

Morphologica

Academiae Scientiarum Hungaricae

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

> redigit I. TÖRŐ

TOMUS XIII * FASCICULUS I



ACTA MORPH. HUNG.

ACTA MORPHOLOGICA A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA ORVOSTUDOMÁNYI KÖZLEMÉNYEI

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

Technikai szerkesztő:

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 »Kultúra« (Budapest I., Fő utca 32. Bankkonto Nr. 43-790-057-181) oder bei seinen Auslandsvertretungen und Kommissionären.

ACTA MORPHOLOGICA

Tomus XIII.

INDEX

Radnai, BDömötör, LKálmán, P.: Openings of Different Origin on the Mitral	
Valve Dévényi, I.—Endes, P.—Gomba, Sz. : Behaviour of Juxtaglomerular Granulated Cells in	3
the Autotransplanted and Homotransplanted Renal Tissue of Weanling and Foetal Rats	13
Gomba, SzB. Soltész, Margit-Endes, P.: Studies of the Granulated Cells of the	10
<i>Kiss, F. A.</i> : Osteogenesis in Costal Cartilage Induced by Local Administration of	19
Adrenal Extract	25
der Gomori-Takamatsuschen alkalischen Phosphatasereaktion Földes, IMódis, LSüveges, I.: Metachromasia in Cartilaginous Tissues Törő, IPálxi, Irén-Csapó, IGazó, I.: Microcinematographic Studies of the	$\frac{35}{43}$
Epithelial Cells of the Thymus.	51
Pancreas	75
Tóth, FCsömör, SMészáros, J.: Mesonephrogenes Adenokarzinom und Adenom	0.2
Matwejewa, N. A. : Zur Frage der afferenten Innervation der Netzhaut Péczely, P. : Functional-Anatomical Examination of the Interconnexion between the	83 93
Morphological Features of the Thoracic Vertebrae in Birds of Brey and their Acquisition of Food	101
Németh-Csóka, MKaiser, M.: The Effect of Aging-Induced Changes of Collagen	
Protein on Fibrillogenesis in vitro Scherehren M. 4. : Angeben über die Morphologie der Nervenfasern in einigen Nerven	119
von Haustieren	131
Földes, I.—Módis, L.—Süveges, I.: Investigation of the Mucopolysaccharides in the Proximal Epiphyseal Cartilage of the Rat: A Comparison of the Methods of	
Histochemical Assay	141
Maturation of the Acinar Cells and Genesis of the Secretory Droplets Maturation of the Acinar Cells and Genesis of the Secretory Droplets	155
suchungen an Nieren und zur Darstellung der Nierensegmente	167
Ganglien des Auerbachschen Geflechts	175
Módis, LSüveges, IFöldes, I.: Histochemical Identification of Carbohydrates by	107
Means of Metal Colloids	207
intrakranialen Venenbildungen Kondics, L.: Die Wirkung von ACTH und Prednisolon auf die funktionale Zonation	217
der Nebenniere bei der Taube (Columba domestica)	233
Gyenge, E.— Urbán, I.— Nagy, J.: Anisotropic Staining of Mast Cell Granules Jobst. K.: Metaphosphoric Acid Reaction of Nucleoproteins	$241 \\ 247$
Szabó, I.: Combined Staining of Central Nervous System Tissue with Luxol Fast Blue	
and Basic Fuchsin	251

Acta Morphologica Academiae Scientiarum Hungaricae 14. 1966

Banga, ISzabó, D.: Examination of Collagen Fibres Following Tratment with	
Lyotropic Agents	255
Réthelyi, M. – Világhy, M. : On Supposed Direct Reflex Collaterals of Primary Trigeminus	0.0
Afferents to Motor Cranal Nerve Nuclei.	263
Neumark, T. – Farkas, K. : Submicroscopic Changes of the Aortic Structure in Lathyrus-	200
Fed Rats	269
Foldes, L. Zs. Nagy, I. Benko, K. Leval, G. Ary-Balogh, P.: Elektronenmikroskopi	909
sche Untersuchungen am postembryonalen Epiphysenknorpei der Albinoratte	283
Jobst, A.: Quantitative Cytophotometric Determination of Nuclear Proteins after	201
Alkylation $P_{i} = C_{i} + C_{$	201
Somogyi, E Kozsa, Gy Solonyi, P.: Histochemische und Hubreszenzoptische Unter-	911
suchungen der Strömmarke	211
Fatter, J Unguary, G.: Correlation between Fortobinary and Venous Lobes and the	217
Shape of the Liver	514
Jones, J. Dinoussi, Z. Dinyuron neutrana and Asid Phosphatese in the Spingl Conde	
of Bablis with Chronic Manganese Doisoning	320
Vaida I Tämbäl T. Die Lymphaefäßstruktur der Dündermwend	330
Vaida, J. – Tömböl, T. : Beiträge zum mesenterialen Lymphkreislauf	349
Hackensellner, H. A. – Törelmann I. · Das Elächenbild des Endothels der donnelt	017
ligierten Arteria carotis des Kaninchens	359
Sas. I.—Grino. E.—Benedetti, W. L.—Anneliauer, L. C.—Dominguez, R. : Adenohyno-	007
physis and Brain Stem, Basophilia and "Castration Cells" in the Adenohypophysis	
of the Male Rat Bearing Brain Stem Lesions	377
Banga, ILoeven, W. ARomhánvi, Gy. : Histochemical Studies of Elastic Fibres by	
the Use of Leastolytic Enzymes Separated by Chromatography on DEAE-Sephadex	
Column	385
Romhányi, Gy.: On the Submicroscopic Structure of the Elastic Fibres of the Bovine	
Ligamentum Nuchae as Revealed by the Polarization Microscope	397
Vanek, J.: Granulomata of the Liver, Probably of Allergic Origin	411
Recensiones	421

INDEX AUTORUM

A

- Appeltauer, L. C. vide Sas, J.-Grino, E.-
- Benedetti, W. L.-Dominguez, R. 377 Ary-Balogh, P. vide Földes, L. Zs. Nagy,
- I. Benkő, K. Lévai, G. 283

B

- Baló, J. vide Sellyei, M. 75
- Banga, I.-Szabó, D. 255
- Banga, I.-Loeven, W. A.-Romhányi, Gy. 385
- Benedetti, W. L. vide Sas, J.-Grino, E.-Appeltauer, L. C. - Dominguez, R. 377
- Benkő, K. vide Földes, L.-Zs. Nagy, I.-Lévai, G. - Ary-Balogh, P. 283
- B. Soltész, Margit vide Gomba, Sz.-Endes, P. 19

Cs

- Csapó, I. vide Törő, I.-Pályi, Irén-Gazsó, L. 51
- Csömör, S. vide Tóth, F.-Mészáros, J. 83

D

E

- Dévényi, I.-Endes, P.-Gomba, Sz. 13
- Dömötör, L. vide Radnai, B.-Kálmán, P. 3
- Dominguez, R. vide Sas, J.-Grino, E. Benedetti, W. L. - Appeltauer, L. C. 377
- Endes, P. vide Dévényi, I.-Gomba, Sz. 13
- Endes, P. vide Gomba, Sz.-B. Soltész, Margit 19

F

- Faller, J.- Ungváry, G. 317
- Farkas, K. vide Neumark, T. 269
- Földes, I.-Módis, L.-Süveges, I. 43, 141
- Földes, I. vide Módis, L.-Süveges, I. 207
- Földes, L.-Zs. Nagy, I.-Benkő, K.-Lévai, G.-Ary-Balogh, P. 283

C

- Gazsó, L. vide Törő, I. Pályi, Irén Csapó, I. 51
- Gomba, Sz. vide Dévényi, I.-Endes, P. 13

Gomba, Sz.-B. Soltész, Margit-Endes, P. 19

Grino, E. vide Sas, J.-Benedetti, W. L.-Appeltauer, L. C.-Dominguez, R. 377 Gyenge, E.-Orbán, I.-Nagy, J. 241

Hackensellner, H. A.-Töpelmann, I. 359

Л

H

- Jonek, J.-Olkowski, Z. 329
- Jobst, K. 247, 301

K

- Kaiser, M. vide Németh-Csóka, M. 119
- Kálmán, P. vide Radnai, B.-Dömötör, L. 3
- Kelényi, G.-Orbán, S. 155
- Kiss, F. A. 25
- Kondics, L. 233

- Lévai, G. vide Földes, L.-Zs. Nagy I.-Benkő, K.-Ary-Balogh, P. 283
- Loeven, W. A. vide Banga, I.- Romhánvi, Gy. 385

M

- Matthias, R. 167
- Matwejewa, N. A. 93 Mazsuga, P. M. 187
- Michailow, S. S. 217
- Milocchin, A. A. 175
- Mészáros, J. vide Tóth, F.-Csömör, S. 83
- Módis, L. Süveges, I. Földes, I. 207
- Módis, L. vide Földes, I. Süveges, I. 43-141

N

- Nagy, J. vide Gyenge, E.-Orbán, I. 241
- Németh-Csóka, M.-Kaiser, M. 119
- Neumark, T.-Farkas, K. 269

0

- Orbán, I. vide Gyenge, E.-Nagy, J. 241 Orbán, S. vide Kelényi, G. 155
- Olkowski, Z. vide Jonek, J. 329

- P
- Pályi, Irén vide Törő, I. Csapó, I. Gazsó, L. 51
- Péczely, P. 101
 - \mathbf{R}
- Radnai, B.-Dömötör, L.-Kálmán, P. 3
- Réthelyi, M.-Világhy, M. 263
- Romhányi, Gy. vide Banga, I.-Loeven, W. A. 385
- Romhányi, Gy. 397
- Rózsa, Gy.-Sótonyi, P. 35
- Rózsa, Gy. vide Somogyi, E.-Sótonyi, P. 311 S
- Sas, J.-Grino, E.-Benedetti, W. L.-Appeltauer, L. C.-Dominguez, R. 377
- Scherebzow, M. A. 131 Sellyei, M.—Baló, J. 75
- Somogyi, E.-Rózsa, G.-Sótonyi, P. 311
- Sótonyi, P. vide Rózsa, Gy. 35
- Sótonyi, P. vide Somogyi, E.-Rózsa, Gy. 311
- Süveges, I. vide Földes, I.-Módis, L. 43, 141

Süveges, I. vide Módis, L.-Földes, I. 207

- Sz
- Szabó, I. 251

Szabó, D. vide Banga, I. 255

T

Tóth, F.-Csömör, S.-Mészáros, J. 83 Tömböl, T. vide Vajda, J. 339, 349 Töpelmann, I. vide Hackensellner, H. A. 359 Törő, I.-Pályi, Irén-Csapó, I.-Gazsó, L. 51

U

V

Ungváry, Gy. vide Faller, J. 317

- Vajda, J.-Tömböl, T. 339, 349
- Vanek, J. 411

Világhy, M. vide Réthelyi, M. 263

Zs

Zs. Nagy, I. vide Földes, L. – Benkő, K.– Lévai, G.– Ary-Balogh, P. 283

ACTA MORPHOLOGICA ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE

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

> redigit I. TÖRŐ

TOMUS XIII



AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST 1964

ACTA MORPH. HUNG.



Department of Pathology, István Hospital, Budapest and Fourth Department of Medicine, University Medical School, and National Institute of Cardiology, Budapest

OPENINGS OF DIFFERENT ORIGIN ON THE MITRAL VALVE

B. RADNAI, L. DÖMÖTÖR and P. KÁLMÁN

(Received March 20, 1963)

Three cases of rare lesions of the mitral valve have been described. In the first and second cases a stab-caused opening, in the third case a gap due to a congenital anomaly were located on one of the cusps. The rarity of such changes is pointed out and the possibilities of differentiating them from those of different origin are discussed in detail and the clinical significance of these phenomena is referred to.

Openings occurring on the mitral valve are unusual lesions of the heart. They may occur in consequence of inflammation, congenital malformation or trauma. Whereas the inflammatory perforation of the mitral cusp can be found every now and then, openings originating from trauma or malformation are very rare. In the following we shall present three cases; in the first and second the gap was caused by trauma and in the third by a congenital disturbance.

Case reports

Case No. 1. A 24 year old male was admitted with severe septic symptoms unconsciously; according to the history he had had high fever for 4 days. On admission the cardiac dullness was of normal size, apical lift and palpable systolic thrills could be observed and a loud scratching systolic murmur could be heard above all the orifices. Some hours after admission the patient died. Clinical diagnosis was endocarditis, septicaemia and meningitis.

At necropsy, beside several metastatic cerebral, renal and pulmonary abscesses, unexpected changes were found in the heart. In view of their uncommon shape location a former injury was suspected. As it turned out when completing the history, 6 years prior to his death the patient had stabbed a dagger into his heart; he had lost consciousness and had been transported to the surgical department of a country hospital where he was not operated upon and after 6 weeks of bed-rest was discharged. Since that time he had been working as a hair-dresser's assistant, enjoyed good health and developed symptoms of his present disease but 4-6 days prior to admission.

When examining the corpse a faint fine, radiating scar was found on the skin of the chest 7 cm medial from the left nipple and correspondingly a scar tissue of about 22 mm in diameter in the intercostal musculature. There were extensive adhesions on the pericardial surface; those above the muscular scar were singularly massive and callous. The adhesions showed no trace of bleeding blood pigment.

The heart weighed 450 g, the wall of the left ventricle was 14-16 mm, that of the right ventricle 6-8 mm thick; their musculature was hypertrophic and their cavity was wider than usual. On the anterior surface of the right ventricle, in the musculature of the conuspulmonalis a scarred area was protruding like an aneurysm (Fig. 1). Obviously this was the place where the dagger had entered the heart. Opposite, on the septal wall of the conus pulmonalis a white smooth opening 10-12 mm in diameter, lined with shiny endocardium, was detectable which had its constructed but was equally wide throughout its course. Whereas the rim of the gap in the right ventricle was smooth, the orifice in the left ventricle had a crest-

like border (Fig. 2). The right lower edge of the anterior cusp of the bicuspid valve showed the third injury, taking the form of an opening 8×13 mm in diameter. The edge of this was a scarred ring and also the neighbouring chordae tendineae showed scarry hyperplasia; the endocardium, however, was smooth and shiny. The other parts of the valve and the other chordae tendineae were intact (Fig. 3). Finally, the fourth injury was found above the posterior cusp of the bicuspid valve in the form of a rice-grain sized, clear-cut hole on the auricular wall. Below the wall the valve was scarred and above it the endocardium was covered with a friable coating 22 mm in diameter (Fig. 4). Bacteriological examination demonstrated at this site Staphylococcus pyogenes aureus in pure culture. Obviously this was the starting point of the metastatic abscesses and of the septicaemia.



Fig. 1. Case 1. Scarred portion of the frontal wall of the conus pulmonalis. Opposite to it is the scarred right ventricular orifice of the opening penetrating the septum

Case No. 2. A 35 year old male 14 years before his death had been stabbed in the ches with a knife. He had been unconscious for 4 days, then recovered and was able to continue working. 3 years prior to admission he had developed cardiac complaints, then symptoms o circulatory failure. These were thought to be due to rheumatic valvular disease, since the patient had not mentioned his previous injury. The cardiac condition could not be alleviated despite repeated hospital care, and the patient died with symptoms of heart failure.

Clinical diagnosis was: mitral stenosis, a trial fibrillation, infarction in the lower lobe of the right lung, pulmonary oedema and pneumonia.

Necropsy revealed a round scarred area 1 cm^2 in extent on the anterior thoracic wall in the left mammillary line in the fourth interspace.

The pericardial surfaces showed extensive adhesions. These were massive and calcified, the most markedly so on the posterior surface of the left atrium. The heart weighed 570 g. The ventricles were dilated. The wall of the left ventricle measured 15 mm, that of the right ventricle 6 mm. The left atrial wall showed moderate thickening. The anterior cusp of the mitral valve showed an oval opening, with sharp edges, 17×6 mm in size, on the rim of which the valve was slightly thickened (Fig. 5). On the ventricular septum, just below the atrioventricular boarder, an opening was demonstrated, narrowing gradually from the left ventricle towards the right one, measuring 8 mm in diameter in the left ventricle and 3 mm in the right one (Fig. 6). Opposite the opening the endocardium of the conus pulmonalis was thick, grayish white at an area 10 mm in diameter. All the valves except the mitral were normal. There was congestion in the organs and croupous pneumonia in the lower and middle lobes of the right lung. The cardial lesion was clearly the consequence of the stab suffered 14 years before.



Fig. 2. Case 1. On the left, in the left ventricular cavity the crest-like margined left ventricular ostium of the septal gap is seen, on the right the lower surface of the anterior cusp of the bicuspid valve. The edge of the cuspidal opening is scarred



Fig. 3. Case 1. Gap visible on the anterior cusp of the bicuspid valve. The margin shows scarred thickening, the neighbouring chordae tendineae are bulky

Case No. 3. A female patient 27 years of age. She had not known of any disease, including rheumatic fever until at the age of 24 years she had been treated for pulmonary tuberculosis; it was then that her heart disease had been discovered but she had been free of cardiac complaints. At the age of 25 she had a child; from this time dyspnoea and irregular heart beat were manifested on exertion. Two weeks prior to admission dyspnoea increased, her legs and abdomen were swollen. One week thereafter orthopnoea and coughing were observed. Since the complaints appeared she lost about 20 kg weight. Physical examination revealed a moderately developed, thin woman, with yellowish skin and sclerae, marked oedema of the legs and sacrum, pronounced cyanosis of the face and lips. Above the pulmonary bases moist rales were heard and above both lungs there were diffuse wheezes beside a normal percussion sound. The apex beat was in the left anterior axillary line. The right border of the heart exceeded the right sternal margin by one finger. A throbbing first sound, holosystolic murmur, opening snap and diastolic murmur could be heard above the apex. The systolic murmur was of equal



Fig. 4. Case 1. On the left, perforated bicuspid valve. On the right, fresh endocardial incrustation, below it a tiny opening and scarring of the cusp

intensity during inspiration and expiration. Heart frequency was 84/min, arrhythmic. The liver reached four fingers below the costal arc, was somewhat tender and showed systolic pulsation. The cervical veins filled when pressure was applied on the liver. The spleen was not palpable. There was no change in the nervous system. X-rays of the chest showed a fixed right, a low left diaphragm. The upper lobe of the right lung showed fibrosis and several focal shadows. The hilar vessels demonstrated a significant centroperipheral and apicobasal discrepancy in diameter with expansive hilar pulsation. The heart showed a tricuspidal configuration and a fingerwidth enlargement in both directions, the cavities were dilated.

On the basis of the findings combined mitral failure and a probably functional tricuspid insufficiency were assumed. On strophanthin and diuretics the state improved and the patient became able to walk. On the 9th day of treatment she suddenly died.

At necropsy the heart weighed 600 g, the wall of the left ventricle was 17 mm. That of the right, 8 mm. The cardiac cavities were wide, the papillary muscles and trabecules bulky; the myocardium was pale yellowish-red, flabby and brittle. The posterior cusp of the bicuspid valve was intact; the anterior cusp of the bicuspid valve was also membranaceous but in its middle a round opening 18 mm in diameter with a peasized massive vegetation on the edge facing the chordae tendineae (Fig. 7). The chordae tendineae were intact. Below the origin of the aorta there was an about 7 cm long chorda tendinea adhering to the ventricular septum (Fig. 8); this chorda started from the papillary muscles at the corner of the ventricular septum



Fig. 5. Case 2. The mitral valve from the left atrium. An oval sharply edged opening is seen on the anterior cusp



Fig. 6. Case 2. The left ventricular opening of the canal is seen in the ventricular septum below the aortic orifice



Fig. 7. Case 3. On the anterior cusp of the bicuspid valve a regular, distinct-margined round opening, with a polyp-like formation on its lower margin



Fig. 8. Case 3. The abnormal chordae tendineae of the lower surface of the bicuspid valve Acta morph. tomus XIII.

and the posterior wall. The endocardium of the left auricle was thickened corresponding to the edge of the auricle and its surface was uneven.

The circumference of the aorta was 6 cm at the origin, 4.4 cm above the diaphragm and 2 cm at the aortic bifurcation.

There were extensive pleural adhesions, 4-5 mm thick above the costal surface of the inferior lobe; flat cavity filled with yellowish-greenish cheesy material was detectable within that. In the right upper lobe, infraclavicularly, below the pleura several pea- or cherry-stone sized yellowish friable nodules were detectable. Signs of chronic oedema were present in the other organs.

Epicritically, the opening located on the anterior cusp of the mitral valve was considered a congenital anomaly causing the insufficiency of the orifice. The pulmonary tuberculosis, the organizing empyema and the pleural adhesions increased the work of the right ventricle finally led to right heart failure and death. The auscultatory signs referring to mitral stenosis were caused by the relative narrowness of the normal-sized orifice against the increased flow due to the regurgitation.

Discussion

Based on the data in the literature [4] and our own studies, in the aetiology of the above described changes, three factors may be taken into consideration, *viz.* endocarditis, trauma and congenital anomaly.

(i) Perforation of the cusp of the bicuspid valve may occur in consequence of endocarditis. Differentiating these openings from gaps of any other origin is usually easy, because other signs of endocarditis are also present.

