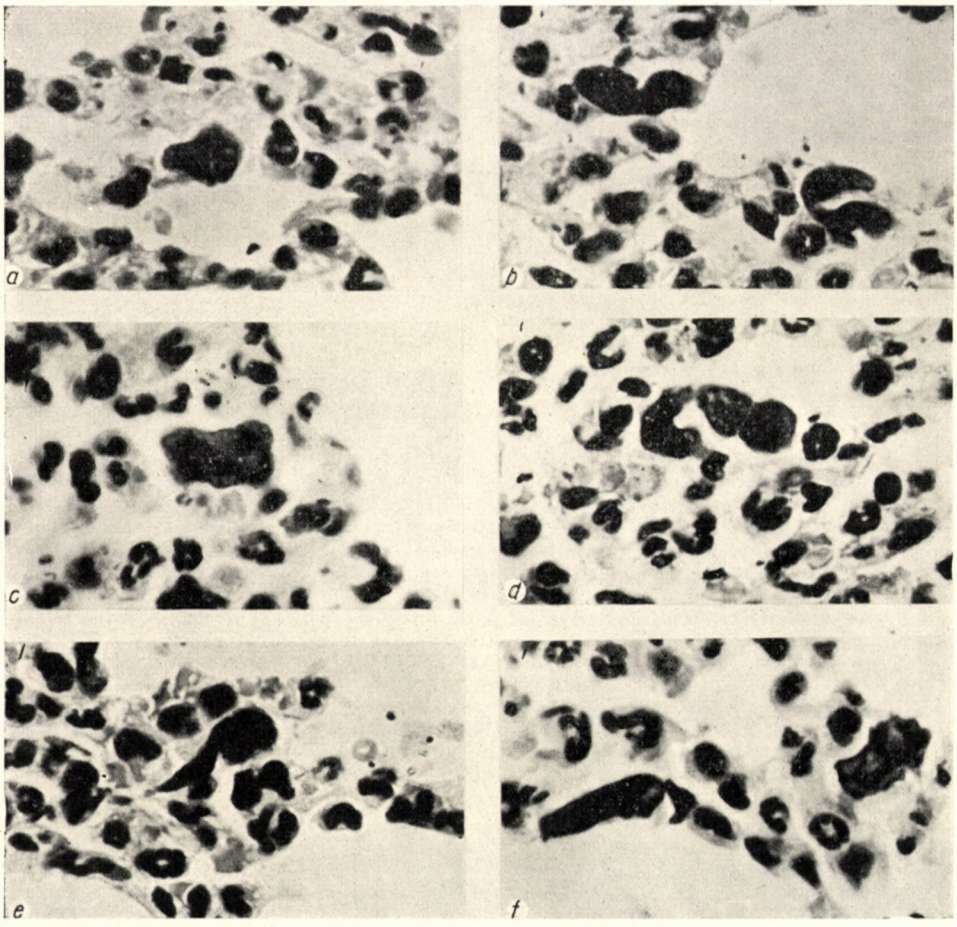


Fig. 8
Skin carcinoma induced by methylcholanthrene. Binuclear and multinuclear giant epithelial cells in the lungs (×1600)

that the dissemination of the tumour had started in the premetastatic stage (Fig. 8). Simultaneously, multinuclear tumour cells were discovered in the immediate vicinity of the tumour. Their formation started when the multinuclear cells appeared in the lungs. The cytological features of the paracarcinomatous giant cells resemble those of the cells found dispersed in the lungs.

The following conclusions must especially be emphasized.

Histological determination of the type of a tumour can be used for assessing the rate of its growth. It is especially the presence or absence of metastases around the tumour which supplies valuable information since on its basis one can infer to the existence of distant metastases.

Under experimental circumstances it is mostly possible to prevent by chemotherapeutics the lodging of tumour cells continuously disseminating within the organism. Appropriate radiotherapy seems to have a similar effect, and a similar influence can presumably be exerted by changing the immune-biological and endocrine conditions by quantitative or qualitative nutritional changes.

Summary

(i) In the course of malignant tumour growth, characteristically localized degenerated tumour parts are seen. In their vicinity, the tumour cells lose their intercellular connections and are disconnected.

(ii) During the progression of tumour growth, tissue structure constantly keeps changing. At the beginning, organotypic growth corresponding to the original tissue is seen. Subsequently, while invading the underlying tissues, the structure undergoes a change and assumes a reticular character. Finally, small metastases appear in the immediate vicinity of the tumour.

(iii) The cells released from their surroundings are dispersed towards the environment or break into the connective tissue and are carried off by the lymph or blood stream.

(iv) In the course of progressive tumoral anaplasia, more and more tumour cells invade the organism; among these, an increasing number of cells retains the original structure.

(v) The majority of the released cells disintegrate when reaching the vicinity of the tumour. Some of them give rise to multinuclear cells and then minute metastases.

(vi) When tumours are inoculated intravenously, the majority of the tumour cells stays in the lungs soon to undergo dissolution. Some of these cells reach the organism through the lungs or other organs. Multinuclear giant cells are always found in the lungs; these resemble in all details the giant tumour cells found in the vicinity of the original tumour.

(vii) The presence of tumour cells in a given organ can best be demonstrated by transplanting part of the organ into animals pre-treated with cortisone.

(viii) It is not only the intravenously inoculated tumour cells which are dispersed throughout the organism; the continuous dissemination of subcutaneously or intraperitoneally introduced tumour cells can also be shown at a very early stage, simultaneously with the taking of the tumour or even preceding it.

(ix) Mouse skin carcinoma induced by carcinogenic substances could not be transplanted with success, nor has it been possible to transplant tumours forming peritumoral metastases or organs containing metastases. However, multinuclear cells can always be found in the pulmonary blood-vessels well in advance of the appearance of metastases.

(x) The presence of peritumoral metastases in histological sections shows that metastases have formed at a distance, too. Some chemotherapeutics can successfully prevent the lodging of tumour cells drifting in the body fluids.

REFERENCES

1. Abbot, Ch. C.—Krements, E. T. (1957): The Fate of Tumour Cells injected into the Portal System of the Rabbit. Proc. am. Ass. Cancer Res. *2*, 183. — 2. Blumenthal, F.—Auler, H. (1926): Mit Milzbrei von Tumorratten erzeugte Tumoren. Z. Krebsforsch. *24*, 285. — 3. Blumenthal, F.—Auler, H.—Solecka (1927): Erzeugung neuartiger Tumoren durch Milzbrei eines Rattensarkoms. Z. Krebsforsch. *25*, 229. — 4. Coman, D. R.—De Long, R. P.—McCutcheon, M. (1951): Studies on the Mechanisms of Metastasis. The Distribution of Tumors of Various Organs in Relation to the Distribution of Arterial Emboli. Cancer Res. *11*, 648. — 5. Flaks, J. (1932): Untersuchungen über Metastasen. II. Teil. Über Transplantation einiger Organe von Tumorratten. Z. Krebsforsch. *37*, 504. — 5a. Foulds, L. (1961): Progression and Carcinogenesis. Acta Un. Int. Cancr. *17*, 148. — 6. Goldie, H.—Jeffries, B. R.—Jones, A. M.—Walker, M. (1953): Detection of Metastatic Tumor Cells by Intraperitoneal Inoculation of Organbrei from tumour-bearing Mice. Cancer Res. *13*, 566. —7. Jonescu, P. (1931): Über das Vorkommen von Geschwulstzellen im strömenden Blut von Tieren mit Impftumoren. Z. Krebsforsch. *33*, 264. — 8. Kellner, B. (1935): Zur Morphologie der Fette in Geschwülsten. Frankfurt. Z. Path. *47*, 454. — 9. Kellner, B. (1939): Die Fettmorphologie der Carcinome mit besonderer Rücksicht auf die Disjunktion der Geschwülstzellen. Z. Krebsforsch. *49*, 633. — 10. Kellner, B. (1940): Das periphärische Wachstum der Carcinome. Z. Krebsforsch. *50*, 299. — 11. Kellner, B. (1940): Die Diagnose der Krebsmetastasen auf Grund des histologischen Befundes der Primärgeschwulst. Z. Krebsforsch. *51*,

36. — 12. KELLNER, B. (1950): A tudományos daganatkutatás kérdései. MTA Orvostud. Oszt. Közl. (Budapest) *2*, 1. — 13. KELLNER, B. (1951): A rák terjedése a szervezetben. MTA Orvostud. Oszt. Közl. (Budapest) *2*, 67. — 14. KELLNER, B.—DÉNES, J. (1953): A rák terjedésére vonatkozó vizsgálatok II. (A progressio meghatározása a primaer tumor szöveti vizsgálat útján.) MTA Orvostud. Oszt. Közl. (Budapest) *4*, 1. — 15. KELLNER, B.—NÉMETH, L. (1956): 1,6-bis-(chlor-äthylamino)-1,6-desoxy-D-mannit-dichlorhydrat (BCM), ein neues Stickstoff-Lost-Derivat. Z. Krebsforsch. *61*, 165. — 16. KELLNER, B. (1957): A daganatos áttételek képződésére és azok chemotherapiás befolyásolására vonatkozó vizsgálatok. Orv. Hetil. (Budapest) *98*, 1227. — 17. КЕЛЛНЕР, Б. (1959): Экспериментальние исследования относяшиеся к рассеиванию рака в организме. Сезд Пат-Анатомов в Харкове. — 18. KELLNER, B. (1960): Stadien der Malignität unter besonderer Berücksichtigung der Metastasenbildung. Berliner Symposion über Fragen der Carcinogenese. Akademie Verlag, Berlin. — 19. KORPÁSSY, B.—SZŐNYI, F.—BARANYAI, GY. (1958): Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Seltenheit von Geschwulstmetastasen in der Skeletmuskulatur. Z. Krebsforsch. *62*, 370. — 20. KORPÁSSY, B.—KOVÁCS, K.—TIBOLDI, T. (1953): Transplenic Passage of Tumor Cell Emboli. Acta Morph. hung. *4*, 271. — 21. KREIKER, A. (1929): Die Rolle der intercellulären Verbindungen in der Krebsentstehung. Virchows Arch. path. Anat. *271*, 724—758. — 22. KUSCHFELDT, R. (1937): Das Schicksal eingeschwemmter Krebszellen in den Lymphknoten. Z. Krebsforsch. *46*, 247. — 23. LEVIN, I.—SITTENFIELD, M. (1911): On the Mechanism of the Formation of Metastases in Malignant Tumors, an Experimental Study. J. exp. Med. *14*, 148—158. — 24. LIPSCHÜTZ, B. (1929): Über Erzeugung von Tumoren mit Blut von Tumortieren. Wien. klin. Wschr. *42*, 1593. — 25. LUBARSCH, O. (1895): Metastasen und Recidive. Allg. Path. Morph. und Physiol. 2. Abteilung. 501—509. — 26. SANDBERG, A. A.—MOORE, G. E. (1957): Examination of Blood Tumor Cell. J. nat. Cancer Inst. *19*, 1. — 27. STERN, A. (1923): Das Schicksal eingeschwemmter Geschwulstzellen in der Lunge. Virchows Arch. path. Anat. *241*, 219. — 28. SCHAIRER, E. (1937): Über erworbene Resistenz der Rattenlunge gegen Metastasen des Jensen-Sarkoms. Z. Krebsforsch. *46*, 364. — 29. SCHAIRER, E. (1938): Über den Untergang von Tumorzellen in der menschlichen und tierischen Leber. Verh. dtsch. path. Ges. *31*, 463. — 30. SCHAIRER, E. (1941): Untersuchungen zum Organwiderstand gegen Geschwulstmetastasen. Arch. Ohr-,Nas.- u. Kehlheilk. *149*, 497. — 31. TINOZZI, F. P. (1931): Über Erzeugung von Tumoren mit Embryonalbrei von Tumortieren. Z. Krebsforsch. *33*,415. — 32. WAGNER, A. (1938): Übertragung des Ehrlichschen Mäusecarcinoms durch metastasenfreie Organe eines Tumorträgers. Z. Krebsforsch. *48*, 40. — 33. WIBEAU, E. (1933): Über Metastasenbildung nach intravenöser Injektion carcinomatöser Ascitesflüssigkeit von Mäusen und Ratten. Z. Krebsforsch. *39*, 66. — 34. WOGLOM, W. H. (1929): Failure of Spleen from Tumor-bearing Animals to Produce Tumors. J. Cancer Res. *13*, 305. — 35. ZEIDMANN, I. — BUSS J. M. (1952): Transpulmonary Passage of Tumor Cell Emboli. Cancer Res. *12*, 731. — 36. ZEIDMANN, I. (1957): Metastasis: A review of Recent Advances. Cancer Res. *17*, 157.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ И МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ ОПУХОЛЕЙ

Б. КЕЛЬНЕР

1. В ходе роста злокачественных опухолей наблюдаются в характерной локализации дегенерированные части опухолей. В соответствии с последними и в их окрестности опухолевые клетки утрачивают свои связи и разрыхляются.

2. В ходе прогрессирования опухолей тканевая структура постоянно меняется; вначале имеет место соответствующий материнской ткани органотипичный рост, в течение роста в глубину он меняется, принимая сетчатый ретикулярный характер. Затем, в непосредственной окрестности раковой опухоли также появляются мелкие метастазы.

3. Освобожденные из своей окрестности опухолевые клетки либо рассеиваются в окружающей среде, либо они вторгаются в соединительную ткань и уносятся током лимфы и крови.

4. В ходе прогрессивной анаплазии опухоли, все больше клеток попадает в организм, причем среди попадающих в организм хорошо сохранившихся клеток имеются все больше и больше клеток с сохраненной цитологической структурой.

5. Преобладающая часть попадающих в окрестность рака опухолевых клеток разлагается. Из отдельных клеток образуются многоядерные клетки, а затем мелкие метастазы.

6. При внутривенной прививке опухолей большая часть клеток задерживается в легких и в течение короткого времени разлагается. Отдельные клетки попадают путем транспульмонального или же трансорганического пассажа в организм. Однако, в легких всегда обнаруживается также несколько многоядерных гигантских клеток, которые во

всех отношениях похожие на наблюдаемые в окрестности рака опухолевым гигантские клетки.

7. Наличие опухолевых клеток в органах можно выявить, надежнее всего тогда если часть этих клеток привается животным, предварительно обработанным кортизоном.

8. Не только введенные внутривенной прививкой клетки рассеиваются по всему организму. Постоянное рассеяние подкожно или внутрибрюшинно введенных опухолевых клеток можно также весьма рано выявить, одновременно с приживанием опухом или даже до него.

9. Пересев индуцированного карциногенными веществами кожного рака мышей на другие животные до сих пор не удался, даже трансплантация опухолей, образующих околораковые метастазы, или же органов, содержащих местасшазы, не венчалась успехом. Однако, в кровеносных сосудах легких можно выявить многоядерные клетки долго до появления метастазов.

10. Наличие в тканевых срезах метастазов указывает расположенных около раковой опуколи на образование также отделенных метастазов. Поселению попадающих в организм и постоянно распространяющихся опухолевых клеток можно препятствовать некоторыми химическими препаратами.

UNTERSUCHUNG DES FORTSCHREITENS UND DER METASTASENBILDUNG VON GESCHWÜLSTEN

B. KELLNER

1. Im Laufe des Wachstums von malignen Geschwülsten können in charakteristischer Lokalisation degenerierte Geschwulstteilchen beobachtet werden. Diesen Geschwulstteilchen entsprechend und in ihrer Umgebung verlieren die Geschwulstzellen ihren Zusammenhang und lockern sich auf.

2. Im Verlauf des Wachstums des Geschwulstes erfolgt eine fortlaufende Veränderung der Gewebestruktur; das anfänglich dem Muttergewebe entsprechende organotypische Wachstum verändert sich beim Tiefenwachstum, und nimmt einen netzartigen, retikulären Charakter auf. Schliesslich erscheinen auch in unmittelbarer Nähe des Tumors kleine Metastasen.

3. Die aus ihrer Umgebung freigesetzten, disjungierten Geschwulstzellen werden entweder in der Umgebung zerstreut, oder sie dringen in das Bindegewebe ein und werden mit dem Lymph- oder Blutstrom verschleppt.

4. Im Laufe der fortschreitenden Anaplasie des Tumors gelangen immer mehr Zellen in den Organismus und zwischen den in den Organismus gelangenden, gut erhaltenen Zellen sind in immer grösserer Anzahl eine gut erhaltene cytologische Struktur aufweisende Zellen vorhanden.

5. Der grösste Teil der in die Umgebung des Krebses gelangenden Geschwulstzellen wird abgebaut. Aus einzelnen entstehen erst mehrkernige Zellen, dann kleine Metastasen.

6. Bei der i. v. Transplantation von Geschwulsten bleibt ein grosser Teil der Zellen in der Lunge stecken und wird in kurzer Zeit abgebaut. Einzelne Zellen gelangen transpulmonal bzw. transorganisch in den Organismus. In der Lunge können aber jeweils auch einige mehrkernige Riesenzellen gefunden werden, die in jeder Beziehung den neben der Geschwulst beobachteten tumorösen Riesenzellen ähnlich sind.