In our first and second case, rheumatic aetiology could be excluded since a scar was visible next to the opening but elsewhere there was no trace of either thickening of the cusps nor of adhesion or of shortening. In the third case the inflammatory aetiology could be excluded with certainty in the lack of signs of endocarditis.

(ii) Perforating injuries of the heart are not rare [4, 13] but only two cases of openings originating from stab wounds of the mitral valve have been reported. LAUCHE, in a 26 year old man found at necropsy on the anterior cusp of the tricuspid valve a regular round opening which was first considered a congenital anomaly but then it turned out that the patient had been stabbed in the chest. In contrast to our own cases, in LAUCHE's one, apart from the pleural adhesions, every other sign referring to injury or to any chronic change of the endocardium was absent.

The second similar case is that of ADAM, who at necropsy found a defect measuring 1.8×1.5 mm on the mitral cusp 10 years after a shot into the heart.

Death from stab wounds of the heart is generally caused by exsanguination or cardiac tamponade. According to SCHMITT and GARTEN the danger is greater with lesions of the right ventricle, where the thin musculature is not able to close the gap by contraction. It may be assumed that in our cases the small wounds as well as the low blood pressure following the collapse made it possible that the wound closed spontaneously.

Our cases prove that in spite of a multiple wound perforating the heart, spontaneous healing and later satisfactory function for years is possible.

(iii) The isolated congenital anomalies of the mitral valve and of the left venous orifice are rarities. Atresia of the orifice and aplasia or hypoplasia of the valve may occur. In connection with our second case the possibility of either of two congenital anomalies may be raised: a) duplication of the orifice and b) cleft cusp.

a) Duplication of the mitral orifice was first observed by GRIENFIELD at the autopsy of a 29 year old man who died of myelitis. Such cases were later described by COHN, CAMISA, HARTMANN, RUPSAMEN, and KELLOGG, SCHRAFT and LISA. Its recognition at necropsy is easy since the chordae tendineae starting from the edge of the orifice are characteristic. In our third case no such chordae tendineae were found at the margin of the gap, the alteration therefore did not correspond to the duplication of the mitral orifice.

b) The clefts of the mitral orifice are in most cases associated with other congenital anomalies, thus with ostium atrioventriculare commune persistens, but sometimes they may occur isolated as well. In our case the cusp demonstrated a regular, round gap that did not reach to the margin of the valve, thus excluding the possibility of a cleft cusp.

A few cases resembling our own observations were found in the literature. The first observation of this kind was made by GUTZEIT who found a combined congenital anomaly of the heart in a young woman, who had died three days after delivery. Beside the defect located on the membranaceous part of the ventricular septum he found an oval opening on the medial cusp of the tricuspid valve, which lay opposite the septal defect. The case described by FOURNIER, LEGRAND, GARRE and CASTIGLIONI is much more convincing; in a 30 year old man died of circulatory failure they found a buttonhole sized gap on the anterior cusp of the mitral valve, which was situated perpendicular with its longitudinal axis to the basis of the valve. Changes referring to acute or chronic endocarditis were not present on either the bicuspid or the other valves. The associated craniofacial atrophy, the defective development of the hair, the hypoplasia of the penis and of the testicles were also considered to be proofs of a congenital anomaly. PACHALY and SCHULTZ found similar openings on the atrioventricular valves in the cadavers of two adults.

In our third case there was no sign of chronic endocarditis on the mitral or on the other valves. No injury was mentioned in the history and at necropsy was found that might have referred to trauma. Therefore the opening on the anterior cusp was considered a rare, isolated congenital anomaly that localized on the mitral valve.

The openings on the mitral valve described here show several similarities in spite of their different aetiology; not only their morphological appearance is alike but also their clinical course. In each case, symptoms of mitral insufficiency were present but the exact nature of the valvular change could not be determined clinically.

REFERENCES

ADAM, F.: (1927) Über die traumatischen Veränderungen gesunder Klappen des Herzens. Z. Kreisl.-Forsch. 19, 313. - 2. CAMISA, G.: (1912) Zwei neue Fälle von ostium atrioventriculare sinistrum duplex. Zbl. allg. Path. 23, 1027. — Сонн, J.: (1879) Ueber doppelte Atriovenricularostien. Zbl. allg. Path. 8, 825. - 4. DERRA, E., (1959) In Handbuch der Thoraxchirurgie, ed Springer, Berlin, 2, 834, 845. - 5. FOURNIER, J. C. M., LEGRAND, E. F., GARRA, A., CASTIGLIONI, J. C.: (1927) Insuffisance mitrale due l'existence d'un foramen congénital de la valve interne de la valvule mitrale. Bull. Acad. Méd. (Paris) 97, 491. - 6. GREENFIELD: cit. GOULD (7). - 7. GOULD, S. E.: (1953) In Pathology of the Heart. Ed. Thomas, Springfield. 391. - 8. GUTZEIT, K.: (1922) Ein Beitrag zur Frage der Herzmissbildungen an Hand eines Falles von kongenitaler Defektbildung im häutigen Ventrikelseptum und von gleichzeitigem Defekt in dem diesem Septumdefekt anliegenden Klappenzipfel der Valvula tricuspidalis. Virchows Arch. path. Anat. 237, 355. - 9. HARTMANN, B.: (1937) Zur Lehre der Verdoppelung des linken Atrio-ventricularostiums. Arch. Kreisl.-Forsch. 1, 286. - 10. LAUCHE, A.: (1923) Eine traumatische Fensterung des vorderen Tricuspidalsegels nebst Bemerkungen zur Histologie der gefensterten Semilunarklappen. Virchows Arch. path. Anat. 241, 16. - 11. PACHALY, L., SCHULTZ, H.: (1962) Zur formalen Genese der angeborenen Lückenbildungen der Atrioventricularklappen des Herzens. Frankfurt. Z. Path. 71, 531.-12. RUPSAMEN, D., KELLOGG, F. (1951) Duplication of the Mitral Valve. Arch. Path. 51, 658.-13. SCHMITT, W., GARTEN, J.: (1959) Scharfe Herzverletzungen. In SCHMITT, W., KUDÁSZ, J.: Wiederherstellungschirurgie an Herz und Herzbeutel, Springer, Berlin. Page 86.-14. SCHMITT, W., KUDÁSZ. J.: (1959) Wiederherstellungschirurgie an Herz und Herzbeutel, Springer, Berlin. - 15. SCHRAFT, W. C., LISA, J.: (1950) Duplication of the Mitral Valve. Case Report and Review of the Literature. Amer. Heart J. 39, 136. - 16. Somogyi, E.: (1958) Szívszúrások sebészeti vonatkozásai az igazságügyi orvosszakértői gyakorlatban. Magy. Sebész. 86. – 17. WIMSATT, W. A., LEWIS, F. T.: (1948) Duplication of the Mitral Valve and a Rare Apical Interventricular Foramen in the Heart of a Yak Calf. Amer. J. Ant. 83, 67.

MITRALFEHLER VERSCHIEDENEN URSPRUNGS

B. RADNAI, L. DÖMÖTÖR und P. KÁLMÁN

Drei seltene Mitralfehler werden beschrieben. Im ersten und zweiten Fall wurden auf einem der Klappenzipfel durch Traumen hervorgerufene Öffnungen, im dritten eine durch angeborene Anomalie bedingte Spalte festgestellt. Verfasser unterstreichen das seltene Vorkommen dieser Veränderungen und behandeln eingehend die Möglichkeiten ihrer Differenzierung von Veränderungen anderen Unsprungs. Auch auf die klinische Bedeutung dieser Fehler wird hingewiesen.

ОТВЕРСТИЯ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА МИТРАЛЬНОМ КЛАПАНЕ

В. РАДНАИ, Л. ДЁМЁТЁР и П. КАЛМАН

Дается описание трех случаев редко наблюдаемых повреждений митрального клапана. В первом и втором случаях на одном из заслонок клапанов были обнаружены отверстия, вызванные травмой, в третьем случае — щель, вызванная врожденной аномалией. Авторы подчеркивают, что эти изменения весьма редко встречаются, подробно обсуждают возможности их дифференциации от изменений другого происхождения и указывают также на их клиническое значение.

В.	RADNAI:)					
L.	Dömötör:	Budapest	IX.	Nagyvárad	tér	1.	Hungary
Ρ.	Kálmán:						



Institute of Pathology (Director: Prof. P. ENDES), University Medical School, Debrecen

BEHAVIOUR OF JUXTAGLOMERULAR GRANULATED CELLS IN THE AUTOTRANSPLANTED AND HOMO-TRANSPLANTED RENAL TISSUE OF WEANLING AND FOETAL RATS

I. DÉVÉNYI, P. ENDES and Sz. GOMBA

(Received April 20, 1963)

Granulated cells of the juxtaglomerular apparatus have been found to develop and multiply in autoplastic and homoplastic subcutaneous transplants taken from the kidney of infantile and foetal rats. Since the kidneys contain no, resp. hardly any granulated cells at that age, it is safe to assume that differentiation is predetermined *in utero* and takes then place even in transplanted renal tissue. Heterotopic growth, inflammation and fibrosis render the transplant incapable of functioning normally, and it is thus improbable that the normal structure and function of the renal parenchyma are necessary for the development of granulated cells. It is suggested that the appearance and multiplication of granulated cells are caused by the reduced flow of blood and the consequent decrease of blood pressure in the transplants.

It has been found [6] that, if the renal tissue of adult rats is autologously transplanted to the subcutis, the juxtaglomerular granulated cells (JGC) reappear after a transient regression and are especially numerous and richly granulated in 30 to 90 days old grafts. Considering that there are no JGC in the kidney of rat foetuses, and only a very few poorly granulated such cells in that of weanling rats [3], it has been studied whether JGC would develop if undifferentiated renal tissue was transplanted.

Material and method

Albino rats were used in the experiments. The first experimental group consisted of 14 twelve-days-old rats. After exposing their left kidney from the paravertebral approach, 2 samples, measuring 3 by 3 by 1 1/2 mm each, were excised from the surface of the cortical convexity and, independently of one another, transferred into the scapular subcutis. One animal died on the first postoperative day, 7 were sacrificed on the 30th and 6 on the 60th day, at the ages of 42 and 72 days, respectively. Transplants and kidneys were fixed in neutral formalin.

The second group consisted of rat foetuses removed on the 17th day of pregnancy. Half of their kidney was transplanted into the subcutis of 18 adult rats of both sexes. The host animals received, during 2 weeks following the operation, a total of 15 mg cortisone (Adreson-Organon) divided into 6 doses of 2.5 mg each. It was known from previous experiments [4] that a dose of this size sufficed for a complete morphological and functional adaptation of homologously transplanted rat thyroids. Half of the animals were killed on the 30th, the other half on the 60th days. Transplants and kidneys were fixed in neutral formalin.

The transplants were sectioned serially, and every fifth section was stained with combined trichrome [5].

Results

Group I. Progressive necrosis followed by intensive scarring was found in the transplants. Nothing but scar tissue, i. e. no renal tissue, remained in 6 cases. The transplant could not be found in 2 cases. The histological structure of the surviving transplants, that of the glomeruli in particular, showed hardly any differentiation and presented a picture characteristic of newborn animals (Fig. 1). Only 3 transplants contained a few moderately granulated juxtaglomerular cells.



Fig. 1. Lower magnification of renal autograft in 72 days old rat, 60 days after the operation. Note scar tissue surrounded by connective-tissue capsule; atrophied and distended tubules; few intact peripheral glomeruli. Combined trichrome stain

Group II. Both the 30 and the 60 days old transplants exhibited the signs of grave inflammation, presumably an immune-reaction. Apart from lymphocytes there were numerous eosinophils in the younger transplants, while — together with diffuse lymphocytic infiltration — progressive scarring was observed in the 60 day old grafts. The renal elements were well recognizable in spite of intensive inflammation. Minute cysts, developed from fragments of calyces, further atrophied tubules lined with undifferentiated epithelium, and glomeruli of foetal character were conspicuous. Six 30 days old and a greater number of 60 days old transplants contained JGC. These cells were situated in the walls of the preglomerular arterioles and partly in those of the wider prearterioles that are independent of the glomeruli (Figs. 2, 3). Not less than

20 granulated cells were observed along the wall of an arteriole in the plane of the section.

The JGC index was determined in the kidneys of the host animals in both groups. It revealed no interconnection with the number of granulated cells in the transplants.



Fig. 2. Homotransplanted fragment of foetal rat kidney in 60 days old host animal. Longitudinal section of an arteriole in a gravely inflamed milieu. Arrows point to granulated cells. \times 600. Combined trichrome stain



Fig. 3. Homotransplanted fragment of foetal rat kidney in 60 days old host animal. Note numerous richly granulated cells in transversely sectioned inflamed arteriolar wall. \times 600. Combined trichrome stain

Discussion

While there are numerous reports on the transplantation of the kidney as a whole, data regarding the transfer of renal tissue are scarce. MUIRHEAD et al. [8] placed minced, ARDAILLOU et al. [1] homogenized renal tissue in the peritoneal cavity. The survival of the transplants was short-termed in both cases; the last-named authors found no identifiable renal tissue after the 23rd day. The present subcutaneous autoplastic grafts were more successful since, notwithstanding progressive fibrosis, there were vascularized glomeruli even in 60 day old transplants. Although an intensive inflammatory immune reaction followed the homotransplantation of foetal tissue, elements of

renal structure were recognizable and even were encountered in both the 30 and the 60 day old transplants. This form of reaction to homoplastic transplantation, known as chronic homograft reaction in the literature [2], was due in the present case to inadequate cortisone dosage.

In contradistinction to the autoplastic transplantation of renal tissue of adult animals [6], the autotransplants of weanling rats contained but a few granulated cells, and even those in a few instances only. The first interpretation of this phenomenon was that, since the kidneys themselves had contained hardly any JGC at the time of transplantation, the transferred tissue failed to differentiate subsequently. Considering, however, that the transplanted foetal kidney fragment presented a very different picture, it must be admitted that the small number of JGC in Group I may have been due to inadequate experimental conditions caused by the fact that only a minute cortical portion of 12 days old animals was suitable for being transplanted.

The transplanted renal tissue of infantile and foetal rats showed no further development, except for the granulated cells.

According to earlier observations [3], there are no JGC in the kidney of foetal and newborn rats; they appear with a frequency of about 1 to 2 per cent two weeks after birth and reach the adult index after some 60 days. Notwithstanding the fact that the renal tissue contained no or hardly any JGC at the time of operation, that it failed to differentiate and was evidently incapable of normal function, granulated cells were found in the transplants, especially in the foetal grafts. The walls of the renal arterioles must, therefore, possess already *in utero* the potential capacity of a later differentiation into granulated cells, so that the predetermined differentiation ensues even under the abnormal conditions of transplantation.

No innervation was observed in the grafts. McMANUS [7] suggests that urinary components passing through the macula densa of the distal convoluted tubules contribute to the evolvement of the granules. The transplants contained no macula densa in the present experiments, and it is evident from the histological picture that they were incapable of normal function. Since no relationship was found between the respective JGC contents of the kidney of the host animals and the transplants, the possibility of humoral and hormonal factors being involved in the development of granulated cells would seem to be excluded.

The transplants remained in circulatory connection with the host organism since they could not have survived otherwise. The multiplication and copious granulation of JGC in the transplants (especially in the foetal ones) is, in the main, due to the low blood pressure, a phenomenon pointed out by TOBIAN *et al.* [9]. It is, of course, still possible that the structure and activity of JGC in topographically and functionally normal kidneys is influenced also by other (in the first place by humoral and hormonal) factors.

REFERENCES

1. ARDAILLOU, R., DE MONTERA, H., MICHIELSEN, P., ALTMAN, J.: (1960) Aspects histologiques de l'autogreffe rénale dans le péritoine chez le rat. Rev. franç. Étud. clin. biol. 5. 697. - 2. BILLINGHAM, R. E., BRENT, L., MEDAWAR, P. B.: (1955) Acquired Tolerance of Skin Homografts. Ann. N. Y. Acad. Sci. 59, 409. -3. DAUDA, GY., ENDES, P.: (1963) On the Ontogenesis of the Granulated Cells of the Juxtaglomerular Apparatus in the Rat. Acta morph. Acad. Sci. hung, 12, 51. - 4. DÉVÉNYI, I., CZENKÁR, B., ENDES, P.: (1958) Homotransplantation of Adult Bat Thyroid and Parathyroid with Simultaneous Cortisone Treatment. Acta morph, Acad. Sci, hung, 8, 39. - 5. ENDES P.: (1954) Kombinált trichrom festés. Kisérl. Orvostud. 6. 479. — 6. ENDES, P., DÉVÉNYI I., GOMBA, Sz.: (1963) Das Verhalten der granulierten Zellen des juxtaglomerulären Apparatus im transplantierten Nierengewebe. Virchow's Arch. path. Anat. 336, 485. -7. McMANUS, J. F. A .: (1947) Further Observations on the Glomerular Root of the Vertebrate Kidney, Quart. J. micr. Sci. 88, 39. - 8. MUIRHEAD, E. E., STIRMAN, J. A., JONES. F.: (1960) Renal Autoexplantation and Protection Against Renoprival Hypertensive Cardiovascular Disease and Hemolysis. J. clin. Invest. 39, 266. - 9. TOBIAN, L., TOM-BULIAN, A., JANACEK, J.: (1959) The Effect of High Pressures on the Granulation of Juxtaglomerular Cells in an Isolated Kidney. J. clin. Invest. 38, 605.

DAS VERHALTEN DER GRANULIERTEN ZELLEN DES JUXTAGLOMERULÄREN APPARATES IM AUTO- UND HOMOTRANSPLANTIERTEN NIERENGEWEBE VON NEUGEBORENEN RATTEN UND RATTENFÖTUSSEN

I. DÉVÉNYI, P. ENDES und SZ. GOMBA

Die granulierten Zellen des in das Unterhautzellgewebe auto- und homoiotransplantierten Nierengewebes von neugeborenen Ratten und Rattenfötussen differenzieren sich und zeigen im letzteren Fall sogar eine erhebliche Vermehrung. Da in diesem Alter die Nieren keine oder nur sehr wenig granulierte Zellen enthalten, ist es wahrscheinlich, daß die Fähigkeit zu einer Differenzierung in dieser Richtung bereits im fötalen Leben determiniert ist, und daß sie si er im Laufe des weiteren Lebens auch im transplantierten Nierengewebe realisiert. Da infolge der heterotopen Lokalisation sowie der entzündlichen und fibrösen Veränderungen das transplantierte Nierengewebe keine normale Funktion auszuüben vermochte, ist es nicht wahrscheinlich, daß zur Entstehung der granulierten Zellen die normale Struktur und Funktion des Nierenparenchyms erforderlich ist. Verfasser sind der Meinung, daß das Erscheinen der granulierten Zellen sowie auch ihre Vermehrung der verminderten Durchblutung und dem niedrigeren Blutdruck in den Transplantaten zugeschrieben werden kann.

ПОВЕДЕНИЕ ГРАНУЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК ЮКСТАГЛОМЕРУЛЯРНОГО АППАРАТА В АВТО- И ГОМОТРАНСПЛАНТИРОВАННОЙ ПОЧЕЧНОЙ ТКАНИ У ПОДСОСНЫХ КРЫС И У ПЛОДОВ КРЫС

И. ДЕВЕНЬИ, П. ЭНДЕШ И С. ГОМБА

В авто- и гомотрансплантированной в подкожицу почечной ткани подсосных крыс и плодов крыс происходит дифференциация гранулированных клеток юкстагломерулярного аппарата, которые у плодов показывают даже значительное размножение. Ввиду того, что в этом возрасте почки еще не содержат (или почти не содержат) гранулированных клеток, можно полагать, что способность к дифференциации такого направления детерминирована уже во внутриутробной жизни, и что эта способность реализируется даже в пересаженных почечных тканях. Так как вследствие гетероротропного положения, воспалительных и волокнистых изменений пересаженная почечная ткань не могла нормально функционировать, не является вероятным, что для возникновения гранулированных клеток необходимы нормальная структура и функция почечной паренхимы. По мнению авторов появление гранулированных клеток и их размножение обуславливаются снижением кровоснабжения и более низким кровяным давлением, наблюдаемыми

Dr. I. DÉVÉNYI: Prof. Dr. P. ENDES: Dr. Sz. GOMBA:

Acta morph. tomus XIII.

17

2



Institute of Pathology (Director: Prof. P. ENDES), University Medical School, Debrecen STUDIES OF THE GRANULATED CELLS OF THE JUXTAGLOMERULAR APPARATUS. III

EFFECT OF FIXATIVES AND FREEZING ON THE GRANULES

SZ. GOMBA, MARGIT B. SOLTÉSZ and P. ENDES

(Received June 17, 1963)

The reaction to different fixatives and to freezing of the granulated cells in the juxtaglomerular apparatus of mice has been studied. The granules disintegrated when alcohol or acetone was used as a fixing agent. The granules disintegrated in unfixed preparations cooled below -10° C. This phenomenon was independent of the rate of cooling and of any further fall of temperature. Since no lipides could be demonstrated, the observed phenomena were not caused by fatty substances contained in the granules. The granules did not stain in preparations treated with distilled water, but were well demonstrable in sections treated with normotonic and hypertonic sucrose and physiological NaCl.