7. Am zuverlässigsten kann die Anwesenheit von Geschwulstzellen in den Organen nachgewiesen werden, wenn ein Teil derselben in mit Cortison vorbehandelten Tieren eingeimpft wird.

8. Nicht nur die intravenös eingeführten Zellen werden im ganzen Organismus zerstreut. Auch das ständige Verschleppen von subkutan oder intraperitoneal eingeführten Geschwulstzellen kann sehr früh nachgewiesen werden, gleichzeitig oder sogar vor dem Angehen der Geschwulst.

9. Impfung von anderen Tieren mit karzinogenen Stoffen induzierten Mäusehautkrebs war bisher noch nicht gelungen, selbst die Transplantation von perikarzinomatösen Metastasen bildenden Tumoren, oder Metastasen enthältenden Organen führte zu keinem Erfolg. In den Lungengefässen können jedoch mehrkernige Zellen geräume Zeit vor dem Erscheinen von Metastasen nachgewiesen werden.

10. Das Vorhandensein von perikarzinomatösen Metastasen in Gewebsschnitten weist darauf hin, dass sich bereits entfernte Metastasen gebildet haben. Die Ansiedlung der in den Organismus gelangenden und ständig verschleppten Geschwulstzellen kann durch einige chemotherapeutische Mittel gehemmt werden.

Prof. Dr. Béla KELLNER, Budapest XII. Ráth Gy. u. 5. Hungary

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

ÜBER DEN ELEKTRONENMIKROSKOPISCHEN NACHWEIS DES POLYOMASTAMMES BB-T2

D. BIERWOLF, A. GRAFFI und L. BAUMBACH

(Eingegangen am 27. Juli, 1960)

Bei unseren Bemühungen, das in unserem Laboratorium isolierte Virus der myeloischen Leukämie der Maus (Elektronenmikroskopischer Nachweis: HEINE, GRAFFI, BIERWOLF, HELMCKE, RANDT, 1957 und 1959; GRAFFI, HEINE, HELMCKE, BIERWOLF, RANDT, 1960) in der Gewebekultur zu züchten, trat bei der Beimpfung von trypsinierten Mäuseembryokulturen mit einer Gewebssuspension aus leukämischem Gewebe nach wenigen Tagen eine cytopathologische Veränderung der Embryonalzellen auf. Diese ließ sich durch zellfrei filtrierte Nährlösung solcher Kulturen serienweise weiter übertragen und stellte sich bei den Passagen mit Regelmäßigkeit 5—8 Tage nach der Beimpfung frisch ausgewachsener Mäuseembryokulturen ein (GRAFFI, GIMMY u. KRAUSE 1959). Zunächst wurde von uns eine Vermehrung des Leukämievirus als Ursache dieser Erscheinung vermutet. Die Verimpfung der zellfrei filtrierten Nährlösung solcher degenerativ veränderter Kulturen auf neugeborene Ratten, Goldhamster und Mäuse zeigte uns jedoch sehr bald, daß der cytopathogene Effekt nicht auf das Leukämievirus zurückzuführen, sondern mit großer Wahrscheinlichkeit einem zweiten Agens zuzuschreiben ist. Es entstanden nämlich bei den im neugeborenen Zustand behandelten Tieren in hohem Prozentsatz die verschiedensten mesenchymalen Tumoren, wie Nieren-Sarkome, gut- und bösartige Knochentumoren, Lipome, Tumoren in der Parotisgegend, Fibrome etc., während Leukämien völlig fehlten (GRAFFI, GIMMY, KRAUSE, 1959; GIMMY, GRAFFI, KRAUSE, 1959). Damit hatten sich in unseren Versuchen Befunde ergeben, die in mehrfacher Beziehung zu den Resultaten von GROSS (1953) und von STEWART und EDDY (1958) mit dem Parotis-Tumor-Polyomavirus Parallelen zeigen, in deren Versuchen zellfreie Filtrate der lymphatischen Leukämie des AK-Inzuchtstammes der Maus außer Leukämien noch Parotis-Tumoren sowie vereinzelt subcutane Sarkome hervorzurufen vermögen. Erste Hinweise für das Vorhandensein zweier verschiedener Viren, von denen das eine die Leukämien und das andere die Parotis-Carcinome und -Sarkome bedingt, ergaben sich aus Versuchen von GROSS, indem er nachweisen konnte, daß des Leukämieagens sich bei bedeutend niedrigerer Tourenzahl sedimentieren läßt als das Parotistumoragens und daß es im Gegensatz zum Parotistumor-Faktor durch Äther

inaktivierbar ist. Bekanntlich konnte letzteres von STEWART und EDDY (1958) in der Gewebekultur auf Mäuseembryonalzellen zur Vermehrung gebracht werden, wobei es einen starken cytopathogenen Effekt erkennen ließ. Filtrate solcher Kulturen zeigten zuerst bei Mäusen und später bei Ratten und Hamstern eine starke onkogene Wirkung, wobei in den verschiedenen Organen Sarkome, Carcinome sowie gutartige Tumoren auftraten. Es ergab sich nun die Frage, ob das von uns aus virusbedingten myeloischen Leukämien der Maus isolierte polyvalente Geschwulstagens, dem wir die Bezeichnung BB—T 2-Virus gaben, mit dem Parotistumor-Polyomavirus von GROSS—STEWART und EDDY völlig identisch ist oder gewisse Unterschiede zwischen beiden bestehen. Eine der charakteristischen Eigenschaften des STEWART-EDDY'schen Polyomastammes ist dessen starke Haemagglutinationswirkung auf verschiedene Erythrocytenarten, z. B. des Meerschweinchens, des Frosches und der Blutgruppe O vom Menschen. In ausgedehnten Untersuchungen in unserem Laboratorium gemeinsam mit G. PASTERNAK konnte für unser BB—T 2-Virus diese haemagglutinierende Wirkung nicht nachgewiesen werden. Ein weiterer Hinweis für eine gewisse Unterschiedlichkeit beider Virusstämme ergab sich aus dem Spektrum der bei den verschiedenen Spezies auftretenden Tumoren, wobei für unseren Virusstamm die bei der Ratte und auch beim Kaninchen erzeugten Lipome und Liposarkome die von STEWART und EDDY nicht beobachtet wurden, charakteristisch zu sein scheinen. Aus diesen biologischen Daten ergab sich die Schlußfolgerung, daß es sich bei dem Polyomavirus von GROSS, STEWART und EDDY und unserem BB—T 2-Virus wahrscheinlich um zwei nahe verwandte Stämme der gleichen Virusfamilie handeln dürfte.

Die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen dienten dem elektronenmikroskopischen Nachweis unseres BB—T 2-Virus. Es wurde damit die Absicht verbunden, auf Grund der morphologischen Struktur eine weitere Klassifizierung dieses Virus vorzunehmen und vor allem dessen verwandtschaftliche Beziehung zu dem GROSS—STEWART'schen Polyoma-Stamm weiter zu klären. Ein derartiger Versuch erschien umso aussichtsreicher, als es kürzlich zwei verschiedenen Arbeitskreisen gelang, das GROSS—STEWART'sche Polyma-Virus elektronenmikroskopisch im ultradünnen Schnitt nachzuweisen (BERNHARD, FEBVRE, CRAMER, 1959; BANFIELD, DAWE, BRINDLEY, 1959). Es handelt sich dabei um gleichförmig runde Partikel mit einem Durchmesser von 30—40 mμ, die hauptsächlich im Zellkern und später auch im Cytoplasma der Zellen anzutreffen sind.

Material und Methodik

Als Grundlage für die Vermehrung und Züchtung des Virus wurden Gewebekulturen von trypsiniertem Embryonalgewebe der Maus verwendet. Die Embryonen von trächtigen Weibchen des AB-Stammes wurden kurz vor dem Werfen (18—20. Tag der Embryonalentwicklung) steril aus dem Uterus entnommen und mechanisch fein zerkleinert. Diese Gewebestückchen wurden mit einer 0,25 %igen Trypsinlösung (Difco) in PPS-Lösung aufgeschlossen, die erhaltene Zellsuspension mehrmals durch Zentrifugieren in PPS gewaschen und anschließend

in der Nährlösung (5 Teile Tyrode, 3 Teile Kälber- oder Pferdeserum und 1 Teil Hühnerembryonalextrakt, 250 i. E. Penicillin und 250 mg Streptomycin/ml) aufgeschwemmt mit einer Zellzahl von etwa 600 000—700 000 Zellen pro ml. Diese Zellsuspension wurde in Rouxflaschen oder Roller-Tubes ausgesät. Nach gutem Anwachsen der Zellen zu einem Monolayer-Rasen auf der Glasfläche wurden die Kulturen 2mal wöchentlich gefüttert und nach etwa 6—8 Tagen mit einer Gewebssuspension aus leukämischem Gewebe beim primären Ansatz oder mit virushaltiger Nährlösung schon infizierter Kulturen bei der passagenweisen Züchtung des Virus beimpft. Zum Zwecke der elektronenmikroskopischen Präparation wurden die Zellrasen am 6—8. Tage, also dem Zeitpunkt des deutlich sichtbaren cytopathogenen Effektes mit dem Spatel vorsichtig von der Glasfläche gelöst und die feinen zusammenhängenden Zellflächen direkt in 1%iger auf pH 7,2 gepufferter OsO_4 2 Stunden fixiert. Die Entwässerung erfolgte in üblicher Weise mit Äthylalkohol 25%—100% unter eingeschalteter Kontrastierung mit PWS, und darauf die Einbettung in einem Gemisch von Methylmethacrylat (1 Teil) und Buthylmethacrylat (3 Teile) unter Zusatz von 1% Dibenzoylperoxyd als Katalysator. Die Polymerisation wurde bei 56° C vorgenommen. Die Ultradünnschnitte wurden mit einem Ultramikrotom nach Niklowitz angefertigt. Als Mikroskope standen das ÜM 100 von Siemens und das ÜM 60 von Siemens zur Verfügung. Herrn Prof. HELMCKE und seinen Mitarbeitern (Berlin-Dahlem) danken wir für die freundliche Überlassung der Elektronenmikroskope. Frl. A. RANDT möchten wir für ihre technische Assistenz danken.

Ergebnisse

Wie bereits in der Einleitung dargestellt wurde, zeigt das von uns aufgefundene Virus in der Gewebekultur einen eindeutigen cytopathogenen Effekt, der sich bei Verwendung von Mäuseembryonalzellen erstmalig nach 4—5 Tagen erkennen läßt und nach einer Woche ein sehr ausgeprägtes Stadium erreicht. Lichtmikroskopisch äußert sich dieser Effekt in einer zunehmenden Abrundung der Zellen und Verlust der normalerweise schlanken Ausläufer, wie sie für Fibroblasten charakteristich sind (Abb. 1*a* und 1*b*). Weiterhin verlieren die Zellen im nativen Zustand das optisch weitgehend homogene Aussehen des Cytoplasmas und werden zunehmend trübe und lichtbrechend durch das Auftreten von feineren und gröberen Granula und Schollen im Cytoplasma und Kern. Die Kernveränderungen können überwiegend als fortschreitende Pyknose angesehen werden, während die Prozesse im Cytoplasma zunächst wohl am besten in die Kategorie der trüben Schwellung einzuordnen sind. Schließlich kommt es zum fortschreitenden Zellzerfall, indem sich sowohl Zellkern als auch Cytoplasma in einzelne unregelmäßige Fragmente auflösen. Dieser Zellauflösung geht fast ausnahmslos ein Zerfall der Monolayer-Schicht in einzelne Stränge und dichtere Zellkonglomerate voraus, der dann eine Totalablösung der Zellen und eine freie Suspendierung derselben im Nährmedium folgt.

Es seien noch einige kurze Hinweise auf bestimmte cytologische Veränderungen der Zellen im mittleren Stadium dieses Degenerationsvorganges gegeben, die möglicherweise eine Aussage zur Virusvermehrung gestatten. (GRAFFI 1959.) Es handelt sich um teils stark lichtbrechende, chromophobe Einschlüsse, deren chemische Natur noch nicht näher definiert werden konnte, teils sind es cytologische Strukturen uncharakteristischer Gestalt, die Feulgen-positive Reaktion zeigen. Erstere lassen sich weder mit Fettfarbstoffen noch durch saure oder basische Farbstoffe imprägnieren, sie sind PAS-negativ und

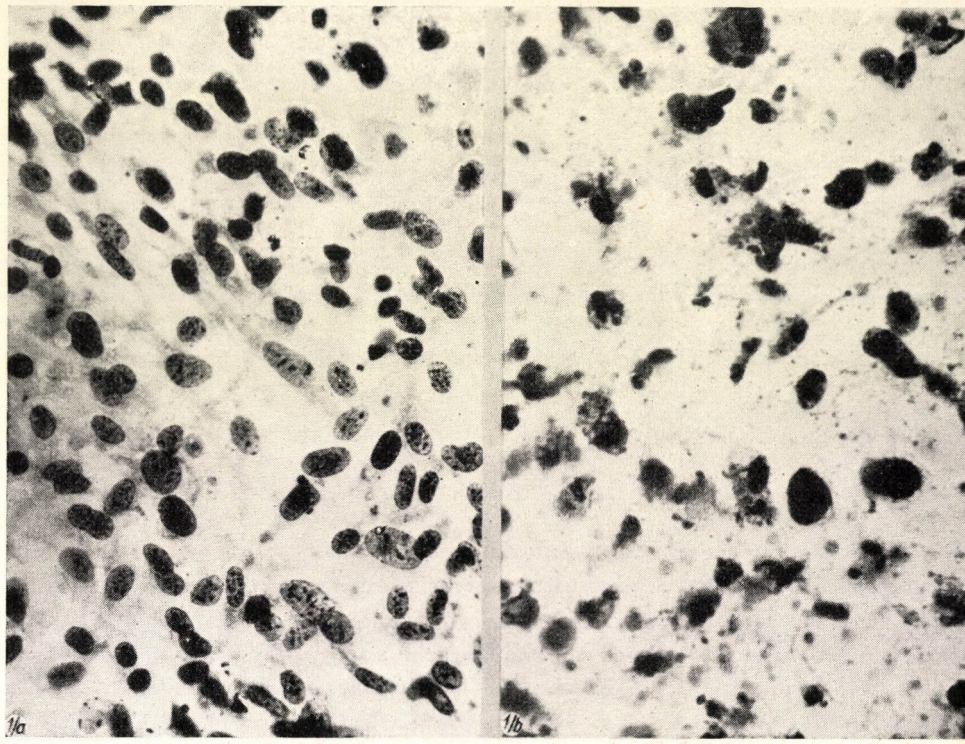


Abb. 1a. Normale Mäuseembryonalkultur
1b. Kultur mit cytopathogenem Effekt
Färbung: May—Grünwald—Giemsa

im elektronenmikroskopischen Bild bis auf ein feines Netzwerk optisch leer. Bei einer dritten Form von Einschlüssen im Cytoplasma handelt es sich um ovale bis runde vakuolenartige Höhlen mit einem zentralen Binnenkörper, der sich bei Giemsafärbung stark imprägniert und einen hohen Grad von Osmiophilie aufweist (Abb. 2). Die kausalen Beziehungen dieser 3 Einschlußtypen zur Viruswirkung und Virusvermehrung muß als weitgehend ungeklärt angesehen werden. Bei den Feulgen-positiven Einschlüssen handelt es sich wohl in erster Linie um Ansammlungen von Virus im Cytoplasma, was sich vor allem beim Studium der elektronenmikroskopischen Befunde ergibt (Abb. 4). Bei den beiden anderen Einschlußtypen ist an Produkte zu denken, die in der sich degenerativ verändernden Zelle entstehen.

Anhand dieser cytologischen Veränderungen, die nach der Virusinfektion auftreten und schon mit dem Lichtmikroskop gut zu erkennen sind, läßt sich das Studium des cytopathologischen Prozesses und damit der Viruswirkung auf die Zelle gut ablesen und zu den elektronenmikroskopischen Befunden in Beziehung setzen.