In earlier experiments [5,6] it was found that certain histological or histochemical procedures caused the granules to diminish in or disappear from the cells of the juxtaglomerular apparatus (JGC) in the mouse. Such granules were never observed in unfixed frozen sections nor in preparations fixed in alcohol. Results were similar after the treatment of unfixed sections with histochemical agents, although the granules were visible under the phase contrast microscope. The present investigation was undertaken to examine sections prepared by different methods and to study the chemical properties of the granules.

Material and method

The kidneys of white mice were used. The first group of experiments had the aim to establish the best methods of fixing the granules. The following fixatives and fixing procedures were tested: 10 per cent neutral formalin, trichloroacetic acid, sulphosalicylic acid, osmic acid, Schaffer's method, Ciaccio's method, Champy's fixing fluid, phosphotungstic acid, acetone, Carnoy's fluid, glacial acetic acid-sublimate, Bouin's fluid, ethyl alcohol and methyl alcohol. The sections were stained with Endes' trichrome, Schiff's periodic acid, mercuric bromophenol blue, Adams'dimethyl-aminobenzaldehyde nitrite, and tetrazolium. In order to find out whether unstained granules were visible, a number of sections were inspected under the phase contrast microscope. Only after applying the more important fixing procedures did we test all of the said staining methods. The results are shown in Table I.

Only ethyl-alcohol and the fixing fluids containing acetone were capable of extracting the granules, while only their staining properties were changed by the other fixatives. Staining was most satisfactory after fixation in 10 per cent formalin.

In the later course of the investigation, the sections were kept at different temperatures, then fixed, embedded and stained for JGC. The sections were placed in a moist chamber if the desired temperature was above 0° C. Temperatures below zero were reached by means of various freezing mixtures. Sections, about 1 to 2 mm thick, were frozen in copper vessels of about 1 ml capacity, and sections 0.5 to 1 mm thick were thrown into liquid air. Results are shown in Table II.

Та	ble	I
		_

	D y e s							
Method of fixation	Trichrome	Phase contrast microscopy	Schiff's periodic acid	Mercuric bromo- phenol blue	Tetrazolium	Dimethyl- amino- benzalde- hyde nitrite		
10 per cent formalin	+	+	+	+	+	+		
Ethyl alcohol			_	_				
Acetone			_		-	_		
Carnoy's fluid	_			_				
Ciaccio's method	+	+	+	+	+			
Glacial acetic acid- mercuric chloride		+		_	_	+		
Trichloroacetic acid	+	+						
Sulphosalicylic acid	+	+						
Osmic acid	-	+						
Schaffer's method	+	+						
Phosphotungstic acid		+						
Bouin's fluid		+						
Champy's method		+						
Methyl alcohol	+	+						

Table II

(Trichrome stain)

$+80^\circ$ C, 6 hrs	+
$+37^{\circ}$ C, 46 hrs	
Room temp., 48 hrs	+
0° C, 3 hrs	+
—5° C, 3 hrs	+
-10° C, 3 hrs	
Freezing with carbon-dioxide snow (-79° C), 5' to $10'$	
Liquid air (-190° C), 2' to 2 hrs	

Rat and hog kidneys were also frozen by means of carbon-dioxide snow; the results were the same as those obtained with mouse kidneys. On the other hand, the zymogen granules of the pancreatic cells and the granules of the mast cells remained demonstrable even after freezing with carbon dioxide, fixation and embedding. The mitochondria of similarly treated kidneys remained likewise demonstrable. JGC-granules in sections stained with NOVELLI's [17] mitochondrium stain showed intensive (but not mitochondrium-like) fuchsinophilia, whereas granules failed to stain in unfixed and unfrozen microtome sections stained with Janus green.

Glycerol, owing to its hygroscopic property, protects living cells against the destructive action of freezing [23]. Sections 0.5 mm thick were placed in pure glycerol for 3 hours, then frozen with carbon-dioxide snow, fixed and embedded. Freezing caused the granules to disappear.

In consideration of the lipoprotein nature of some tissues sensitive to freezing, the preliminary examination of lipides was supplemented by staining with Oil Red O, Sudan Black B and osmium tetroxide. The preparations were also examined in polarized light, and after applying Berg's coffeine benzpyrene fluorescent method, the sections were fixed with Ciaccio's technique, in Baker's calcium formol and cobalt-calcium-formol. Postchromated blocks were also made in the last two cases. The granules failed to stain with any of these procedures.

In the last group of experiments, unfixed 0.5 mm thick sections, as also as thin sections as could be made with the free hand were kept in distilled water for 3 hours and in physiological saline, further in 0.1, 0.25, 0.88 and 1.5 M sucrose for 5 hours; the sections were then fixed in formalin and embedded. In distilled water, the granules disintegrated, the tubular epithelium and the JG-cells swelled up and became vacuolated. They gave a negative reaction with trichrome, while the reaction became positive after treatment with the other solutions.

Discussion

The JGC-granules are extracted if ethyl-alcohol, Carnoy's fluid or acetone are used for fixation. HARADA [7] observed the same phenomenon and attributed it to the presence of ketosteroids in view of the fuchsinophilia of the granules. Apart from the fact that fuchsinophilia is no longer regarded as being characteristic of ketosteroids, our observations failed to support HARADA's suggestion. Besides, fixation in alcohol (like Keilig's extraction) may extract not only lipides but also proteins. As can be seen in Table I, the granules did not disappear after treatment with methyl alcohol, although this is known to dissolve lipids. It is more difficult to reconcile the negative result of our histochemical tests for lipides with the claim of McMANUS [15] that the granules stain with Sudan Black B. We have failed to observe such a reaction.

JG-cells are destroyed by low temperatures. The granules disappear if the fresh kidney is cooled below -10° C, and only a filamentous-flocculent structure with numerous optically blank areas remains in the cytoplasm (Figs. 1,2). The rate of cooling is irrelevant. Whether immersion in liquid air ensures a sufficiently rapid rate cooling is uncertain. BAKER [19] applied this method successfully to freeze-dried material which shows that a sufficient degree of intracytoplasmic crystallization can be reached with the procedure in question. Technical difficulties prevented us from investigating this problem. The disintegration of granules which leads to their dissolution in water presumably occurs at heating. This seems to be confirmed by the result of EDELMAN and HARTROFT [3]. They embedded their material in freeze-dried condition; it was

then heated in a "fixed" anhydrous state, and the granules were demonstrated by means of fluorescein-labelled antirenin. HESS and PEARSE examined the JGC in cryostat sections, but their report [12] contains no reference to granules.

Changes in the morphology of the JGC due to freezing raise an interesting problem in connection with renin extraction. HAAS *et al.* [8,9] elaborated a



Fig. 1. Longitudinal section of juxtaglomerular apparatus of mouse kidney. Note richly granulated JG-cells. Fixed in methyl-alcohol. – Endes' trichrome $\times 400$



Fig. 2. Longitudinal section of mouse kidney. Note vacuolated JG-cells with flocculent, foamy cytoplasm in the wall of the afferent arteriole. No granules visible. Block frozen in native state with carbon-dioxide snow, fixed in formol, embedded in paraffin. – Endes' trichrome $\times 400$

method for the extraction of renin from the hog kidney. The kidneys are repeatedly frozen and thawed, a procedure which augments the amount of extractable renin to 17 times the original. This effect was subsequently successfully demonstrated on human material [10]. Observations made on the juxtaglomerular apparatus of frozen mouse kidneys point to the existence of an interrelation between renin content and the JGC-granules.

The present investigations have failed to reveal new data concerning the chemical composition of the granules. LOVELOCK [14] found the lipoproteins

of the red cell membrane to be sensitive to low temperatures. In consideration of our negative histochemical results in respect of lipides, this finding cannot be utilized for our purposes and, moreover, freezing is known to destroy protein substances.

Considering the disintegration of the granules, the results yielded by the histochemical analysis of JG-cells in cryostat or cold knife-sections have to be accepted with reservation. The juxtaglomerular apparatus of rats, hogs and humans is recognized on the evidence of the granules they contain, so that it is impossible to locate it reliably in fresh frozen sections. It should further be remembered, that the granules are dissolved by fixatives which contain alcohol or acetone. It would follow from the results of the present investigations that the granules are not water-soluble even in a native state. The phenomena observed in distilled water were obviously due to osmotic factors; the granules behaved in this respect like mitochondria.

REFERENCES

1. BELL, L. G. E .: (1952) The Application of Freezing and Drying Techniques in Cytology. Int. Rev. Cytol. I, 35. - 2. BERG, N. O.: (1951) A Histological Study of Masked Lipids. Acta path. microbiol. scand. Suppl. 90. 1. - 3. EDELMAN, R., HARTROFT, P. M.: (1961) Localization of Renin in Juxtaglomerular Cells of Rabbit and Dog through the Use of the Fluorescent-Antibody Technique. Circulation Res. 9, 1069. — 4. ENDES P.: (1954) Kombinált trichrom festés. Kísérl. Orvostud. 6, 479. — 5. GOMBA, Sz., B. SOLTÉSZ, M., ENDES, P.: (1962) Studies of the Granulated Cells of the Juxtaglomerular Apparatus. Acta morph. Acad. Sci. hung. 11, 189. - 6. GOMBA, Sz., B. SOLTÉSZ, M., ENDES, P.: (1963) Studies of the Granulated Cells of the Juxtaglomerular Apparatus. II. Acta morph. Acad. Sci. hung. 12, 239. - 7. HARADA, K.: (1954) Histochemical Studies of the Juxtaglomerular Apparatus. Rev. belge Path. 23, 311. -8. HAAS, E., LAMFROM, H., GOLDBLATT, H.: (1953) Isolation and Purification of Hog Renin. Arch. Biochem. Biophys. 42, 368. - 9. HAAS, E., LAMFROM, H., GOLDBLATT, H.: (1954) A Simple Method for the Extraction and Partial Purification of Renin. Arch. Biochem. Biophys. 48, 256. - 10. HAAS, E., GOLDBLATT, H.: (1959) Renin Content of Kidneys in Experimental and Human Essential Hypertension. Amer. J. Physiol. 197, 1103. - 11. HEARD, B. E .: (1955) The Histological Appearance of Some Normal Tissues at Low Temperatures. Brit. J. Surg. 42, 430. - 12. HESS, R. PEARSE, A. G. E.: (1961) Mithochondrial a-Glycerophosphate Dehydrogenase Activity of Juxtaglomerular Cells in Experimental Hypertension and Adrenal Insufficiency. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 106, 859. - 13. KISZELY GY., BARKA T.: (1958) Gyakorlati mikrotechnika és hisztokémia. Medicina, Budapest. — 14. LoveLock, J. E.: (1954) Phys-ical Instability and Thermal Shock in Red Cells. (Lond.) Nature, **173**, 659. — 15. McManus, J. F. A.: (1947) Further Observations on the Glomerular Root of the Vertebrate Kidney. Quart. J. micr. Sci. 88, 39. - 16. MERYMAN, H. T.: (1956) Mechanics of Freezing in Living Cells and Tissues. Science 124, 515. - 17. NOVELLI, A.: (1962) A Short Method for Chondriome. J. Histochem. Cytochem. 10, 102. — 18. РЕАКSE, А. G. E.: (1960) Histochemistry, Theoretical and Applied. Churchill, London. — 19. РЕАКSE, D. C., ВАКЕК, R. F.: (1949) The Fine Structure of Mammalian Skeletal Muscle. Amer. J. Anat. 84, 175. – 20. Pósalaky Z.: (1960) Mélyhűtés alkalmazása a histochemiában. Biol. Közl. 8, 179. – 21. STEPHENSON, J. L.: (1956) Ice Crystal Growth During the Rapid Freezing of Tissues. J. Biophys. Biochem. Cytol. 2, Suppl. 45. – 22. Т. А. Самыгин, Н. М. Матвеева: (1961) Сравнительная устойчивость клеток к замораживанию, высушиванию, плазмолизу и изменение ее при закаливании. Физ ол. Растений. 8, 482. - 23. TAKANO, K., YAMADA, M. A., HIROKAWA, Y.: (1961) Long Term Frozen Storage of Mammalian Cell Lines. Jap. J. Med. Sci. biol. 14, 173. - 24. WEISS, L., ARMSTRONG, J. A.: (1960) Structural Changes in Mammalian Cells Associated with Cooling to-79° C. J. Biophys. Biochem. 7, 673. - 25. ZINSSER, A. D., ZINSSER, H. H.: (1951) Fuchsinophilia in the Adrenal Cortex. Arch. Path. 51, 393.

UNTERSUCHUNG DER GRANULIERTEN ZELLEN DES JUXTAGLOMERULÄREN APPARATES, III

Die Wirkung der verschiedenen Fixiermittel und der Abkühlung auf die Körnchen

SZ. GOMBA, MARGIT B. SOLTÉSZ und P. ENDES

Die Zellkörnchen des juxtaglomerulären Apparates von Mäusenieren wurden nach Anwendung von verschiedenen Fixiermitteln, ferner nach Abkühlung der Niere untersucht. Bei Fixierung in Alkohol oder Azeton werden die Körnchen aufgelöst. Bei Abkühlung unter -10° C zerfallen die Körnchen im fixierten Material, unabhängig von der Dauer und der Tiefe der Kühlung. Mit histochemischen Methoden konnten in den Körnchen keine Lipoide nachgewiesen werden; damit ist die Annahme, daß diese Erscheinungen mit dem mutmaßlichen Lipoidgehalt der Körnchen zusammenhängen, hinfällig. Nach Behandlung mit destilliertem Wasser konnten im Material keine Granuli nachgewiesen werden. In dem in normo- und hypertonischer Sucroselösung bzw. physiologischer Kochsalzlösung gehaltenen Material hingegen lassen sich die Körnchen gut färben.

ИССЛЕДОВАНИЕ ГРАНУЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК ЮКСТАГЛОМЕРУЛЯРНОГО АППАРАТА III

(Действие различных фиксирующих растворов и охлаждения на зернышки)

С. ГОМБА, М. Б. ШОЛТЕС И П. ЭНДЕШ

Исследовались клеточные зернышки юкстагломерулярного аппарата почек у мышей после применения различных фиксирующих растворов и охлаждения почек. При спиртовом или ацетоновом фиксировании зернышки растворяются. В случае охлаждения ниже — 10° С в нефиксированном материале зернышки распадают, независимо от скорости и глубины охлаждения. Гистохимическими методами исследования в зернышках не удалось выявить липоидов, и, таким образом, предположение, согласно которому эти явления связаны с содержанием липоидов в зернышках, не состоятельно. В материале, обработанном дестиллированной водой, нельзя выявить зернышек, но в материале, содержанием в нормо- и гипертоническом растворе сукрозы или в физиологическом растворе поваренной соли, они хорошо окрашиваются.

Dr Sz. Gomba: Dr Margit B. Soltész: Prof. Dr P. Endes:

Debrecen, Kórbonctani Intézet, Hungary

Institute of Anatomy, Histology and Embryology (Director: Prof. I. KROMPECHER), University Medical School, Debrecen

OSTEOGENESIS IN COSTAL CARTILAGE INDUCED BY LOCAL ADMINISTRATION OF ADRENAL EXTRACT

F. A. Kiss

(Received July 13, 1963)

After stabbing about 25 holes, each, into the costal cartilage of 10 dogs, the holes were filled with rat adrenal extract and the animals sacrificed after 5, 15, 20, 30, 40 and 160 days. Macroscopic and radiographic inspection as also histological analysis showed that capillaries had grown into the holes from the perichondrium, and that the capillaries were surrounded by a bony capsule. No such phenomenon was observed in holes that had been filled with saline or left untreated. The results show that adrenal extract is capable of inducing bone formation.

It has been found that newly growing capillaries play an important role in osteogenesis. Earlier experiments [9] showed adrenal extract to be an eminent stimulant of vascularization. The chorioallantoic vessels did not penetrate into untreated bradytrophic tissues (umbilical cord, growing cartilage), whereas an insignificant ingrowth of vessels was observed in the marginal portion of such tissues after their impregnation with a 300 γ /ml-solution of protoporphyrin. The vessels of the chorioallantois grew into umbilical cords impregnated with the saline extract of homogenized rat and dog adrenal. A similar, though less marked, phenomenon was observed in growing cartilage.

The formation and regeneration of bones have abundantly been treated in literature. KROMPECHER [11, 12] points to certain hormonal and chemical conditions, the presence of undifferentiated mesenchymal cells and capillarization as the requirements of osteogenesis. He demonstrated the existence of 28 trace elements and elements in the bone, viz. Al, Ag, Ba, C, Ca, Cd, Ce, Cl, Co, Cu, F, Fe, K, Mg, Mn, Mo, La, Na, P, Pb, S, Si, Sn, Sr, Ti, U, V and Zn.

Hormones, citric acid and porphyrin are necessary for calcium to be deposited. Vitamins, D_2 , D_3 and C in particular, are also important for the growth and regeneration of bones [6, 7, 19.] KOWALOWSKI and WIANCO [cit. 19] found that the tensile strength of the callus in rats increased under the effect of anabolic hormones. Other authors [21] observed an indirect effect of the pituitary, the thyroid and the parathyroid on the growth of bones, and attributed a similar effect to oestrogens and androgens, further to the vitamin B complex. Follis [4] succeeded in promoting the growth of tubular bones in rats by injecting cortisone acetate subcutaneously. Observations made on ossified gall bladder [8] likewise showed vascularization to be an important osteo-

genetic factor; bone was formed in the vicinity of capillaries, while in the areas lacking capillaries there was only calcification. TARSOLY [22] filled bony cavities with a mixture of eggshell and gypsum. Vascularized granulation tissue developed in the cavities, the vessels invaded the eggshell-gypsum islets, and ossification started around them.

Instances of heterotopic bone formation have repeatedly been reported. LEXER [16] described osteogenesis in connective tissue of osteoplastic origin; other authors [20] demonstrated the osteogenetic capacity of the alcoholic



Fig. 1. Injection of adrenal extract of rat into costal cartilage of dog (in vivo)

extract of urinary bladders and succeeded in inducing ossification in muscles by means of bone extract. In other experiments, performed on rabbits, formation of bone or cartilage followed the implantation of devitalized tissue into tissue other than muscle [18, 23] and also after the injection of tissue extracts [1,2].

On the basis of the above mentioned facts we have studied the vascularizing effect of adrenal extract on differentiated tissues in vivo.

Material and method

Dogs of both sexes were used. Under ether anaesthesia a parasternal incision about 10 cm long was made on the right side of the chest wall under sterile conditions. The 4th, 5th and 6th costal cartilages were exposed over a length of 3 cm, and about 20 to 30 holes were made in each cartilage by means of a dental probe. Physiological NaCl was introduced into the holes of the 4th costal cartilage and adrenal extract into those of the 5th and 6th costal cartilages (Fig. 1). The corresponding portions of the heterolateral cartilages served as controls (Fig. 2). This group consisted of 10 animals.

Acta morph. tomus XIII.

26

To prepare the adrenal extract, both suprarenal glands of adult rats of both sexes and various weights were homogenized with 2 ml saline and centrifuged at 3000 r. p. m. for 10 minutes. The yellow extract was then pipetted off. In another group of experiments (8 dogs) a mixture of DOCA and thyrotropic hormone 1:1 was used instead of adrenal extract.

The wounds were closed after the injection and healed per primam. The animals were sacrificed after 5, 15, 20, 40 and 160 days. The removed material was radiographed, then fixed in formalin, decalcified by 7 per cent nitric acid and embedded in paraffin; the sections, 6 to 10 μ thick, were stained with haematoxylin-eosin, according to Hale, further with Schiff's periodic acid, azan, and according to Ritter-Oleson.



Fig. 2. Costal cartilage of dog (control). Haematoxylin-eosin, \times 48

Results

5-day old material. Several capillaries were found along the path of the probe in the ribs treated with adrenal extract. Capillaries, surrounded by granulation tissue, were well observable even in deeper layers (Fig. 3). Costal cartilages injected with saline showed sparse granulation tissue at a few spots and no change at others.

15 to 20-day old material. The adrenal extract caused an enlargement of the fissures, induced chondroclasis and a regressive change of the cartilage; some of the fissures made by the probe had changed into round holes. The



Fig. 3. 5-day old material. Granulation tissue and invading capillaries in the costal cartilage of a dog after local application of adrenal extract. Azan, \times 100



Fig. 4. 20-day old material. Development of osteoblasts and bony tissue along the path of the probe after local administration of adrenal extract. Haemalum chromotropic staining $\times~360$



Fig. 5. Almost empty holes in costal cartilage injected with physiological NaCl. Haemalum chromotropic staining, $\times~360$



Fig. 6. 30-day old material. Bony tubules (osteocytes, primary medullary cavity) after local administration of adrenal extract. Cross section. Azan, \times 200

formation of bone had started and was in some instances well advanced around the invading vessels. The surface of the newly formed bony tissue showed a margin of osteoblasts (Fig. 4). The cavities made by the dental probe were free from mechanical influences, and the osteogenesis in them resembled primary angiogenesis, although costal cartilages are exposed to torsional stresses



Fig. 7. Radiograph of 30-day old material. 3 arrows: after adrenal-extract treatment 2 arrows: after injection of saline (control) 1 arrow: untreated control

owing to respiration. Osteoblasts forming in the vascularized granulation tissue which spread from the perichondrium and the axial bone are the principal osteogenetic agents. Radiographs were slightly positive. The costal cartilages injected with saline exhibited essentially the same picture as the 5-day old material (Fig. 5); slight ossification could only be seen at a few points. Radiographs were negative. Treatment with DOCA and thyrotropic hormone induced slight ossification at some points. The effect of this treatment did not exceed 10 per cent of that produced by adrenal extract. Osteoblasts were few and far


Fig. 8. 160-day old material. Cross section of bony tubules formed under the effect of locally administered adrenal extract. Haematoxylin-eosin, $\times 12$



Fig. 9. 160-day old material. Continuous bony network formed after the local administration of adrenal extract. Azan, \times 180

between, the capillary network was sparse, and the amount of granulation tissue negligible.