Unser Hauptanliegen bei den elektronenmikroskopischen Studien war der Nachweis und die nähere Charakterisierung des cytopathogenen und im Tierversuch onkogenen Virus. Nachdem in den ersten 4 Tagen nach der Infektion, wo also lichtmikroskopisch keine eindeutigen Veränderungen nachweisbar sind, keine sicheren Virusbefunde zu erheben waren, wurde hauptsächlich das Stadium des ausgesprochen cytopathologischen Erscheinungsbildes für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen herangezogen. Dies war zwischen

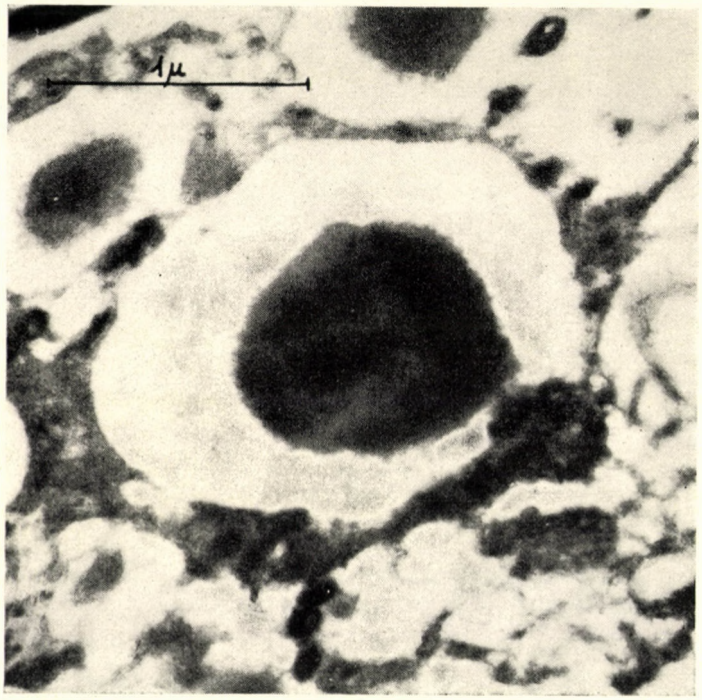


Abb. 2. Stark osmiophiler, cytoplasmatischer Einschluß in einer Zelle aus einer mit BB—T 2-Virus infizierten Gewebekultur. 1 : 45 000

dem 6—8. Tag post infektionem der Fall. Spätere Stadien waren meist wegen zu starker Degeneration der Zellen nicht mehr verwertbar.

Zunächst wandten wir uns der allgemeinen Topographie des Virus in der Zelle zu. Als ein für dieses Virus sehr charakteristisches Bild wurde seine äußerst starke Anreicherung im Zellkern nachgewiesen (Abb. 3). In vielen Zellen ist der Kern prall mit kleinen runden, ca. 30–40 mμ großen Partikeln angefüllt. Eingelagert in die Virusmasse sind, vor allem auch an der Peripherie des Zellkernes, osmiophile, dichte Massen von wechselnder Gestalt, bei denen es sich vorwiegend um das pyknotische Chromatin handeln dürfte (Kernwandhyperchro-

masie degenerativen Ursprungs). Außerdem finden sich mehr oder weniger im Zentrum des virusgefüllten Zellkerns meist etwas weniger dichte Reste des Nukleolus. Mit der Virusproduktion im Zellkern geht also eine degenerative Kernveränderung parallel.

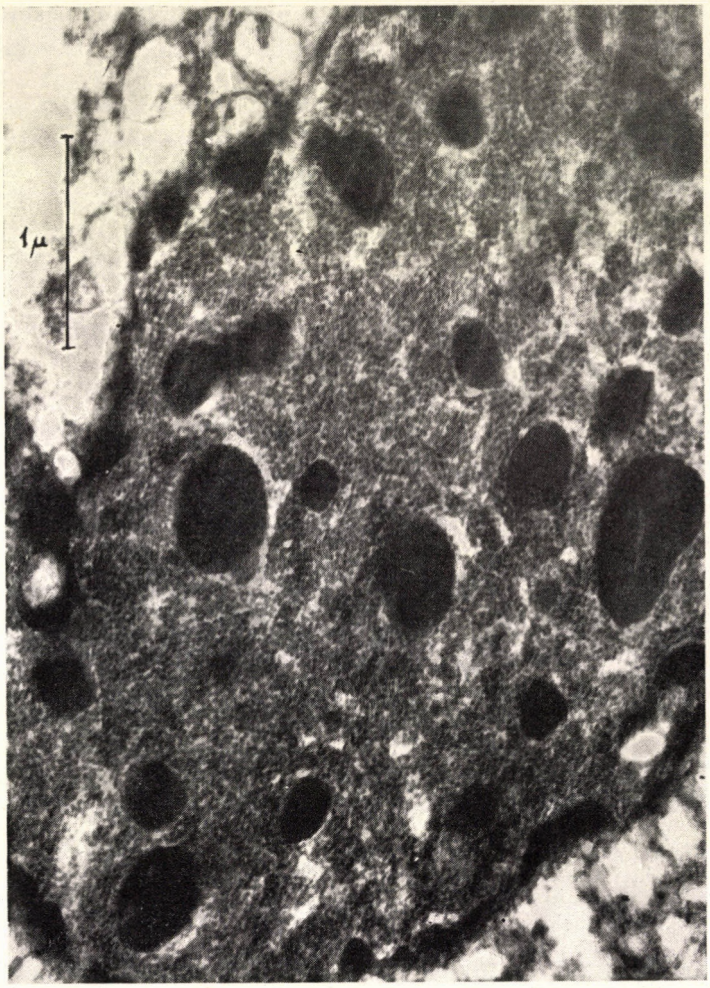


Abb. 3. Mit Viruspartikeln prall gefüllter Zellkern. Herdweise Verdichtung des Chromatins. 1 : 36 800

Außer im Zellkern werden die gleichen Viruspartikel auch im Cytoplasma der Zellen angetroffen, wenn auch nicht so regelmäßig, in geringerer Zahl und mit einer gewissen zeitlichen Verschiebung gegenüber dem Auftreten im Kern. Es kann also angenommen werden, daß das cytoplasmatische Virus zum großen

Teil aus dem Kern stammt und durch Aufreißen der Kernmembran in das Cytoplasma ausgetreten ist, wenn auch eine primäre Virusvermehrung im Cytoplasma nicht ganz ausgeschlossen werden kann. In diesem Sinne sprechen vor allem cytoplasmatische Virushaufen, die in relativ größerer Entfernung von der Kernmembran liegen (Abb. 4). Die Haufenform ist die häufigste Virusanordnung im Cytoplasma, zuweilen kann aber auch eine diffuse Verteilung über das Cytoplasma vorliegen. Eine besondere Virusanordnung innerhalb des

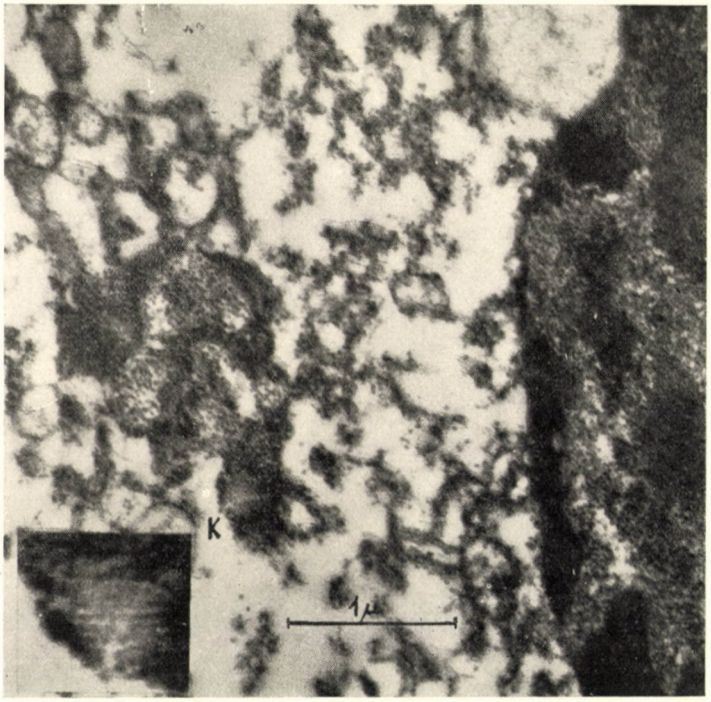


Abb. 4. Virusansammlungen im Kern (rechts) und im Cytoplasma (links). Bei K kristalline Anordnung der Partikel (siehe auch Ausschnitt).
1 : 28 800, Ausschnitt 1 : 72 000

Cytoplasmas ist in der Abb. 5 wiedergegeben. Es handelt sich um vakuolenartige Gebilde, die wahrscheinlich mit Flüssigkeit gefüllt sind und im Inneren Virusteilchen in beträchtlicher Zahl enthalten. Vor allem an der Wand dieser Vakuolen scheinen sich die stark aggregierenden Viruselemente in einfacher oder doppelter Schicht anzuordnen. Ähnliche Bildungen werden von BANFIELD und Mitarb. (1959) beim Polyoma beschrieben.

Schließlich ist das Virus oft in beträchtlichen Massen außerhalb der Zellen anzutreffen. Es muß zunächst offenbleiben, ob es in das extrazelluläre Medium von noch intakten, virushaltigen Zellen ausgeschleust wird oder durch

Zelluntergang in die Flüssigkeit übertritt. Die starke Neigung des Virus zur Aggregation zeigt sich auch extrazellulär, indem im elektronenmikroskopischen Bild die verschiedensten Girlandenformen und ringartigen Strukturen (Abb. 6), die aus einzelnen Viruselementen zusammengesetzt sind, angetroffen werden.