30 to 40-day old material. There were definite bone tubules in the fissures treated with adrenal extract (Fig. 6). Lamellar structure, osteocytes, medullary cavity and a newly formed reticular network were the principal features of the fresh bone. The radiographic finding was positive (Fig. 7).

160-day old material. The histological picture, although more pronounced was essentially the same as in the 40-day old material. Newly-formed pieces of bone were seen to have coalesced at certain points (Figs. 8, 9). Of the control holes only a few contained bone. Here the radiograph was negative, the pattern consisted of the shadow of the bone in the axis of the cartilage.

Discussion

Several authors have attempted to explain the formation of capillaries. MÜLLER [17] pointed in this respect to hereditary factors, while KROMPECHER and KISS [13] emphasize the role of other elements. WILLIAMS [25] holds that hypoxia is the principal stimulus of endothelial proliferation and capillary formation in autologous grafts. Vascularization is presumably due to a combination of several factors. It was induced in the present experiments by the combined action of adrenal cortical and medullary extract, while sometimes a single chemical agent (e.g. protoporphyrin) may produce a similar effect.

The adrenal extract, used in the present experiments contains the following hormones that may be supposed to be involved in the mechanism of vascularization.

(i) Mineralocorticoids are known to promote mesenchymal growth, the proliferation of fibroblasts, the permeability of membranes and a susceptibility to inflammations.

(ii) Glycocorticoids have an opposite effect. Cortisone [13] and prednisolone (10) have been observed to induce devascularization. They may nevertheless play some part in the mechanism of vascularization by reducing the formation of antibodies and promoting glyconeogenesis.

(iii) Although it has not been demonstrated that androgens, oestrogens and progesterone promote vascularization, the possibility that these adrenal hormones influence the formation of capillaries cannot be excluded.

(iv) Adrenaline and noradrenaline, active principles of the suprarenal medulla, are vasoconstrictors; owing to their action on peripheral resistance they affect the pressure and distribution of blood which means a certain change of milieu for the endothelial cells.

It has already been mentioned that WILLIAMS [24, 25] regards hypoxia as the principal stimulus of endothelial proliferation and capillary formation.

rounded by a cartilaginous sheath so that it is not suitable for the study of primary osteogenesis and bone regeneration. Rats and guinea pigs will therefore be used in our future investigations into this question. The costal cartilage of swine is likewise unsuitable as it contains canals some of which are provided

The axial part of the costal cartilage of dogs contains bony tissue sur-

fore be used in our future investigations into this question. The costal cartilage of swine is likewise unsuitable as it contains canals some of which are provided with capillaries, although no ossification has been observed around the latter, a further proof that bone formation is the result of several factors. BRIDGES and PRITCHARD [3] studied the process of ossification and chondrification in rabbits. They found that tissues containing hypertrophic cartilage devitalized by acetone, hydrochloric acid or heat treatment, invariably induced osteogenesis. They suggested that chemical agents, presumably of a protein nature, were responsible for the phenomenon. It is, however, known that bone formation can be induced in the rabbit by a number of substances that have no such effect in other species. Rabbits are therefore not suitable for the testing of ossiferous preparations. Certain authors [5] emphasize that an abundant blood supply promotes osteogenesis, others [26] regard compressive and shearing forces as the significant factors of bone formation. It is in any case certain that bone is not formed in an avascular bradytrophic tissue unless a number of mechanical, chemical, hormonal and histological conditions are satisfied.

REFERENCES

1. ANNERSTEN, S.: (1940) Experimentelle Untersuchungen über die Osteogenese und

Acta morph. tomus XIII.

This means that the said active principles of the suprarenal medulla might also have a part in the formation of capillaries. This does not depend on hacmodynamic factors, nor does hypoxia alone induce vascularization; this is clear from the fact that there are numerous hypoxic bradytrophic tissues which

show no sign of vascularization.

3

die Biochemie des Fracturcallus. Acta chir. scand. 84, Suppl. 60, 1-181. - 2. BERTELSEN, A.: (1944) Experimental Investigations into Post-Foetal Osteogenesis. Acta orthop. scand. 15, 139-181. - 3. BRIDGES, J. B., PRITCHARD, J. J.: (1958) Bone and Cartilage Induction in the Rabbit. J. Anat. 92, 28–38. – 4. FOLLIS, R. H. jr.: (1955) Effect of Cortisone on Growing Bones of the Rat. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 76, 722–724. – 5. HAM, A. W.: (1930) A Histo-logical Study of the Early Phases of Bone Repair. J. Bone Jt. Surg. 12, 827–844. – 6. JENEY, A., KORPÁSSY, B.: (1934) Verzögerte Heilung der Haut und Knochenwunden bei Scorbuttieren. Erfolgreiche Behandlung mit Ascorbinsäure. Zbl. Chir. 61, 1836. - 7. JENEY, A., TÖRŐ, E.: (1936) Die Wirkung der Ascorbinsäure auf die Faserbildung im Fibroblastkulturen. Virchows Arch. path. Anat. 298, 87. - 8. KALAPOS, S., GERLEI, F.: (1960) Gleichzeitiges Vorkommen von Porzellangallenblase und Kalkmilchgalle, Zbl. allg. Path. path. Anat. Bd. 101, 399-409. -9. KISS, F. A., KROMPECHER, ST.: (1962) Promotion of Vascularization with Adrenal Extracts on Pieces of Umbilical Cord Explanted to Chorioallantoic Membrane. Acta biol. Acad. Sci. hung. Suppl. 4, 39–40.–10. Kostenszky, K.: Private communication.–11. KROMPECHER I. (1940) A csontképződés feltételei. Magy. Biol. Kutatóint. Munk. 13, 302. – 12. KROMPECHER, St. (1958) Die Grundlagen der Eierschalentherapie. Fischer, Jena. - 13. KROMPECHER, St., KISS, F. A.: (1962) Die Vascularisation bradytropher Gewebe im Chorioallantois Explantat. Verhandlungen des 1. Europäischen Anatomen-Kongresses, Strassburg 1960. Fischer, Jena S. 126-135. - 14. LACROIX, P.: (1951) The Organization of Bones. Churchill, London. - 15. LEVANDER, G. (1938) A Study of Bone Regeneration. Surg. Gynec. Obstet. 67, 705-714. - 16. LEXER, E.: (1929) Knochenbildung im Bindegewebe osteoplastischer Herkunft. Dtsch. Z.

Chir. 217, 1-32. - 17. MÜLLER, O.: (1937-1939) Die feinsten Blutgefässe der Menschen. I-II. Enke, Stuttgart. - 18. PEER, L. A.: (1955) Transplantation of Tissues. Williams and Wilkins. Baltimore, Pp. 102-104. - 19. SEREGÉLY Gy.: (1962) Az anabolikus hormonokról. Gyógyszereink. (Budapest), 6, 1-7. – 20. SCALFI, A., NASCIMBENE, L.: (1950) Osservazioni sulle ossificazioni eterotopiche sperimentali. Della proprietà osteogenetica dell'estratto alcoolico dell'epitelio vesicale. Boll. Soc. med.-chir. Pavia 64, 193-204. - 21. SILBERBERG, M., SILBER-BERG, R.: (1949) Some Aspects of the Role of Hormonal and Nutritional Factors in Skeletal Growth and Development. Growth 13, 359-368. - 22. TARSOLY, E.: (1963) Ausfüllung der Knochenhöhlen mit Eierschalen-Gips-Gemisch. Acta chir. Acad. Sci. hung. 1, pp. 63-72. 23. URIST, M. R., MCLEAN, F. C.: (1952) Osteogenetic Potency and New Bone Formation by Induction in Transplants to the Anterior Chamber of the Eye. J. Bone Jt Surg. 34, A. 443-470. - 24. WILLIAMS, R. G.: (1953) The Fate of Minute Blood Vessels in Omentum Transplanted as Autografts to the Rabbit's Ear. Anat. Rec. 116, 495-505. - 25. WILLIAMS, R. G.: (1959) Experiments on the Growth of Blood Vessels in Thin Tissue and in Small Autografts. Anat. Rec. 133, 465-478. - 26. YAMAGISHI, M. and YOSHIMURA, Y.: (1955) The Biomechanics of Fracture Healing. J. Bone Jt. Surg. 37A, 1034-1068.

OSTEOGENESE IN DEN RIPPENKNORPELN NACH LOKALER VERABREICHUNG-VON NEBENNIEREN-TOTALEXTRAKT

F. A. KISS

Verfasser machte in den Rippenknorpeln von 10 Hunden mit einer zahnärztlichen Sonde je etwa 25 Stichkanäle und injizierte in diese den von KISS und KROMPECHER (1962) beschriebenen Gesamtextrakt von Ratten-Nebennieren. Die Hunde wurden 5, 15, 20, 30, 40 bzw. 160 Tage nach dem Eingriff getötet. Es konnte makroskopisch, röntgenologisch und histologisch nachgewiesen werden, daß aus der Knochenhaut in die Stichkanäle Kapillargefäße hineinwuchsen und sich um diese herum eine Knochenscheide bildete. An den mit physiologischer Kochsalzlösung u. a. behandelten Kontrolltieren konnte keine Knochenbildung beobachtet werden. Demzufolge läßt sich mit Nebennieren-Totalextrakt auch im lebenden Organismus eine Knochenbildung induzieren.

КОСТЕОБРАЗОВАНИЕ В РЕБЕРНОМ ХРЯЩЕ ПОСЛЕ МЕСТНОГО ИНЪИЦИРО-ВАНИЯ ОБЩЕГО ЭКСТРАКТА НАДПОЧЕЧНИКОВ

Ф. А. ҚИШШ

Автор создал у 10 собак в реберном хряще при помощи зубноврачебного зонда по 25 каналов. В эти каналы он впрыскивал общий экстракт надпочечников крыс, описанный А. Кишш ми Кром. 1 Ехером (1962 г.). По истечении 5, 15, 20, 30, 40 и 160 дней животных убили. Макроскопически, гистологически и рентгенологически хорошо можно было выявить, что в проколотые каналы ребер со стороны надхрящницы вросли капилляры, вокруг которых образовалось костное влагалище. У контрольных животных, обрабаты вавшихся физиологическии раствором и другими способами, костеобразования не наблюдалось. Значит, введением общего экстракта надпочечников в живом организме также можно вызвать костеобразование.

Dr. F. A. Kiss: Debrecen, Anatómiai Intézet, Hungary

34

II. Institut für Pathologische Anatomie (Direktor: Prof. Dr. L. HARANGHY) und Gerichtliche Medizin (Direktor: Prof. Dr. S. ÖKRÖS) der Medizinischen Universität, Budapest

HISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG DER AUTOLYSE UND BEWERTUNG DER GOMORI-TAKAMATSUSCHEN ALKALISCHEN PHOSPHATASEREAKTION

Gy. Rózsa und P. Sótonyi

(Eingegangen am 30. Juli, 1963)

Es wurde die Wirkung der Autolyse auf die histochemischen Reaktionen untersucht. Dementsprechend ist es zweckmäßig, die Strukturveränderungen, den Gehalt an Succinodehydrogenase und alkalischer Phosphatase von bei 37° C autolysierten Geweben 6–12 Stunden nach dem Tod, die Untersuchungen von Glykogen und der Nukleoproteide, sowie die Aktivität der Säurephosphatase und der unspezifischen Esterase bis zu der 4. Stunde durchzuführen. In Geweben, die bei 2° C aufbewahrt wurden, ist es nicht gelungen Säurephosphatase nachzuweisen, nach einer Selbstverdauung von 6–12 Stunden könnten auch Esterasen und Nukleoproteide kaum gefunden werden, während Glykogen auch nach 48 Stunden in beträchtlicher Menge festgestellt wurde. Die Struktur zersetzte sich erst nach 72 Stunden, während die alkalische Phosphatase selbst in 120 Stunden lang autolysierten Geweben eine intensive Reaktion zeigte.

Die mit der Gomori-Takamatsuschen Methode erhaltene unspezifische Färbung wurde mit der zunehmenden Bindung von Calcium bzw. Calciumphosphat der autolysierenden Gewebe in Zusammenhang gebracht.

Der Zusammenhang zwischen Intaktheit der Struktur und Intensität der Enzymreaktionen wurde besprochen.

A) Durch die Zurückdrängung der für die Lebenserscheinungen notwendigen Energieerzeugung, oder durch deren Aufhören in der Autolyse, erhalten die Zersetzungsprozesse Übergewicht. Durch die Autolyse verschwinden die im Organismus abgestorbenen Zellen, sogar auch einzelne Eiweiß, Nukleinsäure- und Lipidkomponenten.

Die Untersuchung der Autolyse beschäftigt die Pathologen seit Anfang dieses Jahrhunderts. Notwendigerweise tauchte die Frage auf, inwieweit die nach dem Tode eintreffende Autolyse die Spezifität der histologischen Untersuchungen beeinflußt, was mit der Autolyse und was mit den pathologischen Veränderungen erklärt werden kann.

Im Gegensatz zu den älteren Beobachtungen, die sich auf die Untersuchung von Phosphor, Pentose, Ribose, Desoxyribonukleinsäure, der freien Aminosäuren und der neutralen Fette beschränkten (z. B. BRADLEY [1], CORPER [2], OKA [3], CRUICKSHANK [4], JUNGMANN, KIMMELSTIEL [5], WELLS [6], POPPER-WOZACSEK [7] und BURGHARDT-PAPPARATH [8]), erscheinen zur Zeit immer mehr solche Arbeiten, die diese Frage und die feineren Veränderungen der Struktur durch enzymhistochemische Untersuchungsmethoden (ANDERSEN [10], LANCKER [11], HOLTZER [11], BERENBOM [12]), oder mit dem Elektronmikroskop (CAESAR [13]) zu klären trachten. In vorliegender Arbeit wurden manche Enzymreaktionen der Selbstverdauung mit besonderer Rücksicht auf die zeitliche Entwicklung des Prozesses und ihre Abhängigkeit von der Temperatur untersucht.

Methoden

Weiße Ratten von 118-129 g Körpergewicht wurden nach 14 Stunden Hungern enthauptet, und Herz, Nieren und Leber wurden unter sterilen Bedingungen entfernt. Die eine Hälfte der Organe wurde in Petrischalen bei 37° C im Thermostat, die andere Hälfte bei 2° C im Kühlschrank aufbewahrt. Von den Organen wurde je ein Stückchen 0,1/2, 1, 2, 3, 4, 6, 12,24, 48, 72 und 120 Stunden nach dem Töten ausgeschnitten und gefroren fixiert.

In den Versuchen wurde die Autolyse der Gewebestruktur, der wichtigeren Zellenkomponenten und der Enzyme verfolgt.

A/a) Die Veränderungen der Struktur wurden an in Paraffin eingebetteten und mit Hämatoxylin-Eosin, Gallocyanin, Kernechtrot, van Gieson, Rawitz-Karmin oder Mallory gefärbten Schnitten untersucht.

b) Unter den Zellenkomponenten wurde das Glykogen mittels der Schiffschen Perjodsäurereaktion, die Nukleinsäuren mit der Taftschen Methylgrün-Pyroninfärbung untersucht.

c) Von den Enzymen wurden saure und alkalische Phosphatase, Succinodehydrogenase und die aspezifische Esterase untersucht. Die saure Phosphatase wurde mit der Gomorischen Bleisulfidmethode und mit α -Naphthylphosphat-Azofarbstoff, die alkalische Phosphatase mit Gomori-Takamatsuschem Glycerophosphat, α -Naphthylphosphat und Naphthol-AS-Phosphat nachgewiesen. Die nicht spezifischen Esterasen wurden mit Naphthylacetat und Naphthol-ASacetat untersucht. Die Reaktionen wurden mit hexazetiertem Fuchsin, Orthodianisidin und Echtrot-KL-Diazoniumsalz ausgeführt. Die Succinodehydrase wurde mit Neotetrazolium und Triphenyltetrazoliumchlorid nachgewiesen. In sämtlichen Fällen wurden Schnitte auch ohne Substrat inkubiert.

d) Als Sterilitätsprobe wurde die Gramsche Färbung durchgeführt.

B) Mit der Gomori – Takamatsuschen Methode wurde eine geringfügige unspezifische Färbung festgestellt, deren Grund in der zunehmenden Calcium- bzw. Calciumphosphatbindung der autolysierenden Gewebe gesucht werden dürfte.

Die 1939 von Gomori und Takamatsu veröffentlichte Methode des histochemischen Nachweises der alkalischen Phosphatasen – die die Grundlage und den Anfang der ungeheueren Entwicklung der Enzymhistochemie bedeutete – wurde seitdem mancher Kritik unterworfen.

Einzelne Verfasser, wie z. B. JOHANSON und LINDSTROM [15] stellten einfach in Abrede, daß die Methode zur histochemischen Lokalisierung des Enzyms geeignet sei. Andere, wie MEENTEN, JUNGE, GREEN [16], MANHEIMER, SELIGMAN [17], PEARSE [18], PÓSALAKY [19], TANKA, KELLER [20] gaben der Azofarbstoffmethode den Vorzug wegen des schnelleren Abbaues des verwendeten Substrates, der größeren Stabilität des entstandenen Azofarbstoffes, der besseren Lokalisierung und der geringeren Möglichkeit der Entstehung von Diffusionskunstprodukten.

a) Durch die alkalische Phosphatase wird vom Substrat Phosphorsäure abgespalten, die mit den in der Inkubationslösung und den Geweben vorhandenen Calciumionen ein praktisch unlösliches Salz bildet und ausgefällt wird. Im weiteren wird dieses Calciumsalz mit verschiedenen Methoden sichtbar gemacht.

b) Wichtig ist die Calciumionenkonzentration der Inkubationslösung. Bei niedriger Calciumionenkonzentration färben sich nämlich auch die Zellkerne, während bei höheren Werten (0,05 Mol) dieses nicht erfolgt. GOMORI [14] erklärte diese Erscheinung damit, daß der Zellkern keine Alkaliphosphatase enthält, seine Färbung also ein Kunstprodukt ist, das durch die sekundäre Adsorption des Calciumphosphates hervorgerufen wird. Mit der Erhöhung der Konzentration verbessert sich nach und nach die Lokalisierung, dagegen wird das Enzym über 0,1 Mol durch die Calciumionen schon gehemmt.

c) Nicht zu vernachlässigen ist ferner, daß bei dem Sichtbarmachen des ausfallenden Phosphates, auch das in den Geweben präformierte und irgendwie diese gebundene Calciumsulfat zu einem farbigen Produkt gestaltet wird, dessen Bedeutung bei Anwendung vonKontrollschnitten in dem Fall ermessen werden kann, wenn das Enzym gelähmt wird, oder wenn — um die schädlichen Wirkungen der Inaktivierung zu vermeiden — Schnitte ohne Substrat inkubiert werden.

Zwecks Annäherung dieser Frage wurden titrimetrische und flammenphotometrische Untersuchungen durchgeführt.