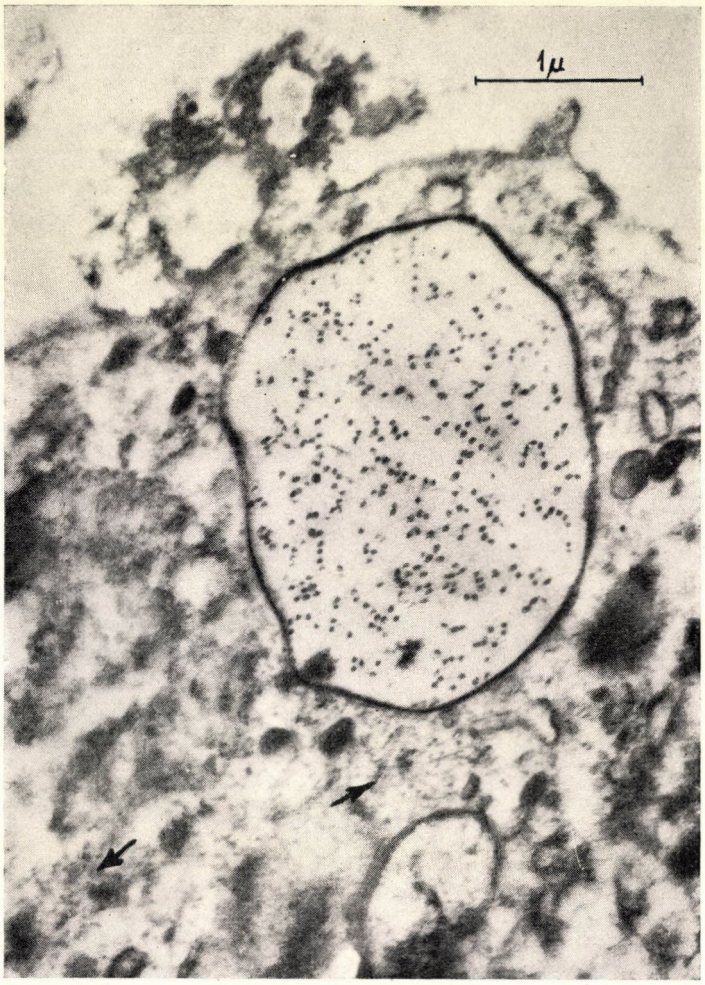


Abb. 5. Virusansammlung in einer cytoplasmatischen Vakuole und diffuse Verteilung im Cytoplasma (siehe Pfeile)
1 : 28 800

Diese besondere Haftfähigkeit der Partikel untereinander drückt sich auch im Zellkern, im Cytoplasma und im extrazellulären Raum in der Bildung von regelrechten Viruskristallen aus (Abb. 4), wobei allerdings noch offenbleiben muß, ob diese Erscheinung nicht unmittelbar mit der Virusvermehrung in Zusammenhang steht.

Wie bereits gesagt, handelt es sich bei den Viruspartikeln um kleine runde Elemente von 30—40 mμ Durchmesser. Eine besondere Feinstruktur im Sinne von Membranen und Nukleoiden, wie bei anderen onkogenen Viren (Leukämie, Milchfaktor) konnten wir bis jetzt nicht eindeutig nachweisen. Allerdings

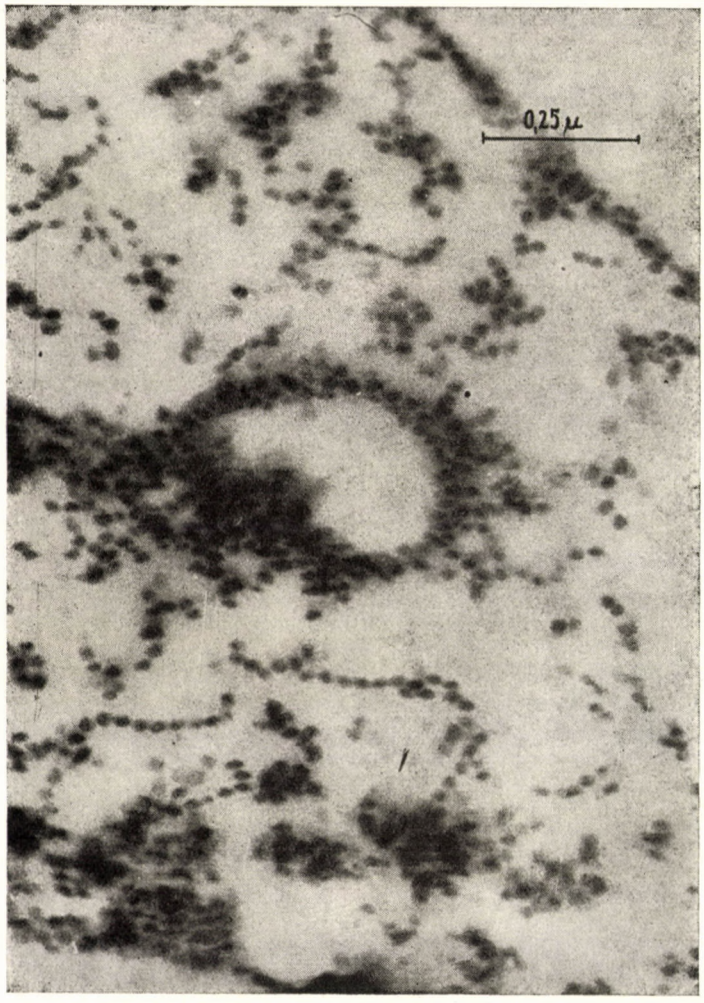


Abb. 6. Extrazelluläre Virusanhäufung und Ausbildung von »Girlanden- und Ringstrukturen« 1 : 110 000

zeigen einige wenige Partikel eine zentrale, leichte Aufhellung, die jedoch auch ein Kunstprodukt oder eine Degenerationserscheinung darstellen könnte. Man gewinnt also den Eindruck, daß es sich bei den Partikeln um ein »nacktes« Virus (OBERLING) handelt, wie z. B. beim Virus des Shope—Papilloms des

Kaninchens. Neben den runden, ziemlich gleichförmigen Viruspartikeln findet man jedoch im Zellkern fadenförmige Elemente gleichen Durchmessers und gleicher Elektronendichte, die eine Länge von durchschnittlich 300 mμ aufweisen können und manchmal die Anzeichen einer angedeuteten Segmentierung

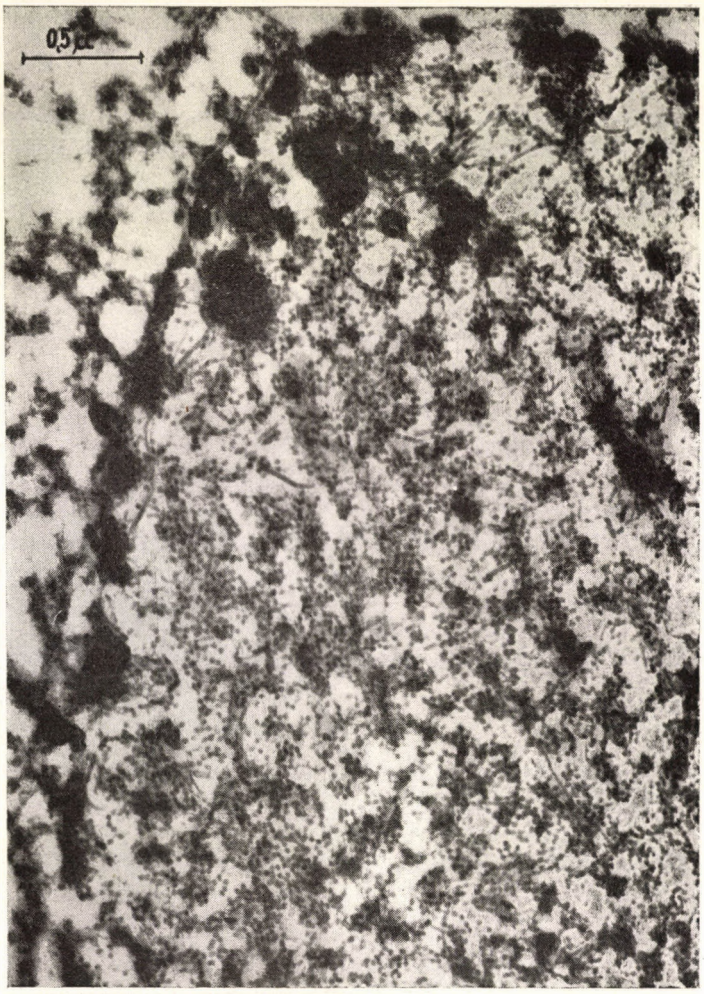


Abb. 7. Ausschnitt aus einem mit Virus gefüllten Zellkern. Ausbildung von Fadenstrukturen und Verdichtung des Chromatins an der Kernmembran. 1 : 40 000

erkennen lassen (Abb. 7). Es ist nicht zu klären gewesen, ob aus diesen fadenförmigen Elementen durch Abschnürungs- oder Segmentierungsvorgänge runde Partikel entstehen. Auffällig ist, daß diese Fäden oft in Gruppen gehäuft vorkommen. Auch die Beziehung dieser kompakteren Fäden zur perlschnur-

artigen Anordnung von Einzelpartikeln im Cytoplasma und außerhalb der Zelle (Abb. 6) ist ungeklärt. Eventuell ist diese Anordnung jedoch auf das schon erwähnte Aggregationsphänomen zurückzuführen. Auch BERNHARD und Mitarb. (1959) beschreiben für das GROSS—STEWART'sche Polyoma-Virus die