Abb. 1. Übergewicht der zweiten Phase der Autolyse in bei 37° C 12 Stunden autolysierter Rattenniere. Mallory



Abb. 2. Rattenleber. Kernveränderungen in der zweiten Phase der Autolyse. Kernechtrot



Abb. 3. Glykogengehalt der Rattenleber, unmittelbar nach dem Töten. Schiffsche Perjodsäurereaktion



Abb. 4. Glykogengehalt der Rattenleber nach 6stündiger Autolyse bei 37° C. Schiffsche Perjodsäurereaktion





Abb. 5. Succinodehydrogenaseaktivität der Rattenniere, unmittelbar nach dem Töten. Neotetrazolium



Abb. 6. Dehydrogenaseaktivität von Rattenniere bei 37° C nach 12 stündiger Autolyse. Neotetrazolium



Abb. 7. Aspezifische Esterase in der Rattenniere, unmittelbar nach dem Töten. Naphthol-AS-Acetat, mit Echtrot-KL-Salz



Abb. 8. Aspezifische Esterase in der Rattenniere nach 4 Stunden Autolyse, bei 37° C. Naphthol-AS-Acetat, mit Echtrot-KL-Salz





Abb. 9. Alkalische Phosphatase in der Rattenniere, unmittelbar nach dem Töten. Gomori- Takamatsusche Methode



Abb. 10. Alkalische Phosphatase in der Rattenniere bei 37° C nach Autolyse von 12 Stunden. Gomori-Takamatsusche Methode



Abb. 11. Alkalische Phosphatase in der Rattenniere, unmittelbar nach dem Töten. a-Naphthyl-phosphat, mit Orthodianisidin



Abb. 12. Alkalische Phosphatase in der Rattenniere nach 12 Stunden Autolyse, bei 37° C. a-Naphthyl-Phosphat mit Orthodianisidin





Abb. 13. Alkalische Phosphatase in der Rattenniere unmittelbar nach dem Töten. Naphthol- AS-Phosphat, mit Echtrot-KL-Salz



Abb. 14. Alkalische Phosphatase in der Rattenniere nach 12 Stunden Autolyse bei 37° C. Naphthol-AS-Phosphat mit Echtrot-KL-Salz



Mittels der Tisdallschen oxymetrischen und der Fekete-Popper-Szmukschen komplexometrischen Titration wurde zuerst die Ca-Bindung in je 100 ml Lösung von 2 Stunden lang inkubierter, bei 47°C 0, 6, 12, 24 und 48 Stunden autolysierter, je 100 g Rinderniere untersucht. Die bedeutende Ca-Bindung des Gewebes ließ darauf schließen, daß die Untersuchung auch unter Anwendung kleinerer Mengen durchführbar ist. Darum wurde dieselbe auch an in 10 ml Lösung inkubierter 10 g Rattenniere durchgeführt. Die gewogenen autolysierten Gewebestücke wurden nach Gefrieren mit Trockeneis pulverisiert; nach der Inkubation wurden die Lösungen filtriert und titriert.

Mittels der von BECKMANN und CHANEY [9.], BOYLE und BIRD [21], ITANO, BOYLE und BIRD [22] und SCHÜTZ [23] ausgearbeiteten »halbchemischen, halbphotometrischen« Methode wurde die Ca-Bindung von in 10 ml Lösung 2 Stunden inkubierter 10 g autolysierter Rattenniere bei 37° C untersucht. Es wurden in sämtlichen Lösungen, durch Zubereiten von Schnitten identischer Fläche und Stärke, gleich große Ca-bindende Flächen gewährleistet. Das aus dem durch Salpetersäure zerstörten Gewebe in die Lösung gelangte Calcium wurde mit Oxalsäure ausgefällt, dann nach Filtrieren in Essigsäure gelöst und die Menge des Calciums mit dem Flammenphotometer bestimmt.

Ergebnisse

A) (a) Die Autolyse der Struktur bei 37°C führte schon in der 4-6. Stunde zu bedeutenden Veränderungen. Der Vorgang begann im Cytoplasma, in einer der trüben Quellung ähnlichen Form.

Die Selbstverdauung kann sowohl hinsichtlich des Plasma, als auch des Kernes in zwei Phasen geteilt werden:

1) Das Plasma bekommt in der ersten Phase eine trübe, körnige, schaumige Struktur, es verliert nach und nach seine Basephilie, in der zweiten Phase dagegen hören die Zellgrenzen auf, die Färbung wird blasser, zuletzt tritt vollständige Homogenisation, Lösung ein.

2) Die Kerne fangen erst in der 6-12. Stunde an zu quellen, körnig zu werden, sammeln sich nach dem Verschwinden der Zellgrenzen zu kleinen Gruppen an. In der zweiten Phase bröckeln sie dann auseinander, lösen und homogenisieren sich (Abb. 1, 2).

In den bei 2°C aufbewahrten Geweben stellt sich der zweite Abschnitt nach Ablauf von 72 Stunden, in den bei 37°C aufbewahrten schon nach 24 Stunden ein. Hierdurch sind Struktur und etwaige pathologische Veränderungen in der ersten Phase noch zu erkennen und die nicht allzu empfindlichen Enzyme nachweisende Reaktionen zu bewerten, während die zweite Phase der Selbstverdauung die Untersuchung der Struktur schon sehr erschwert und die enzymhistochemischen Vorgänge aller Wahrscheinlichkeit nach unbewertbar macht, denn in der Zwischenzeit erhöht sich der Aktivitätsverlust sehr stark, die Diffusion ist hochgradig und die Lokalisierung völlig verändert.

b) Das Hauptziel der Untersuchungen war die Beobachtung der Veränderungen der wichtigen Zellenkomponenten und der enzymatischen Prozesse.

Der mittels der Schiffschen Perjodreaktion beobachtete Abbau des Glykogens wurde, in Übereinstimmung mit den meisten Verfassern (ANDERSEN [10], MOMLOK und MORIONE [25]) als ein besonders rascher Vorgang erkannt (Abb. 3, 4). Der größte Teil des bei 37°C autolysierten Leber- und Herzglykogens war nach der 4. Stunde verschwunden, die Färbung war nach 48 Stunden

nur mehr unbedeutend, während sie den bei 2°C aufbewahrten Geweben noch ausgeprägt war. Deshalb sind auch wir der Meinung, daß der rasche Abbau des Glykogens, und nicht der ursprünglich geringe Glykogengehalt des Organs, die Erklärung für die am menschlichen Herzen oft beschriebene schwache Reaktion bietet.

Bei der Taftschen Methylgrün-Pyroninfärbung wurde die Reaktion bei 37°C nach 4 Stunden, bei 2°C nach 12 Stunden negativ. Die Färbung der Kernnukleoproteide wurde erst später schwächer und blieb länger positiv als jene der Nukloproteide des Plasmas, ganz ähnlich, wie bei der Strukturenfärbung, wo das Verschwinden der Plasmenbasophilie der Schwächung der Kernfärbung voranging. Unter den Organen war die Reaktion im Herzen die stärkste und dauerhafteste, in der Leber die schwächste, obwohl der Unterschied zwischen den Organen in Wirklichkeit als unbedeutend bezeichnet werden kann.

c) Die verschiedenen Enzyme verhielten sich verschiedenartig, da sich ihre Aktivität in Abhängigkeit von ihrer Zusammensetzung, der Temperatur und der verstrichenen postmortalen Zeitdauer nicht einheitlich verminderte.

Die Säuerephosphatase der bei 2°C aufbewahrten Gewebe ergab keine bewertbare Reaktion und bei 37°C war nach Ablauf von 4 Stunden nur mehr in der Leber eine Enzymaktivität nachzuweisen. Die Bleisulfidmethode erwies sich in der Lokalisierung des Enzyms als unzuverlässig, obwohl die Kontrollschnitte bis zum Schluß ungefärbt blieben. Bei dem Nachweis dieses außerordentlich empfindlichen Fermentes sind die Vorteile des Naphthol-AS-Phosphats unentbehrlich. Auch die Untersuchungen von LANCKER und HOLTZER [11] bewiesen die rasche Verringerung der Säurephosphatase und die außerordentliche Empfindlichkeit des Fermentes.

Die Verminderung der Aktivität der Succinodehydrogenase war in der Leber am auffallendsten, im Herzen am wenigsten auffallend. Der Aktivitätsverlust wurde auch in den bei 37°C autolysierten Geweben erst nach 12 Stunden bedeutend (Abb. 5, 6), in den bei 2°C aufbewahrten wurde selbst nach Ablauf von 72 Stunden keine signifikante Veränderung gefunden.

Zur Untersuchung der empfindlichen Esterasen wurde die Paraffineinbettung als ungeeignet gefunden. Das Naphthol-AS-Acetat ergab bei 37°C 3-4 Stunden (Abb. 7, 8), bei 2°C 6-12 Stunden autolysierten gefrorenen Geweben schon keine bewertbare Reaktion, da die Diffusion — deren Grund RICHTERICH [24] in der Umwandlung der Desmoenzyme zu Lyoenzymen erblickt — die Lokalisierung noch vor der Zersetzung der Struktur bedeutend verändert hatte. Obwohl laut Gössner [26] ein Aufbewahren von 12 Stunden erlaubt werden kann, ist es zweckmäßig, für genauere Untersuchungen — besonders bei geringere Aktivität zeigenden Geweben — die Reaktionen je früher, aber spätestens 6 Stunden nach dem Tod durchzuführen.

B) Die zum Nachweis der alkalischen Phosphatase angewendete Gomori-Takamatsusche Methode (Abb. 9, 10) ergab in den bei 37° C gehaltenen Nieren-

tubuli, den Kupfferschen Sternzellen der Leber und in den kleinen Gefäßen des Myocardiums auch nach der Auflösung der Struktur eine positive Reaktion. In den bei 2°C aufbewahrten Geweben war die Reaktion sogar nach 120 Stunden noch intensiv. Mit der Azofarbstoffmethode — besonders mit Naphthol-AS-Phosphat, mit der keine spezifische Färbung beobachtet wurde — war die Enzymdiffusion früher, bei 37°C bereits in der 4—5. Stunde festzustellen und auch der Aktivitätsverlust ging schneller vor sich (Abb. 11, 12, 13, 14). Mittels der Gomorischen Technik wurden auch die substratlosen Kontrollen angefärbt, und die Farbreaktion verminderte sich auch bei fortschreitender Gewebezer-



Abb. 15. Calciumbindung von hei 37° C autolysierter Rattenniere. Oxymetrische und kom. plexometrische Titration

setzung nicht, es lag also auf der Hand, den Grund der verdächtig dauerhaften Enzymaktivität anzeigenden Entfärbung in spezifischen Faktoren zu suchen. Mit Rücksicht auf die Bedeutung des Calciums bzw. des Calciumphosphates in der Reaktion, wurde untersucht, ob im Zustandekommen der unspezifischen Reaktion nicht die Bindung des mit der Zersetzung der autolysierenden Gewebe zusammenhängende Calcium bzw. Calciumphosphat eine Rolle spielt.

Wir vermochten mit der Tisdallschen oxymetrischen und der Fekete-Popper-Szmukschen komplexometrischen Titration nachzuweisen, daß während der Selbstverdauung die Gewebe immer mehr Calcium binden. Die Untersuchungen wurden erst an Rindernieren durchgeführt, um der Inkubationslösung ein entsprechendes calciumbindendes Gewebe zugeben zu können. Als eine Absorption bedeutenden Grades wahrgenommen war, wurden Versuche auch mit Rattennieren durchgeführt.

Wir fanden (Abb. 15), daß das meiste Calcium von der bei 37°C 12 Stunden bzw. 24 Stunden autolysierten Rattenniere gebunden wurde: 7,3 bzw. 9,9 mg je gramm in 2 Stunden.

Mit guter Annäherung wurden mit der »halbchemischen, halbflammenphotometrischen« Methode übereinstimmende Resultate erzielt (Abb. 16), die bei 37°C 12 bzw. 24 Stunden autolysierten Gewebe haben pro gramm 7,0 bzw. 8,6 mg Calcium gebunden. Es weist auf die Wirkung der Selbstverdauung hin, daß die Calciumbindung, die letzten Endes nur bis zu 12-24 Stunden der Autolyse signifikant ist, vor ihrem Ingangkommen und nach der Homogenisation des Gewebes sich nicht bedeutend geändert hat.



Abb. 16. Calcium
bindung von bei 37° C autolysierten Rattenniere. Flammenphotometrische Bestimmung

Besprechung

A) Die oben angeführten Ergebnisse zeigten also, daß bei 37°C eine 1 Tag, bei 2°C eine 3 Tage dauernde Autolyse solche strukturellen Veränderungen verursacht, die bei der Bewertung histochemischer Reaktionen Schwierigkeiten, sogar Irrtümer verursachen können. Die Lage wird dadurch weiter kompliziert, daß auch die Selbstverdauung der einzelnen Organe, Gewebe und Zellenkomponenten verschieden ist. Die feineren, komplizierteren Elemente fallen im allgemeinen rascher zum Opfer.

Von den untersuchten Zellenkomponenten verschwanden sowohl das Glykogen als auch die Nukleoproteide schon vor der Zersetzung der Struktur beinahe vollständig. In den bei 37°C autolysierten Geweben wurde nach 4—6 Stunden von diesen nur mehr sehr wenig gefunden. Daher fiel es auf, daß nach dem Verblassen des Leberparenchyms sich die bis dahin PAS-negativen Kupfferschen Sternzellen entfärbten. Diese Erscheinung wird mit der Diffusion des Glykogens in die der Autolyse gegenüber widerstandsfähigere Sternzellen erklärt, oder wird für eine PAS-Positivität der Zersetzungsprodukte gehalten, da die Reaktion durch die Diastaseverdauung nicht beeinflußt wird [KENT, 28].

Von den Enzymen haben sich die Säurephosphatase und die nicht spezifischen Esterasen als die empfindlichsten erwiesen, diese diffundierten am

schnellsten, waren schon lange vor der völligen Autolyse beinahe vollständig verschwunden. Der Aktivitätsverlust der Succinodehydrogenase verläuft parallel mit dem Fortschreiten der Selbstverdauung der Struktur.

B) Mit der Gomori-Takamatsuschen Metode war die alkalische Phosphatase selbst in den bei 37°C 24 Stunden gehaltenen Geweben nachzuweisen. Die Azofarbstoffmethoden zeigten aber sowohl die Diffusion als auch den Aktivitätsverlust früher an. Auf Grund der Ergebnisse bezüglich der Calciumbindung erscheint die Annahme berechtigt zu sein, daß die mit der Gomorischen Methode beobachtete unspezifische Färbung mit der erhöhten Bindung von Calcium bzw. Calciumphosphat der autolysierten Gewebe in Zusammenhang steht. Die Farbreaktion kommt nämlich zustande, gleichgültig ob das Phosphat infolge der Enzymfunktion oder der Selbstverdauung entsteht. Das Phosphat kann sich nämlich nicht nur dem Ort des Enzyms entsprechend, sondern bei der Vernichtung des Enzyms, auch unabhängig von dessen Vorhandensein, mit dem in Lösung befindlichen, in den Geweben präformierten, oder an diese irgendwie gebundenen Calcium verbinden, wodurch die Färbung nicht das Enzym, sondern das gebundene Calciumphosphat lokalisiert.

Es kann letzten Endes von der Gomori – Takamatsuschen Methode gesagt werden, daß diese für Untersuchungen unmittelbar nach dem Tode geeignet ist, eine gute Lokalisierung gewährleistet, während sie mit fortschreitender Autolyse immer weniger spezifisch wird, so daß nach der 6. Stunde die Azofarbstoffmethoden zu bevorzugen sind.

Wichtig ist, daß die Lokalisierung von widerstandsfähigen Fermenten nicht nur durch die frühe Diffusion, sondern auch durch die Struktur, hauptsächlich aber durch die Autolyse des Cytoplasmas erschwert wird. Deshalb soll die Untersuchung aller Enzyme nach Möglichkeit 6–12 Stunden nach demTod durchgeführt werden, und es ist zweckmäßig, auch die Untersuchungen von bei 2°C aufbewahrten Geweben bis zu der 24. Stunde anzufangen.

LITERATUR

1. BRADLEY, H. C.: (1938) Physiol. Rev. 18, 173. — 2. CORPER, H. J.: (1912) J. exp. Med. 15. 429. — 3. OKA: (1919) Virchows Arch. path. Anat. 228, 200. — 4. CRUICKSHANK, J.: (1912) J. Path. Bact. 16, 167. — 5. JUNGMANN, H.. KIMMELSTIEL, P.: (1929) Biochem. Z. 212, 347. — 6. WELLS, H. G.: (1920) J. Path. Bact. 26, 157. — 7. POPPER, W., WOZACSEK, V.: (1931) Virchows Arch. path. Anat. 279, 819. — 8. BURGHARDT, H., PAPPARATH, J.: (1931) Beitr. path. Anat. 99, 386. — 9. BECKMANN, A., CHANEY, A.: (1953) Proc. physiol. soc. 69, 520. — 10. ANDERSEN, H.: (1960) Acta path. microbiol. scand. 50, 225. — 11. LANCKER, J. L., HOLTZER, R. L.: (1959) Amer. J. Path. 563, 35. — 12. BERENBOM, M.: (1955) Cancer Res. 1, 15. — 13. CAESAR, R.: (1963) Zbl. allg. Path. path. Anat. 103, 154. — 14. GOMORI, J.:(1951) J. lab. clin. Med. 37, 526. — 15. JOHANSON, G., LINDSTROM, K.: (1952) Acta med. scand. 266, 142. — 16. MEENTEN, M. L., JUNGE, J., GREEN, M. M.: (1944) J. biol. Chem. 153, 471. — 17. MANHEIMER, L. M., SELIGMAN, A. M.: (1949) J. nat. Cancer Inst. 9, 181. — 18. PEARSE, A. G.: (1954) Int. Rev. Cytol. 3, 329. — 19. PÓSALAKY, Z.: (1962) Morph. Ig. Orv. Szemle 3, 217. — 20. TANKA, D.: (1962) Morph. Ig. Orv. Szemle 3, 226. — 21. BOYLE, J., BIRD, J.: (1951) Amer. J. clin. Path. 21, 75. — 22. ITANO, A., BOYLE, J., BIRD, J.: (1951) Amer. J. clin. Path. 21, 75. — 23. SCHÜTZ, G. O.: (1953) Schweiz. med. Wschr. 83, 383. — 24. RICHTERICH,

R.: (1952) Acta anat. (Basel) 14, 263. – 25. MOMLOK, L., MORIONE, N.: (1952) Amer. J. Path. 28, 497. – 26. Gössner, W.: (1955) Virchows Arch. path. Anat. 327, 2. – 27. KENT, P.: (1957) Arch. Path. 64, 17.

HISTOCHEMICAL EXAMINATION OF AUTOLYSIS; EVALUATION OF GOMORI-TAKAMATSU'S ALKALINE PHOSPHATASE METHOD

GY. Rózsa and P. Sótonyi

The effect of autolysis on histochemical reactions has been studied. It was found advisable to determine the structural changes of tissues autolyzed at 37° C, further their succinodehydrogenase and alkaline phosphatase levels within 12 hours after the time of death. Estimations of glycogen, nucleoproteins, further acid-phosphatase and esterase activity should be made within 4 hours after death. It was not possible to demonstrate acid phosphatase in tissues kept at 2° C, and hardly any esterase and nucleoprotein was found after autolysis for 6 to 12 hours, whereas after 48 hours a considerable amount of glycogen was still present. Chemical splitting of the tissues took 72 hours, while alkaline-phosphatase activity was still intensive after a self-digestion of 120 hours.

It is suggested that the aspecific staining reaction obtained with the Gomori-Takamatsu method is due to that autolytic tissues are binding increased amounts of Ca and/or calcium phosphate.

The connection between structural integrity and intensity of enzymatic reactions is discussed.

ГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АВТОЛИЗА И ОЦЕНКА МЕТОДА ГОМОРИ-ТАКАМАТШУ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФОТАЗЫ

дь. РОЖА и П. ШОТОНЬИ

Исследовалось действие автолиза на гистохимические реакции. Согласно полученным результатам изменения структуры тканей, после автолиза при 37° С, их содержание сукцинодегидрогеназы и целочной фосфатазы целесообразнее всего исследовать 6-12 часов после наступления смерти, а их содержание гликогена и нуклеопротеидов, так же как и активность кислой фосфатазы и эстеразы не позже чем 4 часа после наступления смерти. В тканях, содержанных при 2° С, кислой фосфатазы не удалось выявить, и после 6-12 часового автолиза эстеразы и нкулеопротеиды также обнаруживаемы лишь в очень незначительном количестве. В то же время гликоген спустя 48 часов после наступления смерти еще можно найти в значительном количестве. Разложение структуры наблюдалось лишь по истечении 72 часов, в то время как целочная фосфатаза давала еще после 120 часового автолиза интенсивную реакцию.

Неспецифическое окрашивание, получаемое при помощи метода Гомори—Такаматшу, по мнению авторов, вызывается повышением связывания кальция, вернее фосфата кальция.

Особое обсуждается взаимосвязь между неповрежденностью структуры и интенсивностью энзиматических реакций.

Dr. Gy. Rózsa Dr. P. Sótonyi Budapest, Üllői út 93, Hungary

42

Institute of Anatomy, Histology and Embryology (Director: Prof. I. KROMPECHER), University Medical School, Debrecen

METACHROMASIA IN CARTILAGINOUS TISSUES

I. FÖLDES, L. MÓDIS and I. SÜVEGES

(Received August 6, 1963)

Histochemical factors influencing metachromasia have been studied in the costal cartilage, the knee joint cartilage and the cervical salivary gland of newborn rats. Observations made with different fixatives, different dyes and at different pH values revealed the following:

(1) Any metachromatic dye (except gallocyanine), any fixative and all acid pH values can be used for the purposes of gross orientation.

(2) Thionine, toluidine blue and azure at low pH seemed to be most suitable for selective determinations, the histochemical differentiation of acid mucopolysaccharides, because by the use of these dyes the beta-gamma shifts occur in opposite directions. A distinction between the colour effect of the different types of metachromasia is, therefore, comparatively easy.

(3) The above findings apply to cartilaginous tissue in the first place.

Introduction

The quality of metachromatic reaction depends on the dye, on the pH value of the solution and on the nature of the fixative.

Freezing and freeze-drying are regarded as the best methods of fixation [3, 5, 19, 34, 39, 40, 41] because they do not waste or modify the chromotrope. Chemical fixatives cause denaturation or precipitation of the polysaccharides and proteins. Absolute alcohol is the most widely used fixative [10, 18, 28], and also Carnoy's fixing fluid is wide-spread [9], altough PEARSE [28] regards it as unsuitable for the purposes of metachromatic staining. Since it has been found that formalin reacts only with proteins and so can fix any polysaccharide bound to protein, it may be used as a fixative, either alone or together with basic lead acetate, without adversely influencing the metachromatic reaction [3, 6, 12, 15.]. Nor have other fixing fluids been found to affect it so that any fixative can be used in connection with metachromatic staining.

Numerous basic dyes are in use for this purpose. They are as a rule dissolved in water or alcohol. The usual concentrations vary from 0.1 to 0.001 per cent, with pH values between 3 and 6. Toluidine blue, methylene blue and thionine are most widely employed, but also azure dyes [40], safranin [6], methyl violet [7], celestine blue [11], cresyl violet [21, 22], Bismarck brown [20, 38], gallocyanine [37], pinacyanol [1, 2, 29, 30] are used. Some authors

achieved no success with methylene blue and gentiana violet [11, 20]. LILLIE [20] found that methylene blue is rarely obtained in pure form and may contain contaminating azures which are responsible for metachromasia.

It is clear that no conclusive opinion has been formed regarding any of the factors influencing metachromasia, and it was therefore intended to examine them in this study and to ascertain the most favourable conditions for the reaction under consideration.

Material and method

Three qualitatively different mucopolysaccharide — containing structures, viz. the knee joint, costal cartilage and the cervical gland of newborn white rats — were used. Susa, neutral formalin, Carnoy's and Zenker's fluids were used for fixation, and a few control sections were frozen. Toluidine blue, thionine, cresyl violet, methyl violet, celestine blue, safranin, azure, dahlia [24], Bismarck brown, gallocyanine and gentiana violet [13] were applied as dyes. All staining solutions were prepared with three different pH values (1.4, 3.1, 5.2).

Results

We registered the orthochromatic (alpha) and both metachromatic (beta and gamma) reactions of every dye, as also the colour of the staining solution (Table 1). SCHEIBE [31, 32, 33] distinguished three wave-length zones in the solutions on the evidence of photometric measurements. Their normal equilibrium can be upset by a change in concertration. MICHAELIS [26, 27] claimed that the observed spectral absorption maxima (α , β and γ peaks) [24, 25, 28] correspond to monomers, dimers and polymers. After disturbing the normal equilibrium by the metachromatic substance a new equilibrium sets in. We

Table 1												
Colour	of	the	solutions	of	different	metachromatic	dyes	and	different	types	of	metachromasia

		Colour	Metachromasia							
		of solution	ortho	β	2'					
1	Methyl violet	violet	violet	violescent pink	red (pink)					
2	Cresyl violet	violet	violet	pinkish violet	purple					
3	Gentiana violet	violet	light violet	-	purplish violet					
4	Dahlia	violet	violet	pinkish violet	pinkish violet					
5	Toluidine blue	blue	blue	violet	red (pink)					
6	Thionine	blue	blue (violet)	purple (violet)	red (pink)					
7	Celestine blue	blue	blue (greyish)	violet	red (pink)					
8	Azure	azure (blue)	light blue	bluish violet	pinkish violet					
9	Gallocyanine	greyish blue	light yellow	—	bright lemon yellow					
10	Bismarck brown	nut brown	yellowish brown	brownish yellow	brown yellowish					
11	Safranin O	red	purplish red	pinkish yellow	orange					

Acta morph. tomus XIII.

44





Fig. 1. Cartilage from the proximal portion of the tibia of one-day old rat. Slight metachromasia. Bismarck brown stain, Susa's fixing fluid. Magnif. $10 \times 10 \times 4$

Fig. 2. Cartilage from the proximal portion of the tibia of one-day old rat. Gamma metachromasia. Gentian violet stain, Zenker's fixing fluid. Magnif. $10 \times 10 \times 4$

Fig. 3. Costal cartilage of one-day old rat. Gamma metachromasia. Dahlia stain, pH 5.2. Susa's fixing fluid. Magnif. $10 \times 10 \times 4$

- Fig. 4. Cartilage from proximal portion of tibia of one-day old rat. Pale gamma metachromasia. Methyl violet stain, pH 1.4. Carnoy's fixing fluid. Magnif. $10 \times 10 \times 4$
- Fig. 5. Cartilage from proximal portion of tibia of one-day old rat. Pronounced gamma metachromasia. Cresyl violet stain, pH 3.1. Susa's fixing fluid. Magnif. $10 \times 10 \times 4$

Fig. 6. Cartilage from proximal portion of tibia of one-day old rat. Pronounced beta metachromasia. Cresyl violet, pH 3.1, Zenker's fixing fluid. Magnif. $10 \times 10 \times 4$

Fig. 7. Cartilage from proximal portion of tibia of one-day old rat. Intensive beta metachromasia. Celestine blue stain, pH 3.1. Susa's fixing fluid. Magnif. $10 \times 10 \times 4$

Fig. 8. Cartilage from proximal portion of tibia of one-day old rat. Gamma metachromasia. Celestine blue, pH 5.2. Susa's fixing fluid. Magnif. $10 \times 10 \times 4$

Fig. 9. Cartilage from proximal portion of tibia of one-day old rat. Gamma metachromasia. Toluidine blue, pH 1.4. Susa's fixing fluid. Magnif. $10 \times 10 \times 4$

Fig. 10. Cartilage from proximal portion of tibia of one-day old rat. Beta metachromasia. Toluidine blue, pH 5.2. Susa's fixing fluid. Magnif. $10 \times 10 \times 4$

Fig. 11. Cartilage from proximal portion of tibia of one-day old rat. Gamma metachromasia. Thionine, pH 1.4. Susa's fixing fluid. Magnif. $10 \times 10 \times 4$

Fig. 12. Cartilage from proximal portion of tibia of one-day old rat. Beta metachromasia. Thionine, pH 5.2. Susa's fixing fluid. Magnif. $10 \times 10 \times 4$



speak of beta metachromasia if the dye which becomes predominant after the readjustment is of the dimer type; of gamma metachromasia if the dominant dye is of the polymer type; of orthochromasia or alpha metachromasia if the original equilibrium is not affected by the chromotrope. The colours corresponding to α , β and γ metachromasia are blue, violet and red, respectively.

The development of the different types of metachromasia is assumed to be caused by changes in the electronic structure [36.] It is the π electron-cloud of the ions of the basic dye on which the emitted light depends; if there is a change in the cloud owing to a mutual polymerization of the ions of the dye, the light emitted by the chromotropic substance will change accordingly. It has been found that the shift of the wave length is proportional to the length of the "resonant system" of the π -cloud, i.e. to the degree of polymerization.

Alpha metachromasia according to PEARSE [28], takes the stain intensively and is sensitive to alcohol. Beta metachromasia, due to highly polymerized carbohydrates and phosphatic components, is less sensitive to alcohol. Gamma metachromasia, due to sulphated polysaccharide esters, is alcohol-resistant.

Metachromatic reaction of the examined material. Except when non-metachromatic dyes were employed, metachromasia was invariably obtained with the use of the cartilage taken from the articulation and the epiphysis of the knee as also with costal cartilage, whereas the metachromatic reaction was mostly negative with the use of glandular epithelium and acini. Lack of metachromasia was presumably due to that the salivary gland of the rat contains hardly any acid mucopolysaccharide. The nature of the reaction was variable in the epiphyseal cartilage. It was of the gamma type in the upper zones, but usually changed from gamma into beta metachromasia in the neighbourhood of the metaphysis.

Effect of different dyes on metachromasia. Metachromatic reaction was uncertain with gallocyanine and Bismarck brown, although the latter is recommended by LILLIE [20] and SUBICS [38] (Fig. 1). Metachromatic staining was very marked with the use of safranin, although no distinction between β and γ peaks was possible. Only the gamma type of metachromasia was obtained with the use of gentiana violet and methyl violet so that these stains, too, are unsuitable for the distinction of metachromatic types (Figs. 2, 4). The other dyes employed in our experiments, viz. thionine, toluidine blue, celestine blue, cresyl violet, azure and dahlia, were all suitable for metachromatic staining because both the beta and the gamma type of reaction can be obtained with their use. Fig. 3 presents clear gamma metachromasia after staining with dahlia.

Effect of the pH on metachromasia. It was the aim of these experiments to study the effect of different pH values (i) on the size of the stained area and (ii) on the type of the metachromatic reaction.

(i) A lowering of the pH value was followed by a reduction in the size of the stained area. At pH 1.4, for instance, no reaction was obtained with the use of safranin and celestine blue. It should be borne in mind that it is difficult to dissolve these dyes with the buffer at a very low pH. Low pH values make it possible, on the other hand, to obtain selective results since only sulphated mucopolysaccharides give a metachromatic reaction at such a pH. Increase in the value of pH resulted in a more pronounced staining when methyl violet, safranin and toluidine were used (with the last-named dye only after fixation in formalin or Zenker's fluid). A shift of the pH towards alkaline produced no effect on staining with Bismarck brown.

(ii) Two kinds of metachromatic reaction were observed.

(a) Increase in the value of pH caused gamma to change into beta metachromasia if thionine (Figs. 11, 12), azure or toluidine blue were used (in the latter case only after fixation in Susa's fluid (Figs. 9, 10)). This change is significant because — if PEARSE's theory is correct and gamma metachromasia indicates sulphate esters [28] — the phenomenon in question facilitates fine histochemical differentiation within the mucopolysaccharides.

(b) Increase in the value of pH caused beta to change into gamma metachromasia if celestine blue (Figs. 7, 8), cresyl violet or dahlia were used, irrespective of the nature of the fixative. The same occurred in the case of toluidine blue after fixation in Carnoy's fluid. The mechanism of this phenomenon is obscure, and we can only assume that, under the given conditions (i. e. in the presence of a great amount of chondroitin sulphate in the cartilage), these dyes are not suitable for the demonstration of sulphurated mucopolysaccharides and that, beside the high pH, other factors are also responsible for the gamma type metachromasia.

Effect of different fixatives on metachromasia

(a) The nature of the fixatives did not influence the reaction if methyl violet, safranin or Bismarck brown were used as dyes.

(b) Susa's fluid (in the case of toluidine blue, thionine and azure), Carnoy's fluid (in the case of thionine and azure), formalin and Zenker's fluid (in the case of thionine and azure) produced a change from gamma to beta type metachromasia (Figs. 5, 6). The less desirable change from beta to gamma occurred with the use of all other stains and these same fixatives.

(c) The metachromatic reaction of frozen preparations was the same as that observed after fixation in Susa's fluid.

Although, generally speaking, the nature of metachromatic reaction was not essentially influenced by any of the examined fixatives, the observations under (b) and (c) have to be considered if fine selection is desired (Table 2).



A	В	C	D
Methyl violet	Toluidine blue	Bismarck	Gold-sol
Cresyl violet	Thionine	brown	Model
Gentiana violet	Celestine blue		Experiment
	azure		Safranin
Dahlia	Gallocyanine		

Fig. 13. Schematic spectrum of various groups of dyes and their metachromatic types



With a view to substantiating the polymerization theory of metachromasia, we prepared a model thereof by means of colloidal gold solution. The colour of the solution in this model is red, that of the tissue reaction yellow, yellowish brown, brown or blue. With the use of red colour, the size of the sol particle is smaller than that of the particles which emit light of different wave lengths in the tissues. Since, on the other hand, tissue precipitation results from physicochemical aggregation, a reduction in dispersity occurs [4, 8, 43, 44]. Fig. 13 shows the colours of dissolved metachromatic dyes as also the

	Names of stains	Susa			Carnoy			Neutral formol			Zenker		
	pH	1,4	3,1	5,2	1,4	3,1	5,2	1,4	3,1	5,2	1,4	3,1	5,2
1	Thionine	00	O +	++	00	O +	++	00	O+	+ +	00	O +	++
2	Azure	00	O +	++	00	O +	++	00	0+	++	00	O +	++
3	Toluidine blue	00	O +	++	++	+0	00	+	++	+++	+	++	+++
3	Celestine blue	++	+ 0	00	++	+ 0	00	++	+ 0	00	++	+ 0	00
5	Cresyl violet	++	+ 0	00	++	+ 0	00	+ +	+ 0	00	+ +	+ 0	00
6	Dahlia	++	+ 0	00	++	+ 0	00	++	+0	00	++	+ 0	00
7	Bismarck brown	++	++	++	++	+ +	+ +	++	++	+ +	++	+ +	++
8	Safranin o		+	+ +		+	++		+	++		+	++
9	Methyl violet	0	000	000	0	00	000	0	00	000	0	00	000
10	Gentiana violet	0	00	000	0	00	000	0	00	000	0	00	000
11	Gallocyanine	•0	•0	•0	•0	•0	•0	•0	•0	•0	•0	•0	•0

 Table 2

 Metachromatic types obtained with different dyes, different fixatives, at different pH values

 $\beta = a$ metachromasia; $+ = \beta$ metachromasia; $\bigcirc = \gamma$ metachromasia.

types of metachromasia obtained with their use. As can be seen, the dyes belong to three categories according to the colour of their solutions: violet (A), blue (B), and red (C). The β -type of metachromasia (violet) shows hardly any wave length shift in the case of dyes of category A; the direction of the slight shift corresponds to that of the γ shift. The β - γ shifts are of the opposite direction with dyes of category B so that the possibility of distinguishing between the types of metachromasia is best with their use. This observation confirms our findings, for it is exactly category B to which thionine, toluidine blue and azure (i.e. the stains described as most satisfactory in the foregoing) belong. The metachromasia of safranin and the colour of change obtained with its use in

the goldsol-model experiment are of the β type, since the shift was directed in both cases toward the zone of short wave length.

Metachromasia of the γ type, obtained with the use of toluidine blue, thionine and azure (at pH 1,4, and preferably after fixation in Susa's fluid) indicates the presence of chondroitin sulphate, hyaluronic sulphate and markedly acid mucopolysaccharides in the cartilage. Metachromasia obtained with these same dyes at pH 5,2, further the γ type of metachromasia obtained with cresyl violet, dahlia and celestine blue at pH 5.2 indicate weakly acid mucopolysaccharides (hyaluronic acid, heparin, mucoprotein, mucopolysaccharide-protein complex, etc.) It is advisable in all experiments involving metachromatic reactions to register the colour effects very carefully, and to reduce the pH of the staining solution as much as possible.

REFERENCES

1. BENSLEY, S. H.: (1934) On the Properties and Distribution of the Intercellular Ground Substance of Loose Connective Tissue. Anat. Rec. 6., 93. – 2. BENSLEY, S. H.: (1952) Pinacyanol Erythrosinate as a Stain for Mast Cells. Stain Technol. 27, 269. – 3. BUNTING, H.: (1950) The Distribution of Acid Mucopolysaccharides in Mammalian Tissues as Revealed by Histochemical Methods. Ann. N. Y. Acad. Sci. 52, 977. - 4. Buzágh A.: (1954) A kolloidkémia praktikuma. Tankönyvkiadó, Budapest. – 5. CARNES, W. H., WEISMAN, N., RUBIN, P. S.: (1951) Nuclear Metachromasy. J. nat. Cancer Inst. 12, 240. — 6. Сомртон, А. А.: (1952) A Cytochemical and Cytological Study of the Connective Tissue Mast Cell. Amer. J. Anat. 91, 301. — 7. Conn, H. J.: (1953) Biological Stains. 6th ed. Biotechnical Publications, Geneva.-8. ERDEY-GRÚZ T., PROSZT J.: (1951) Fizikai kémiai praktikum. Tankönyvkiadó, Budapest. - 9. FLAX, M. H., HIMES, M. H.: (1950) A Differential Stain for Ribonucleic and Desoxyribonucleic Acids. Anat. Rec. 108, 529. - 10. Follis, R. H. Jr.: (1951) Effect of Proteolytic Enzymes and Fixation on Metachromasia of Skin Collagen. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 76, 11. GOMORI, G.: (1952) Microscopic Histochemistry, Principles and Practice. Uni-272. versity of Chicago Press. Chicago. - 12. HALMI, N. S., DAVIES, J.: (1953) Comparison of Aldehyde Fuchsin Staining Metachromasia and Periodic Acid. - Schiff Reactivity of Various Tissues. J. Histochem. Cytochem. 1, 447. - 13. HARADA, K.: (1956) The Histochemical Significance of Staining Polysaccharide Sulfate Esters with Gentiana Violet. Stain Technol. **31**, 71. - 14. HEMPELMANN, L. H. JR.: (1940) Staining Reactions of the Mucoproteins. Anat. Rec. 78, 197. - 15. HOLMGREN, H., WILANDER, O.: (1937) Beitrag zur Kenntnis der Chemie und Function der Ehrlich'schen Mastzellen. Z. mikr. anat. Forsch. 42, 242. – 16. KELLY, J. W.: (1956) An Evaluation of the Metachromasy of Anionic Dyes. I. Visual Observations on Tissue Sections. Stain Technol. **31**, 275. – 17. KELLY, J. W.: (1956) An Evaluation of the Metachromasy of Anionic Dyes. II. Visual Observations on Solutions. Stain Technol. **31**, 283. – 18. KRAMER, H., WINDRUM, G. M.: (1955) The Metachromatic Staining Reaction. J. Histochem. Cytochem. 3, 227. - 19. LIEB, E.: (1947) Permanent Stain for Amyloid. Amer. J. Clin. Path. 17, 413. - 20. LILLIE, R. D.: (1954) Histopathological Technic and Practical Histochemistry, 3rd ed. Blakiston, New-York. - 21. LISON, L.: (1935) Metachromatic Dyes and Chromotropic Substances. Arch. Biol. (Liège) 46, 599. – 22. LISON, L.: (1953) Histochemie et Cytochemie Animales. Principes et Méthodes. Gauthier-Villars, Paris. – 23. Mc-MANUS, J. F. A., MOWRY, R. W.: (1958) Effects of Fixation on Carbohydrate Histochemistry. J. Histochem. Cytochem. 6, 309. – 24. MICHAELIS, L.: (1926) Metachromasie in Enzyklopedie der Technik. ed. Krause R., Urban und Schwarzenberg, Berlin. – 25. MICHAELIS, L., GRANICK, S.: (1945) Metachromasy of Basic Dyestuffs. J. Amer. chem. Soc. 67, 1212. - 26. MICHAELIS, L.: (1947) The Nature of the Interaction of Nucleic Acids and Nuclei with Basic Dyestuffs. Cold. Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 12, 131. - 27. MICHAELIS, L.: (1950) Reversible Polymerization and Molecular Aggregation. J. phys. Chem. 54, 1. – 28. PEARSE, A. G. E.: (1959) Histochemistry, Theoretical and Applied. Little Brown et Co., Boston. – 29. PERSSON, B. G.: (1953) Studies on Connective Tissue Ground Substance. Acta Soc. Med. upsalien. 58, Suppl. 1-104. - 30. PERSSON, B. H.: (1952) Histochemical Features of Ground Substance Muco-

Acta morph. tomus XIII.

48

polysaccharides II. Organisation of the Ground Substance in Ascorbic-Acid Deficiency and Its Modification by the Action of Cortisone. Acta Soc. med. upsalian 58, 120. - 31. SCHEIBE, G.: (1938) Reversible Polymerisation als Ursache neuartiger Absorptionsbanden von Farbstoffen. Kolloid. Z. 82, 1. – 32. SCHEIBE, G.: (1939) Die Stereoisomerie organischer Farbstoffe und ihr Zusammenhang mit Konstitution und Eigenschaften reversibler polymerer Farbstoffe. Angew. Chem. 52, 631. - 33. SCHEIBE, G.: (1939) Die reversible Polymerisation von Farbstoffen, ein Zustand mit neuen Eigenschaften. Ber. physiol. med. Ges. Würzburg. N. F. 63. 15. - 34. SCHILLER, S., DORFMAN, A.: (1957) The Metabolism of Mucopolysaccharides in Animals. The Effect of Cortisons and Hydrocortisone on Rat Skin. Endocrinology 60, 376. - 35. SCHILLER, S., BENDITT, E. P., DORFMAN, A.: (1952) Effect of Testosterone and Cortisone on the Hexosamine Content and Metachromasia of Chick Combs. Endocrinology 50, 504. - 36. SCHUBERT, M., HAMERMAN, D.: (1956) Metachromasia; Chemical Theory and Histochemical Use. J. Histochem. Cytochem. 4, 159. - 37. STERNRAM, U.: (1953) The Specificity of the Gallocyaninchromalum Stain for Nucleic Acids as Studied by the Ribonuclease Technique. Exp. Cell Res. 4, 383. — 38. Шубич, М. Г.: (1961) Метод элективной окраски кислых (сулфатированных) мукополисахаридон основым коричевым. Бюлл. экспер. аиол и Мед. 2, 116. – 39. Šylvén, B.: (1938) Über das Vorkommen von metachromatischer Substanz im wachsenden Gewebe und ihre Bedeutung. Klin. Wschr. 17, 1545. - 40. SYLVÉN, B., MALMGREN, H.: (1952) On the Alleged Metachromasia of Hyaluronic Acid. Lab. Invest. 1, 413. - 41. SYLVÉN, B.: (1954) Metachromatic Dye Substrate Interactions. Quart. J. micr. Sci. **95**, 327. – 42. WISLOCKI, G. B., BUNTING, H., DEMPSEY, E. W.: (1947) Metachromasia in Mammalian Tissues and Its Relationship to Mucopolysaccharides. Amer. J. Anat. 81, 1. - 43. WOLMAN, M.: (1956) A Histochemical Method for the Differential Staining of Acidic Tissue Components (Particulary Ground Substance Polysaccharides). Bull. Res. Coun. Israel E 6. 27. - 44. WOLMAN, M.: (1961) Differential Staining of Acidic Tissue Components by the Improved Bi-Col Method. Stain 21. Technol. 36, 21.