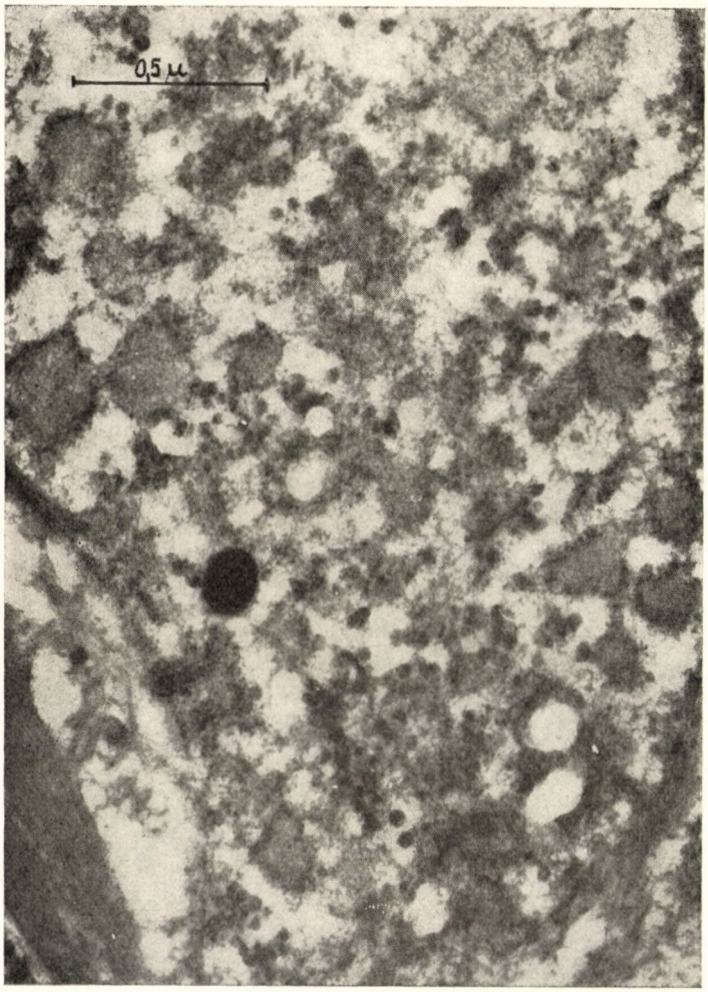


Abb. 8. Virusverdächtige Partikel im Cytoplasma einer Parotistumorzelle. 1 : 64 000

im Kern vorkommenden Fadenstrukturen und diskutieren ihren eventuellen Zusammenhang mit der Virusbildung.

Eine wichtige Frage geht dahin, welche kausalen und genetischen Beziehungen zwischen den strukturierten Bestandteilen des Zellkerns (Chroma-

tin und Nukleolen) und dem Virus bestehen. Generell kann gesagt werden, daß mit zunehmender Anhäufung von Viruspartikeln im Zellkern eine Veränderung der typischen Kernstruktur einhergeht. Anfangs liegen nur einzelne Viruspartikel und die genannten Fäden in der granulär-netzigen Grundsubstanz des Kerns verstreut und Chromatinbrocken und Nukleolus zeigen noch die typische Struktur. Mit zunehmender Virusvermehrung verschwindet jedoch die charakteristisch strukturierte Grundsubstanz und der gesamte Raum des Kernes wird nur von Viruspartikeln, einigen Fäden und pyknotischem Chromatin- und Nukleolusmaterial eingenommen, wobei die Zwischenräume zwischen den genannten Strukturen jetzt elektronenoptisch völlig leer sind. Durch die starke herdweise Verdichtung des Kerninhaltes während der Pyknose ist zunächst noch nicht zu entscheiden, ob auch Kernmaterial unmittelbar in die Viruselemente umgewandelt wird.

Der Virusnachweis in der Gewebekultur war zum Zeitpunkt des eindeutigen Auftretens des cytopathogenen Effektes ein konstantes Phänomen und konnte für eine große Zahl von verschiedenen Zellen aus dem gleichen Präparat erbracht werden. Es ergab sich nun die wichtige Frage, ob auch in den durch das Virus *in vivo* erzeugten Tumoren Viruselemente elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden können. An einer großen Zahl von mesenchymalen Tumoren des Goldhamsters und der Ratte ist uns bis jetzt der Nachweis noch nicht gelungen. Diese Beobachtung stimmt auch mit dem biologischen Test überein, indem aus den Tumoren nur ausnahmsweise über die Gewebekultur eine Reisolierung möglich war. Die direkten Filtrate aus den Tumoren haben im Tierversuch selten onkogene Wirkung gezeigt.

Schließlich wurden von uns noch durch BB—T 2-Virus aus der Gewebekultur erzeugte Parotistumoren bei der Maus im Feinschnitt untersucht. Diese Tumoren unterscheiden sich von den meisten Ratten- und Hamstertumoren durch eine wesentlich längere Latenzzeit. Als vorläufiger Befund konnten in einem Falle eines Parotistumors der Maus virusverdächtige Partikel, die an das BB—T 2-Virus aus der Gewebekultur erinnern, nachgewiesen werden. Die Größe der Partikel liegt mit 40—50 mμ etwas über der des BB—T 2-Virus in der Kultur. Die Partikel sind im Cytoplasma der Zellen lokalisiert (Abb. 8).

Diskussion

Auf Grund der dargelegten Befunde glauben wir berechtigt zu sein, die aufgefundenen Viruselemente als das BB—T 2-Virus anzusprechen. Vor allem spricht auch die Parallelität zwischen dem cytopathogenen Effekt und den morphologischen Virusbefunden und ebenso die hochgradige onkogene Wirksamkeit der Nährlösungen solcher Gewebekulturen für diese Tatsache. Wie in der Einleitung bereits hervorgehoben, ist das Polyoma-Virus von STEWART und

EDDY sowie einige andere Polyoma-Stämme vor einiger Zeit von verschiedenen Autoren (BERNHARD und Mitarb., 1959; DOURMASHKIN und NEGRONI, 1959; BANFIELD, DAWE, BRINDLEY, 1959; DMOCHOWSKI, GREY, MAGEE, 1959) elektronenmikroskopisch nachgewiesen worden. Beim Vergleich unserer Befunde mit denen dieser Autoren findet sich eine gute Übereinstimmung, die sowohl in Bezug auf die Lokalisation, als auch auf Größe und Form der Viruselemente besteht. Dadurch ergibt sich ein weiterer Hinweis für die Zugehörigkeit unseres Virus-Stammes zur Gruppe der Polyoma-Viren. Auch unsere Befunde zeigen, daß es sich bei dieser Virusfamilie mit ausgeprägt vielseitiger onkogener Wirksamkeit um eine von den meisten onkogenen Viren morphologisch abweichende Klasse handelt. Als Besonderheiten sind zu nennen: Die Kleinheit des Virus, das Fehlen einer spezifischen, elektronenmikroskopisch faßbaren Feinstruktur und vor allem auch die hauptsächliche Lokalisation im Zellkern. Es ist in dieser Hinsicht am besten mit dem Shope-Papillom-Virus des Kaninchens zu vergleichen. Bekanntlich sind die meisten übrigen onkogenen Viren, vor allem die Leukämie- und Mamma-Carcinom erzeugenden Viren der Maus, sowie die Viren der Hühnerleukämien mindestens doppelt so groß und besitzen durchweg Nukleoide und begrenzende Membranen, mit denen zuweilen eine Polymorphie verbunden ist.