UNTERSUCHUNG DER DIE METACHROMASIE BEEINFLUSSENDEN FAKTOREN AM KNORPELGEWEBE

I. FÖLDES, L. MÓDIS und I. SÜVEGES

Bei der Untersuchung der die Metachromasie beeinflussenden histochemischen Faktoren am Knorpelgewebe der Rippen- bzw. Kniegelenke sowie an den Halsspeicheldrüsen von eintägigen weißen Ratten läßt sich durch die Änderung der drei Hauptfaktoren (Fixierung, pH, Farbstoff) folgendes feststellen:

1. Zur groben Orientierung eignet sich jeder metachromatische Farbstoff (ausgenommen Gallocyanin) nach einem beliebigen Fixiermittel und in jedem sauren Bereich.

2. Zur Beobachtung feinerer Differenzen scheinen für die histochemische Isolierung der sauren Mucopolysacchariden Thionin, Toluidinblau und Azur-bei niedrigem pH-Wert optimal zu sein, denn bei Verwendung dieser Farbstoffe erfolgen die Beta-Gamma-Verschiebungen in gegenteiliger Richtung und deshalb lassen sich die Farbeffekte der Metachromasietypen am besten beurteilen.

3. Das Gesagte gilt in erster Linie für die Histochemie des Knorpelgewebes.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФАКТОРОВ, ВЛИЯЮШИХ НА МЕТАХРОМАЗИЮ ХРЯШЕВОЙ ТКАНИ

И. ФЁЛДЕШ, Л. МОДИШ и И. ЩЮВЕГЕШ

При исследовании влияющих на метахромазию гистохимических факторов, на хрящевых тканях реберных и коленных суставов, а также на шейных слюнных железах однодневных белых крыс, изменением трех главных факторов (фиксация, pH, краситель) можно установить следующее: 1. Для грубой ориентировки пригодны все метахроматические красители (за исключением галлоцианина) после применения любого фиксирующего вещества, в любой кислой области.

2. Для наблюденния более тонких отклонений, для обособдения кислых мукополисахаридов тионин, толуидинблау и лазурь — при низкой величине рН — кажутся оптимальными, так как в случае их применения бета-гамма-сдвиги происходят в противоположном направлении, благодаря чему цветовые эффекты метахроматических типов можно лучше свего оценить

3. Сказанное относится прежде всего к гистохимии хряшевой ткани.

Dr. I. Földes

Dr. L. MóDIS Dr. I. SÜVEGES

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

MICROCINEMATOGRAPHIC STUDIES OF THE EPITHELIAL CELLS OF THE THYMUS

I. TÖRŐ, I. PÁLYI, I. CSAPÓ and L. GAZSÓ

(Received December 17, 1963)

Microcinematograph records of thymic epithelium monolayer cultures from human 5-month foetuses and newborn guinea pigs, and the enzymes involved in the digestion of the thymocytes incorporated by the epithelial cells have been examined by histochemical methods.

Observations have been made concerning the structure, motions, pinocytosis division of the epithelial cells, the formation of the epithelial plate and the arisal of Hassall's corpuscles. The mitochondriosome which develops from mitochondria is described. The epithelial cells of the thymus contain many thymocytes, alive and dead, the living ones move vigorously, partly freely, partly enclosed in vacuoles. The dead thymocytes are digested in the vacuoles, and during that acid phosphatase, nonspecific esterase and ATP-ase production is demonstrable.

The phenomena observed are discussed in correlation with the physiological activity of the thymus.

In recent years the thymus, as an organ of unclarified structure and even more obscure physiological role, has been the subject of extensive investigations. This work has gained new momentum by the discovery that thymectomy is not without sequelae, but it is followed by deficiency symptoms, atrophy, rough, unkempt fur, etc., symptoms similar to those of the so-called runt disease, which may be fatal. These symptoms are particularly marked when thymectomy is performed in foetal or newborn age. In such cases the lymph nodes do not develop [57], follicles do not appear and the body loses its ability to react immunebiologically, it does not produce antibodies. It has turned out that the thymus is the organ lending immunological reactivity, which endows the thymocytes in it with immunological competence, but these will be able to produce antibodies exclusively when they enter lymphatid tissue, where this property of theirs becomes manifest. It may also be surmised that the thymus produces some kind of immunologically important substance which reaches lymphatic tissues by the humoral route and initiates therein antibody production. Thus, the thymus is essential in the development of the immunological reactivity of the organism. In connexion with the above view it has been shown that lymphocytes become capable of producing antibodies exclusively after they had passed through the thymus. Thus, something must happen to them in that organ and it seemed interesting to investigate what is taking place in the thymus during that process and what intrinsic structure is responsible for the performance of that function. It has been pointed out several times that although the thymus appears to be a lymphatic organ, it differs in many respects from the lymphatic organs both in structure and function. Special characteristics are lent to the thymus by the fact that it is essentially of epithelial origin and has a basic reticulum composed of epithelial cells, in the interspaces of which thymocytes are present. These two kinds of cell, the epithelial reticulum and the thymocytes are closely interrelated. Some authors claim that this correlation is manifested by the fact that thymocytes arise from the epithelial cells [2, 3,], that the two kinds of cells live in symbiosis and that such metabolic changes occur in both of them as can influence the activity of either of them, as a result of which thymocytes are capable of producing immunologically important substances and transporting them to the spleen, lymphatic tissue [29,31], or producing the substance carried there by the circulation, and serve for antibody production [26].

It is also conceivable that the secretion to which the immunological importance of the thymus is due is produced not by the thymocytes, but by the epithelial cells, which then pass their product over to the thymocytes, or directly to the blood stream, and are therefore mainly responsible for the symptoms which follow thymectomy. This was the approach of OSOBA and MILLER [34], LEVEY *et al.* [25], as well as H. R. HILGARD *et al.* [16]. The latter could restore immunological competence by the injection of isolated thymocytes [59], while the former authors claim that the restoration of the immunological defect in thymectomized newborn mice is bound to the intactness of the thymic stroma.

In the studies concerned with the thymus little attention has been devoted to the epithelial cells, and there is no investigation in which these cells would have formed the focus of interest. Therefore we thought it necessary to prepare a pure thymic epithelial cell culture, to study the behaviour and function of these epithelial cells, and hoped to obtain thereby information as to the confirmation of the above trend of thoughts.

Materials and methods

Mainly human 4 to 5-months old foetuses, and thymus glands from newborn or 1 to 4 weeks old guinea pigs were used. The thymic tissue was minced, digested by the usual method for 15 minutes with trypsin in Ca and Mg-free salt solution. The epithelial cell suspension washed in a salt solution after trypsinization was applied and spread on a cover plate, and after placing in a small dish it was allowed to stand. In the course of 10 to 24 hours the cells adhered to the glass, spread out thereon, the non-adherent cells were removed by washing, the cover plate with the cells was placed in a flat glass chamber, which was filled with medium consisting of Parker's 199 synthetic media \pm 10 per cent human or bovine serum. The cultures thus obtained were kept under observation for four weeks, and the behaviour of the cells was recorded cinematographically.

Some cultures were fixed, stained with Giemsa or PAS, and subjected to histochemical reactions. They were tested for acid phosphatase, non-specific esterase and ATP-ase. The acid
MICROCINEMATOGRAPHIC STUDIES OF THE EPITHELIAL CELLS

phosphatase reaction was carried out according to BARKA with alpha-naphthyl-hexazotized pararosaniline, while esterase was estimated with alpha-naphthyl-acetate-hexazonium salt, as suggested by DAVIS and ORSTEIN

Electronmicroscopic observations were also made; these will be described in a future paper.

Observations

Behaviour of living epithelial cells

Initially, the cell suspension contained a certain quantity of thymocytes, but the number of these decreased on successive washings, then they disappeared completely. After three washings almost exclusively epithelial cells were present in the 1-week cultures; they were spread out broadly and showed 4 zones (Fig. 1). The nucleus and nucleolus are in the centre, next to them is



Fig. 1. Human thymic epithelial cell, with four zones distinguishable in it. In the centre are the nuclei, in dense central cytoplasm. This is surrounded by the zone of mitochondria, delimited by a cytoplasmic ring of granulated structure. The marginal part of the cell is similar to a homogeneous membrane

53

a dark zone, then comes the so-called zone of mitochondria, outside which there is a plasmic halo of denser structure, surrounded by a homogeneous cytoplasmic body, spread out and showing no structure, and, finally, an outer zone corresponding to the cell membrane, which may have many, fine or rough, processes, and show innumerable folds, the richness of which is correlated with the vigorous pinocytosis (Fig. 2). The epithelial cells show pinocytotic movements all over the surface. If some aspect of an isolated cell contacts another cell, the pinocytotic movements cease there as a result of the contact, and even the borders of the cells disappear there and an apparent coalescence results (Fig. 3). After a time these apparently merged cells separate again at the site of the former borders, indicating that no actual coalescence has taken place, the cells merely adhered closely to each other and then pinocytotic movements start again on the surface. The cells differ greatly in size and shape. The nuclei are big, egg-shaped, contain little chromatin, are almost empty. Cells with two or more nuclei are common. The cells contain many, rapidly moving mitochondria (Fig. 4), accumulated always in the central part of the cell and showing ant-like swarming. The mitochondria are of different size and shape. In the homogeneous, spread-out outer cytoplasm there are no mitochondria, except for single ones en route toward the surface of the cell, or on their way back. We find, however, various inclusions (Fig. 5), of which some big globes, strongly light-refractory under the phasecontrast microscope, are especially conspicuous; they later contain granules. Granules occur in isolated cells, too, but are found in particularly great masses in the areas, in which the epithelial cells form conglomerates, with a light-refractory mass (Hassall's corpuscle?) in the centre (Fig. 6). These masses are sometimes ejected from the cells. We should devote separate attention to some granules, about 20-200 times larger than the mitochondria (Fig. 7), which do not occur in every cell. They remain roughly in the same place but move vigorously their processes, as a results of which they resemble a star constantly altering its shape. In fixed preparations these structures are round and cannot be identified. The film shows that these structures arise as a result of clustering of mitochondria (Fig. 8), then after a while (the observation period did not exceed 12 hours) are scattered again. The size of these corpuscles increases, but the velocity of their motions remains almost the same.

In the centre of the cell, the many mitochondria around the nucleus move most vigorously. As a sign of a depletion of the culture medium, minute vesicles, droplets of about the same size appear among the mitochondria. The peripheral part of the cytoplasm moves with broadly undulating membranes (Fig. 9). The more the cytoplasm and that cell body contract, the more lively is pinocytosis and the motions of the fine plasmic processes (Fig. 10). The adhering cells then expand slowly make up an epithelial plate, the cells of which slow down their motions (Fig. 11, a, b) parallel with the increase of contact between them.



Fig. 2. Isolated thymic epithelial cell. In the centre is the nucleus, surrounded by a plasmic zone of intense light refraction, and this is enclosed by a contracted plasmatic ring. The marginal area of the rounded cell shows vigorous pinocytosis. The pinocytotic processes are visible as a zig-zagged zone



Fig. 3. The cell shown in Fig. 2, in a later phase. The lower part of the cell contacts another cell; here no pinocytosis occurs. The upper part of the cell rolls up from the base. This portion shows intense refraction; pinocytosis has ceased in this area, too



Fig. 4. Culture of guinea pig thymic epitheliam. Numerous mitochondrial conglomerates are visible in the epithelial cells. In the centre a spherical nucleus with many large nucleoli



Fig. 5. Thymic epithelial cell from a guinea pig, with two nuclei, many nucleoli and numerous mitochondria. The intensely light-refractory inclusions correspond to cell debris. The radial structure is due to cytoplasmic folding

The epithelial monolayer thus created has cells at the ends, which show intense movements, may become detached from the group, meanwhile they may establish contact with the other cells through single or multiple cytoplasmic bridges. The cell may detach itself partially from the base, as a result of which it shrinks, then spreads out again; this way the formation and transformation of the epithelial plate and epithelial reticulum alternate. Meanwhile, regular



Fig. 6. Portion of a human foetal thymus culture. In a big epithelial cell, masses of intensely light-refractory lipid granules are visible. Early phase of Hassall's corpuscle formation.The other cells have already begun to orient concentrically



Fig. 7. Portion of human foetal thymic epithelial culture. The cells contain many vigorously moving mitochondria. At the site marked \times there is a mitochondriosome surrounded by a light halo

mitoses are taking place (Fig. 12 a-d). In spite of the presence of numerous polynuclear epithelial cells, no amitotic division could be observed in these cultures. In the films we could often observe clasmatotic movements, always preceding the death of the cell. Such a scene is shown in the film and this agony ends with a quivering of the cell.

The spread-out epithelial cells move with broad, big undulating membranes. The round epithelial cells show pinocytotic, the spread-out ones undulating membrane motion. This motion explains how the epithelial cells come to form plates, then separate again. The perinuclear cytoplasmic mass engulfs the nucleus as a sort of capsule (Fig. 13) and often contains sharply refractory granules.

Production of secretion by the epithelial cells (Fig. 14. a-e) begins with the formation of a confluent mass around the thymocyte, which ultimately completely engulfs the thymocyte. We have not succeeded in following up completely how the thymocyte comes inside the cell. There are single big epithelial cells with drop inside them, but which contain no thymocytes. The drops appear in increasing numbers, the larger ones merge (Fig. 15, a, b, c, d). To many epithelial cells or islets of epithelial cells living or dead thymocytes



Fig. 8. Part of human foetal thymic epithelial cell culture. Four-day appearance. The centre of the cells shows intense refraction. At \times there is a large vigorously moving extracellular mitochondriosome



Fig. 9. Part of a guinea pig culture. Overlapping spread out epithelial cells are visible. The large nucleus is surrounded by mitochondria. The spread-out cytoplasms move by means of flaglike waving undulating membranes

adhere, and some of these enter the epithelial cells. In all likelihood, thymocyte and cytoplasm interact so that ultimately the living thymocyte may penetrate in the cell. It is also conceivable that dead thymocytes are carried into the cell by the undulating membranes. Inside the epithelial cells with one or more nuclei we may find live (Fig. 16_2) or dead (Fig. 16_5) thymocytes. Some of these move vigorously in the cytoplasm, pushing aside the nuclei (Fig. 16_1) and in all likelihood they may leave the cell. This, however, could not be observed, because of the difficulties of keeping everything in focus (Fig. 16). Some thymocytes are enclosed in vacuoles (Fig. 16_3), moving about inside them, as if trying to find the way out. There



Fig. 10. Individual cells from a 10-day culture of guinea pig thymic epithelium. The zones shown in Fig. 1 can be distinguished inside the cells. As a result of undulating membrane movement, the cells filled with mitochondria are of various shapes

is a scene showing a thymocyte actually finding it (Fig. 16_4). This thymocyte passes through the wall of the vacuole, thinning out, like diapedesing crythrocytes do. Thus, there are living cells without vacuole and living cells enclosed in vacuoles. The dead thymocytes are always surrounded by a digestive vacuole (16_5) where the nuclei are gradually digested. In some cases crescent-shaped residues are left behind (16_6), in others nuclear shadows remain, the nuclear membrane being the last to fall victim to digestion. Around the thymocytes under digestion we often find accumulations of a strongly light-refractory substance.



Fig. 11a. 12-day culture of human foetal thymic epithelium. In some areas the cells are grouping to form the anlage of Hassall's corpuscle

Fig. 11b. Epithelial monolayer culture. The cells contact one another with their marginal areas, and therefore cell movements have slowed down. There is less movement intracellularly, too. Where the cell margins separate, movement begins again. 1: Nucleus. 2: Mitochondrium. 3: Mitochondriosome



Fig. 12. Mitoses in thymic epithelial cells from a human foetus. 14-day culture. a = anaphase, b = telephase, c = 1. End of metakinesis. Even during mitosis thick cytoplasmic processes (4) protrude from the dividing cells. 2. Termination of cell division (not in focus). 3. Mitochondriosome. d = 1. Prophase. 2. Onset of division. The cell is not in focus. 4. Clumsy cytoplasmic process

As long as the thymocytes are present in larger numbers, mitosis seldom occurs, although the number of cells is increasing. As thymocytes are being washed out, just as fast the number of mitotic epithelial cells increases, sometimes several of them appearing in one field (Fig. 12). This begins on the 5th day of cultivation. Then they rapidly increase in number and, expanding all over the surface of the glass, form the epithelial reticulum. There is a constant ncrease in the number of cells producing spread-out or ramifying membrane-

61



Fig. 14. Appearance of thymic epithelial cellular secretion in human foetal thymic epithelial culture. Secretion is formed in areas marked 3. At a, b, c, d and e secretion begins around the live thymocyte in the cell and ultimately engulfs it completely

- 1. Two nuclei with two nucleoli each.
- 2. Living thymocyte in epithelial cell.
- 3. Secretion.
- 4. Cell containing secretion, with formation of Hassall's corpuscle beginning around it





Fig. 13. Two thymic epithelial cells from a guinea pig. The cytoplasm around the nucleus encloses it like a capsule
Fig. 15. Culture of guinea pig thymic epithelium. Four phases of a cell with secretory activity.
1. Many droplets of secretion, the cell is contracted. 2. The number of droplets has increased.
3. The droplets merge. 4. The secretion in big drops fills the centre of the cell, the cell has expanded; pinocytosis at the margin (black marginal areas)



like structures. The spread-out cytoplasm is light, homogeneous, and shows fine, fanlike fibrils (Fig. 17).

Following up the process of thymocyte digestion by histochemical methods, in the 7-day culture the acid phosphatase reaction is positive in the area corresponding to the digestive vacuole (Fig. 18), enzyme reactions are positive



Fig. 17. Human foetal thymic epithelial culture. 1. Nuclei of epithelial cells. 2. Nucleoli of variable shape. 3. Radial fibrils in the cytoplasm

in the wall of the vacuole (Fig. 19), as well as in the perinuclear cytoplasm in the 24-hour guinea pig thymic epithelium culture, especially around the phagocyted cell. Here the enzyme is found in the form of granules (Fig. 20). With the esterase reactions we found the enzyme located in the cytoplasm of the thymic epithelial cells; from there it penetrates into the vacuole and fills this completely (Fig. 21). The digestive vacuole is at first small, embraces tightly the phagocyted cell, but later it increases in size; meanwhile, the posi-

Fig. 16. Polynuclear thymic epithelial cell from a human foetal culture. Three pictures from a cinematographic record. Many thymocytes are present in the epithelial cells. 1. Nucleus of epithelial cell. 2. Living thymocyte in cytoplasm. 3. Living thymocyte in a vacuole. 4. Thymocyte sneaking across the wall of the vacuole. 5. Dead thymocytes in digestive vacuole. 6. Thymocytes in different stages of digestion. Thymocytic residues. 7. Mitochondria moving rapidly



Fig. 18. Positive acid phosphatase reaction in the digestive vacuole of an epithelial cell of a human thymus. The thymocyte is visible in the vacuole. 1. Thymocyte. 2. Wall of vacuole Fig. 19. Acid phosphatase reaction in a digestive vacuole. Positive reaction in the wall of the vacuole. In the vacuole a thymocyte is visible. 1. Wall of vacuole. 2. Nucleus. 3. Nucleolus of thymocyte. 4. Nucleus of epithelial cell, with nucleolus

Fig. 20. Culture of guinea pig thymic epithelium. Acid phosphatase reaction. Perinuclearly the cytoplasm is filled with granules of enzyme

Fig. 21. Thymic epithelial cell of a guinea pig, with vacuole filled with enzyme (1). Non-specific esterase reaction

Fig. 22. Human thymus. Digestive vacuole in an epithelial cell, the cell is not visible any longer. Positivity is stronger in the cytoplasm than in the vacuole. Acid phosphatase reactionFig. 23. Ten-day monolayer culture of guinea pig epithelium. In the cell a digestive vacuole filled with enzyme. ATP-ase reaction

tivity decreases in the enzyme-bearing digestive fluid. Fig. 22 shows a big vacuole in the epithelial cell after digestion, with weaker positivity. ATP-ase, too, could be demonstrated in the epithelial cells (Fig. 23).