Ein besonders nennenswerter Umstand ist das seltene Vorkommen, bzw. völlige Fehlen der Partikel in den erzeugten Tumoren mit Ausnahme einiger Parotistumoren (DOURMASHKIN und NEGRONI, 1959) und Nierensarkome (HOWATSON und Mitarb., 1960). Das zwingt zu der Annahme, daß innerhalb der ausgebildeten Tumorzellen das Virus nicht in Form von Elementarpartikeln, also nicht in strukturiertem Zustand vorliegt, sondern möglicherweise als maskiertes Virus, eventuell als Nukleinsäure oder Nukleoproteid in einer Bindung an den genetischen Nukleinsäure-reproduzierenden Apparat der Zelle. Dieses Problem ist von ganz besonderem Interesse und dürfte einen wichtigen Schlüssel zur Klärung der Wirkungsweise onkogener Viren beim Malignisierungsprozeß in sich bergen.

Zusammenfassung

Es wird über die elektronenmikroskopische Charakterisierung eines Virus, das aus leukämischem Gewebe der myeloischen Leukämie der Maus in der Gewebekultur isoliert wurde, berichtet. Das Virus muß in die Familie des Polyoma-Virus eingeordnet werden und unterscheidet sich wesentlich (Wirkungsweise und Morphologie) vom Leukämievirus. In der Gewebekultur erzeugt es nach 5—8 Tagen auf Monolayerkulturen vom Mäuseembryo einen cytopathogenen Effekt, der sich passagenweise übertragen läßt.

Elektronenmikroskopisch wurden in erster Linie im Zellkern, sowie auch im Cytoplasma und im extrazellulären Raum Viruspartikel von 30—40 mμ Durchmesser und gleichförmiger Gestalt ohne Innenstruktur nachgewiesen. Es werden die Lokalisation in der Zelle, die Anordnung der Partikel, sowie deren mögliche Entstehungsweise näher besprochen.

LITERATUR

1. Banfield, W. G.—Dawe, C. J.—Brindley, D. C. (1959): J. Nat. Cancer Inst. *23*, 5, 1123. — 2. Bernhard, W.—Febvre, H. L.—Cramer, R. (1959): Compt. rend. *249*, 483—485. — 3. Eddy, B. E.—Stewart, S. E.—Berkeley, W. (1958): Proc. Soc. Exp. Biol. Med. *98*, 4, 848. — 4. Dmochowski, L.—Grey, C. E.—Magee, L. A. (1959): Proc. Soc. Exp. Biol. Med. *102*, 3, 575. — 5. Dourmashkin, R. R.—Negroni, G. (1959): Experim. Cell Res. *18*, 573—600. — 6. Graffi, A. (1950): Berliner Symposium über Cancerogenese. Akad. Verl., Berlin, 323. — 7. Graffi, A.—Gimmy, J.—Krause, L. (1959): Naturwiss. *46*, 9, 330. — 8. Graffi, A.—Heine, U.—Helmcke, J. G.—Bierwolf, D.—Randt, A. (1960): Klin. Wschr. *38*, 6, 254. — 9. Gimmy, J.—Graffi, A.—Krause, L. (1959): Acta biol. et med. germ. *3*, 5, 509. — 10. Gross, L. (1953): Proc. Soc. Exp. Biol. Med. *83*, 414. — 11. Heine, U.—Graffi, A.— Helmcke, J. G.—Randt, A. (1957): Naturwiss. *44*, 449. — 12. Heine, U.—Graffi, A.—Bierwolf, D.—Helmcke, J. G.—Randt, A. (1959): Acta biol. et med. germ. *3*, 9, 608. — 13. Howatson, A. F.—Mc Culloch, E. A.—Almeida, E. A.— Siminovitch, L. — Axelrad, A. A.—Ham, A. W. (1960): J. Nat. Canc. Inst. *24*, 5, 1131.— 14. Stewart, S. E.—Eddy, B. E.—Gochenour, A. M.—Borgese, N. G.—Grubbs, G. E. (1957): Virology *3*, 380—400.

ЭЛЕКТРОННОМИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ ШТАММА ВИРУСА ПОЛИОМЫ ВВ—Т 2

Д. БИРВОЛЬФ, А. ГРАФФИ и Л. БАУМБАХ

Авторы дают электронномикроскопическую характеристику вируса, изолированного из лейкемической ткани при миэлоидной лейкемии мышей. Вирус следует отнести к семейству виросов полиомы и он существенно отличается (в отношении действия и морфологии) от вируса лейкемии. Он вызывает в тканевых культурах по истечении 5—8 дней на мономолекулярных культурах зародиша мышей цитопатогенный эффект, передаваемый от одного пассажа к другому.

В электронном микроскопе были выявлены в первую очередь в клеточном ядре, но и в цитоплазме и в внеклеточном пространстве вирусные частицы с диаметром в 30—40 мк, однородной формы без внутренней структуры. Подробно обсуждаются локализация в клетке и распределение этих частиц, как и их предположительный способ возникновения.

ELECTRON-MICROSCOPIC DEMONSTRATION OF THE POLYOMA STRAIN BB—T2

D. BIERWOLF, A. GRAFFI and L. BAUMBACH

The electron-microscopic determination of a virus isolated from explanted mouse myeloid leucaemia tissue is described. The virus belongs to the polyomavirus family and is both in effect and morphology fundamentally different from the virus of leucaemia. After 5 to 8 days in mouse embryo monolayer cultures the virus produces a cytopathogenic effect which can be passaged.

Electron-microscopy revealed, chiefly in the nucleus but also in the cytoplasm and the extracellular space, uniform viral particles 30 to 40 mμ in diameter. Cellular localization, arrangement and the presumable origin of the particles are discussed in detail.

Dr. D. Bierwolf
Prof. Dr. A. Graffi
Dr. L. Baumbach
Berlin-Buch, Lindenberger Weg 70., D. D. R

A kiadásért felel az Akadémiai Kiadó igazgatója
Műszaki szerkesztő: Farkas Sándor
A kézirat nyomdába érkezett: 1960. XII. 3. — Terjedelem: 23 (A/5) ív, 164 ábra (30 színes), 6 melléklet

1961.52540 — 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 I. Fő utca 32. 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 I. Fő u. 32. 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 I. Fő utca 32. Текущий счет № 43-790-057-181) или его заграничные представительства и уполномоченные.

INDEX

MORPHOLOGIA NORMALIS ET EXPERIMENTALIS

Rappay, Gy.—Balogh, Gy.: Vergleichende histochemische Untersuchung der Nukleoproteide in den Blutzellen von Wirbeltierarten I. Untersuchung der Wirkung proteolytischer Enzyme 111

Csaba, Gy.—Horváth, C.: Transplantation of Regenerative Hepatic Tissue..... 119

Pályi, I.—Kapa, E.: Über das Verhalten der Hassallschen Körperchen nach Röntgenbestrahlung 127

Pósalaky, Z.—Gyévai, A.—Bukulya, B.: Contributions to the Mechanism of Spermatogenesis, on the Basis of Studies of the Acid-fast Staining, Succinic Dehydrogenase Activity and Histochemical Examination of Lipids 137

Mangold, O.: Freie Linsen in augenlosen Köpfen und Isolaten von *Triturus alpestris*.... 153

Bucher, O.: A propos du rythme fonctionnel cellulaire dans les reins 177

Токин, Б. П., — Еричева, Ф. И. — Калинина, Е. И.: Регенерация, соматический эмбриогенез и сопутвующие им явления у *Laomedea flexuosa* и у некоторых других нисших *Coelenterata* 185

Stanek, I.: Mikrokinematographischer Beitrag zur Problematik der Entstehung und Vermehrung der Makrophagen in Nervengewebekulturen 209

Vigh, B.—Aros, B.—Zaránd, P.—Törk, I.—Wenger, T.: Gomori-positive Secretion in the Subcommissural Organ of Different Vertebrates 217

Karmazsin, L.: Probleme der embryonalen Faserentwicklung 237

Krompecher, St.: Zelle und Gewebseinheit 259

Tokin, I. B.: On the electron microscopy of membrane structures of cells 269

Menkes, B.: Transsektionsexperimente am 12-Somiten Hühner-Embryo 277

Mayersbach, H.: Probleme der histologischen Mitochondriendarstellung 285

Müller, M.—Röhlich, P.: Studies on Feeding and Digestion in Protozoa II. Food Vacuole Cycle in *Tetrahymena corlissi* 297

Szentágothai, J.: Somatotopic Arrangement of Synapses of Primary Sensory Neurons in Clarke's Column 307

PATHOLOGIA

Baló, J.: Zur Frage der Fettmobilisierung 313

Selye, H.—Nielsen, K.: Histogenesis of Experimental Cutaneous Calcinosis..... 327

ONCOLOGIA

Kellner, B.: Progression of Tumour Growth and Formation of Metastases 337

Bierwolf, D.—Graffi, A.—Baumbach, L.: Über den elektronenmikroskopischen Nachweis des Polyomastammes BB-T 2 357