Discussion

According to BURNET, at birth such progenitors of cells are present, which are sensitive to foreign antigens, but not to auto-antigens. In postnatal life the extrinsic antigen seeks selectively the appropriate stem cells, but does not participate in the formation of new antibody-producing cells. According to BURNET's theory, a process of selection is required to sort out the cells capable of producing cells reacting with exogenous antigens, and these are separated from the cells which produce antibodies when coming into contact with autoantigens. The separation is a result of somatic mutation, and the latter cells perish during intrauterine life. In postnatal life "forbidden" clones may persist or may arise; these are active against the cell components of the "self" and give rise to autoallergic reactions. The thymus is the site, at which the elimination or persistence of these is decided, and wherefrom such cells are transported to immunologically active areas [31]. It is advantageous for the organism when this distributor organ is inactivated after birth. (Thymectomy leads to a cessation of antibody production.) There is a homeostatic control in the thymus, inhibiting the maturation of immunologically competent cells; developing from ones not fitting into the pattern of the normal homeostatic control causes a manifestation of autoimmune disease [29].

Thus, according to this theory the thymus has the decisive role in the organism's immunebiology [30], and the mechanism of its function may be understood when the cells in it are properly evaluated. From this point of view, the thymic parenchyma is composed of two types of cell, the thymocytes and the reticulum cells. These two are different from each other not only morphologically, but also physiologically, although there is evidence to indicate that they are genetically related: the thymocytes namely differ from lymphocytes [24] and arise from the reticulum cells, and so they are of epithelial origin [2, 3, 4, 22, 37, 49, 50, 51]. In our investigations we could not observe during the 2-week period of observations the arisal of thymocytes from mitosing reticulum cells, as described by HILL in the case of splenic reticulum [17] and by MURRAY [33] in the case of the thymus. We must analyze the reticulum cells and the thymocytes, if we want to study the mechanism of thymic function [34, 26].

The analysis illustrated by motion pictures served to focus attention on the reticulum cells. Hitherto, no amitosis could be demonstrated in living cultures by microcinematography, although amitotic forms were found in considerable numbers in stained Maximow preparations. In the early phase of cultivation we could not observe mitoses, but from the 5th day of growth on they could be found abundantly. The statement that the number of mitoses increases as fast as rapidly the thymocytes disappear from the culture suggests that the presence of thymocytes inhibits the mitosis of reticulum cells [20].

5*

This is in harmony with the finding that thymic extracts inhibit the growth of tissue cultures. Thus, within the thymus an equilibrium exists between the two kinds of cells, determining their relative numbers [2, 37]. This results also in vivo, when in response to different kinds of stress the thymocytes are evacuated and the reticulum cells increase in number. The older the individual, the less is the number of thymocytes. As it was shown in our earlier investigations [7, 8, 9, 10, 49, 50, 54], too, in such cases the reticulum cells contain a PASpositive substance and lipid granules [17, 44]. TAKASHI et al. [45] described in the thymus medulla reticular cells a PAS-positive spherical structure, in which the PAS-positive substance often diffusely fills the cell; these showed no metachromasia, did not stain with Sudan Black B [46]. In our cultures the lipid granules showed the same distribution as the mitochondria and were found perinuclearly. It was astonishing that the cells should be so rich in mitochondria, because neither we, nor others have found this in electron microscopic studies [46]. The ample mitochondrium content of the reticulum cells is indicative of a great demand for oxidative enzymes, which suggests a vigorous cellular activity. We have been unable to find evidence in the literature relative to the phenomenon we have observed in the reticulum cells. The mitochondria moving about intensely cluster to form vigorously moving corpuscles. These may further increase in size, as further mitochondria adhere to them. After they have adhered to one another, the mitochondria in the corpuscles thus produced move uniformly as a homogeneous body, and emit alternating processes into different directions. These corpuscles, the mitochondriosomes, may also leave the cell, and continue to move extracellularly, just as they were moving intracellularly. They continued to perform this vital function throughout the 10 to 12 hours of observation. The significance of these corpuscles requires further investigation because they might play some role in the immunebiological competence of thymic tissue.

The secretion appearing in the epithelial cells proved to be identical with the PAS-positive mucopolysaccharide we and others described to occur in the thymus [9, 27, 28, 48, 49, 50], in Hassall's corpuscles and cysts. The production of this secretion proves that the thymus has a glandular function. The theories concerning thymic function consider the thymocytes to be such cellular factors, as carry by way of the blood stream the informations to other, first of all lymphatic organs, forcing the cells there to produce antibodies [14, 31, 39] or, else, they seek some humoral factors in the thymus, which, as a secretion of the gland [1, 5, 6, 15, 26, 30, 34, 43] is transferred like a hormone into the circulation, whence it is carried away in the thymocytes. The secretory activity visible in the film lends support to the humoral theory, only it is unclear whether the secretion is transported away directly, or in a converted form in the thymocytes. The existence of an active thymic substance is supported also by the data in the literature concerning the extraction of substances from

the thymus capable of influencing the number of thymocytes circulating in blood [5, 6, 26]. But other extracts have also been prepared, for instance extracts acting on the metabolism of muscle [38], on the transformation of macrophages [23], on the growth of frog larvae [42], on the metamorphosis of amphibia [36], on the regeneration of tissues [18], on the genesis of neoplasms [18, 19, 22].

Our investigations indicate that the glandular activity of the thymus is performed by the reticular epithelium and that this kind of cell may be the target of the various endocrine glands. Our earlier observations, too, indicated that in response to various hormones, after the production of the PAS-positive substance the epithelial cells cluster and form Hassall's corpuscles [47, 48, 53]. The epithelial cells of which the Hassall's corpuscles are composed are viable, because Hassall's corpuscles can be grown in tissue cultures [35], the cells multiply and grow [12]. These investigations are the more interesting, since separate extracts have been prepared from the thymocytes and the reticulum cells [15].

A further interesting aspect of the film is the fate of thymocytes found in the epithelial cells [11, 17, 55, 58].

We did not succeed in observing the passage of thymocytes through the cell membrane, but we did observe that in certain cases they may leave the cell. This means that here we deal with an active thymocytic function, a mechanism different from phagocytosis. The active, rapid movements of the thymocytes inside the cell indicate that the cytoplasm is not dense; in it not only the thymocyte can move about rapidly, but it can easily push the nucleus from one place to another in the cell. The passivity of the nuclei is particularly conspicuous; it is manifested with changes in shape and structure alike. In cultures, just like *in vivo*, a spreading-out of the cell indicates inactivity and its contraction indicates activity. The two types observed electron microscopically by TAKASHI ITO *et al.*, the reticular and the hypertrophied types may correspond to the contracted and spread-out reticular cell formations.

The intracellular vacuoles develop always secondarily, the primary change is invariably the appearance of thymocytes in the cytoplasm. It is not a precondition of vacuole formation that the thymocyte should be dead, vacuoles arise around living thymocytes, too. However, the digestive enzyme is produced when the vacuole has already developed. One epithelial cell can incorporate and digest several thymocytes. This cannibalism is always correlated with the activity of the epithelial cell and therefore an epithelial cell packed with thymocytes is indicative of thymic activity, also *in vivo*. The decomposition of the nucleus makes it doubtless that nucleic acids are broken down in the thymus and the building stones required for the excessive neogenesis, manifesting itself with an increased number of mitotic forms during regeneration, are supplied by the thymus itself. This assumption is supported by

the extremely high incorporation of P^{32} into the thymus. This high rate of nucleic acid catabolism and synthesis is in all likelihood correlated with the immunebiological competence of the thymus. The inhibitory action exerted by the thymocytes on the growth of epithelial cells indicates that in the thymocytic environment the epithelial cells are prepared to digest the former. It has been demonstrated that the thymus contains acid and alkaline phosphatase in the mouse, cholinesterase in man, 11-hydroxy-dehydrogenase in the mouse, alkaline glycero-phosphatese in the rat, ATP-ase in the mouse, succinate dehydrogenase and succinate tetrazolium reductase in the mouse [21, 40, 41].

The enzyme histochemical studies yielded results which were in absolute agreement with those obtained in digestion tests on unicellular organisms [32]. In our cultures the same enzymes were involved in the process of cell digestion, as in the unicellular organisms [13]. Although here the investigations have not been extended to the details studied in the case of one-celled organisms, the mechanisms seem to be astonishingly identical.

The thus far elucidated properties of the thymus are correlated with the mechanism that in response to stress or certain physiological effects the thymocytes leave the thymus and the epithelial cells stay therein [10]. During regeneration new thymocytes re-populate the thymus. Thus, the thymocytes come and go all the time, while the epithelial cells constitute the stem cells of the organ. Just because of this the epithelial cells are the histological representants of the characteristic thymic function. These epithelial cells have been shown to be grossly similar to other epithelial cells, but differ from them in that they move with big, broad, undulating membranes, show vigorous pinocytosis, and have a peculiar internal structure. Unlike in Maximow cultures which contain many amitotic forms [52], by our method only mitotic forms could be demonstrated. After a while in the epithelial cells variable amounts of lipid appeared and continued to increase in quantity; this lipid was seen first of all around the nucleus, but might fill the cell as a whole. Other authors, too, observed light-refractory granules in thymic cultures [33, 56, 58]. We have not seen any conversion of thymocytes to histiocytes [37]. Our twoweek cultures contained no thymocytes and we have not seen the transformation of epithelial cells to macrophages [56]. On the 10th day of cultivation, when the cells had already stuck together to form tissue, desmosomes develop at the sites where the cells are in contact with one another.

Further studies on isolated thymic epithelial cell cultures are in progress.

REFERENCES

1. ARNESEN, KR.: (1958) The Secretory Apparatus in the Thymus of Mice. Acta path. microbiol. scand., 43, 339–349. – 2. AUERBACH, R.: (1960) Morphogenetic Interaction in the Development of the Mouse Thymus Gland. Develop. Biol., 2, 271–283. – 3. BALL, W. D., AUERBACH, R.: (1960) In Vitro Formation of Lymphocytes from Embryonic Thymus. Exp. Cell Res., 20, 245–247. – 4. BURNET, F. M.: (1963) The Thymus and Immunity. Canad. med.

Ass., 88, 42-43. - 5. Comsa, J. and M. A. BEZSOROFF: (1959) Origin of the Supposed Thymus Hormone. Acta Endocr., 30, 621-624. - 6. COMSA, J. and LEROUX, H.: (1956) Influence of a Highly Purified Thymus Extract upon the Adrenals of Guinea Pigs. J. Endocr., 13, 7-10. 7. CSABA, Gy., TÖRŐ, I., ÁCS, TH, KISS, F. I.: (1960) Behaviour of the Thymus in Conditions Associated with Tissue Proliferation. Acta morph. Acad. Sci. hung., 9, 187-196. - 8. CSABA, GY., TÖRŐ, I., KAPA, E.: (1960) Provoked Tissue Reaction of the Thymus in Tissue Culture. Acta morph. Acad. Sci. hung., 9, 197-202. - 9. CSABA, GY, TÓTH, G., TÖRŐ, I., ÁCS, Th., CSÁKI, L.: (1961) Role of the Thymus in Polysaccharide Metabolism. Nature (Lond.), 192, 1304-1305. - 10. Csaba, Gy., Törő, I., Ács, Th., Horváth, C., Mold, K.: (1962) Thymus and Stress, J. Endocr., 23, 423-431. - 11. ENMART, E. W.: (1936) A Study of the Histogenesis of the Thymus in Vitro. Anat. Rec., 66, 59-73. - 12. FLAUM, E. G.: (1963) Activity Manifestations of Hassall's Corpuscles In Vitro as Revealed by Cinematography. Z. Zellforsch., 59, 479-485. - 13. FRIEDMANN, L. R.: (1962) A Study of Normal and Malignant Thymus Tissue of the Teleost Astyanax Mexicanus in Tissue Culture. Bull. Amer. Mus. nat. Hist., 124, 73-100. - 14. HARRIS, J. E., FORD, C. E.: (1963) The Role of the Thymus; Migration of Cells from Thymus Grafts to Lymph-Nodes in Mice. Lancet, 1, 389-390. - 15. HERRANEN, A., BRUNKHORST, V. K.: (1962) Differential Extraction of Lymphocytic and Reticulum Cell Fraction from Thymus. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 111, 642-644. - 16. HILGARD, H. R., YUNIS, E. J., SJODIN, K., MARTINEZ, Č., GOOD, R. A.: (1964) Reversal of Wasting in Thymectomised Mice by the Injection of Syngenic Spleen or Thymus Cell Suspensions. Nature, (Lond.) 202, 668-670. - 17. HILL, M.: (1959) Re-Utilization of Lymphocyte Remnants by Reticular Cells. Nature, (Lond.) 183, 1059-1069. - 18. HIRSCH, B. B., BROWN, M. B., NAGAREDA, C. S., KAPLAN, H. S.: (1956) Comparative Activity of Isologous vs. Homologous or Heterologous Mouse Bone Marrow in Promoting Regeneration of the Irradiated Mouse Thymus. Radiat. Res., 5, 52-57. -– 19. HOEPKE, H.: (1958) Hemmung des Wachstums von Walker-Tumoren der Ratte durch Thymus Trocken-Zellen. Z. mikr. -anat. Forsch., 64, 159-167. - 20. JUNICHI, M.: (1947) Influence of the Extracts of Several Kinds of Endocrine Organs Upon Propagation of Cells in Culture. Dobutsugoshi Zasski Zool. Mag., 57, 108-110. -21. KAHRI, A. L., HAN-NUKSELA, M.P., KARAHARJU, E. O.: (1963) Succinate Tetrazolium Reductase Activity in the Developing Rat Thymus. Acta endocr. (Kbh.) 42, 564-570. - 22. KIRSCHBAUM, A., LIEBELT, A. G.: (1955) Thymus and the Carcinogenic Induction of Mouse Leukaemia. Cancer Res., 15, 689-692.-23. KOSTOWIECZKI, M.: (1962) Influence of Thymocyte Emigration on the Septal Macrophages and Fat Cells. Z. mikr. - anat. Forsch., 68, 627-642. - 24. KOSTOWIECKI, M., ASHMANN, J.: (1963) Thymocyte and Lymphocyte Differentiation Studied by Means of Acridine Orange, Fluorescence Microscopy. Z. Zellforsch., 61, 605-621. - 25. LEVEY, R. H., TRAININ, N., LAW L. W.: (1963) Evidence for Function of Thymic Tissue in Diffusion Chambers Implanted in Neonatally Thymectomized Mice. J. nat. Cancer Inst., 31, 199-217. - 26. METCALF, D.: (1958) The Thymic Lymphocytosis-Stimulating Factor. Ann. N. Y. Acad. Sci., 73, 113-119. 27. METCALF, D., ISHIDUTA, M.: (1961) Periodic Acid Schiff Positive Giant Cells in the Mouse Thymus Cortex. Nature, (Lond.) 191, 305. - 28. METCALF, D., ISHIDATE, M. jr.: (1962) PAS-Positive Reticulum Cells in the Thymus Cortex of High and Low Leukaemia Strains of Mice. Aust. J. exp. Biol. med. Sci., 40, 57-71. - 29. MILLER, J. F. A. P.: (1959) Role of the Thymus in Urine Leukaemia. Nature, (Lond.) 183, 1069. - 30. MILLER, J. F. A. P.: (1962) Immunebiological Significance of the Thymus of the Adult Mouse. Nature, (Lond.) 195, 1318-1319. - 31. MILLER, J. F. A. P. (1963) Immunity and the Thymus. Lancet, 2, 43-45. - 32. MÜLLER, M., Törő, I.: (1963) Fine Structure and Enzyme Activity of Protozoan Food Vacuoles. CIBA Found. Symp. on Lysosomes, Churchill, London. Pp. 201-216. - 33. MURRAY, R. G.: (1947) Pure Cultures of Rabbit Thymus Epithelium. Amer. J. Anat., 81, 367-412. - 34. OSOBA, D., MILLER, D. E. A.: (1963) Evidence for a Humoral Thymus Factor Responsible for the Maturation of Immunebiological Faculty. Nature, (Lond.) 199, 653-654. - 35. PÁLYI, I., KAPA, E.: (1961) Über das Verhalten der Hassall'schen Körperchen nach Röntgenbestrahlung. Acta morph. Acad. Sci. hung., 10, 127-135. - 36. POHLAND, H. L.: (1962) Die Wirkung von Thymuswirkstoffen auf Wachstum und Metamorphose, sowie deren Einfluss auf endocrine Drüsen bei Xenopus laevis Daudin. Wilhelm Roux' Arch. Entwickl. - Mech. Org., 153, 621-663. - 37. POPOFF, N. W.: (1927) The Histogenesis of the Thymus as Shown by Tissue Cultures. Arch. exp. Zellforsch. 4, 395-418. - 38. Рова, А., Аввана́м, А., Тома, V.: (1961) The Aminoacid Component of the Thymus Extract CIF and the Action of this Extract Upon the Protein Metabolism in the Diaphragm of the Rat. Stud. Cercet. Biol., 12, 127-133. - 39. SAINTE-MARIE, G., LEBLOND, C. P.: (1958) Tentative Pattern for Renewal of Lymphocytes in Cortex of the Rat Thymus. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 97, 263-269. - 40. Sмith, Ch.: (1961) Studies on the Thymus of the Mammal. XII. Histochemistry of the Thymuses of C. 57. BI/6 and AKR Strain Mice. J. nat. Cancer Inst., 26, 389-404. - 41. SMITH, CH., WHARTON, T. J., GERHARDT, A. M.: (1958) Studies on the Thymus of the Mammal. XI. Histochemical Studies of Thymus,

Spleen. Lymphnode in Normal and Irradiated Mice. Anat. Rec., 131, 369-388. - 42. SCHNEI-DER, L.: (1957) Beeinflussung des Wachstumes durch im Thymus enthaltene Stoffe. I. Herstellung fraktionierter Thymusextrakte und ihre Prüfung in Kaulquappentestversuchen. Wilhelm Roux, Arch. Entwickl.-Mech., Org. 149, 644-683. - 43. SZENBERG, A., WARNER, N. L.: (1962) Dissociation of Immuniological Responsiveness in Fowls with a Hormonally Arrested Development of Lymphoid Tissue. Nature, (Lond.) 194, 146–147. – 44. TAKASHI, I.: (1959) Über einschlusshältige Zellen im Thymus des Goldhamsters. Z. Zellforsch. 49, 739–747. – 45. TAKASHI, I., TAKASHI, H.: (1962) Histological Changes of the Mouse Thymus during Involution and Regeneration Following Administration of Hydrocortisone. Z. Zellforsch 56, 445 464. 46. TAKASHI, H.: (1963) Electron Microscopic Studies of the Epithelial Reticular Cells of the Mouse Thymus. Z. Zellforsch., 59, 513-529. 47. Törő, I.: (1957) Contribution à l'histophysiologie du thymus. C. R. Soc. Biol. (Paris) **92**, 1312–1325. – 48. Törő, I.: (1957) Histologische Beiträge zur Funktion des Thymus. Verh. Anat. Ges. **54**, 294–304. – 49. Törő, I.: (1958) Beiträge zur Biologie des Thymus. In Memoriam Methodi Popoff, Bulgarian Aca-demy of Sciences, Sofia, Pp. 253–260. – 50. Törő, I.: (1961) Cytology of the Thymus Gland. Folia. biol., 7, 145–149. – 51. Törő, I.: (1961) A thymuskutatás időszerű kérdései. Morph. és Ig. Orv. Szemle (Budapest) 1, 6-17. - 52. Törő, I.: (1963) Amitotic Division of the Nuclei and Endocytogenesis. Morfol. norm. si pat. 8, 29-38. - 53. Törő, I., Aros, B.: (1958) Die Gewebsreaktion des Thymus auf verschiedene Einwirkungen, Acta morph. Acad. Sci. hung., 8, 151-171. - 54. Törő, I., CSABA, GY.: (1960) Thymus und Mastzellen. Anat. Anz. 106/1107, Erg. Heft. 349-357. - 55. TROWELL, A. O.: (1949) Intracellular Lymphocytes in Thymus Reticular Cells and in Fibroblast Cultured In Vitro. J. Physiol., (Lond.) 110, 5. - 56. TSCHAS-SOWNIKOW, N.: (1927) Über die in vitro-Kulturen des Thymus. Z. exp. Zellforsch., 3, 250-276. 57. WAKSMANN, B. H., ARNASON, B. G., JANKOVIC, B. D.: (1962) Role of the Thymus in Immune-Reactions in Rat. III. Changes in the Lymphoid Organs of Thymectomized Rats. J. exp. Med., 116, 187-206. - 58. WASSIN, A. L.: (1915) Beobachtungen an Thymuskulturen in vitro. Anat. Hefte, 62, 277-318. - 59. YUNIS, E. J., HILGARD, H., SJODIN, K., MARTINEZ, C., GOOD, R. A.: (1964) Immunological Reconstruction of Thymectomized Mice by Injections of Isolated Thymocytes. Nature, (Lond.) 201, 784-786.

MIKROKINEMATOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNG DER EPITHELZELLEN DER THYMUSDRÜSE

I. TÖRŐ, I. PÁLYI, I. CSAPÓ und L. GAZSÓ

Verfasser stellten von den einschichtigen monolayer Epithelzellkulturen der Thymusdrüsen von 5 Monate alten humanen Fötussen und neugeborenen Meerschweinchen Mikrofilmaufnahmen her und untersuchten die an der Verdauung der durch die Epithelzellen inkorporierten Thymozyten beteiligten Fermente mit Hilfe von histochemischen Methoden.

Untersucht wurde die Struktur, die Bewegungen, die Pinozytose, die Teilung der Epithelzellen, die Herausbildung des Epithelblattes und die Entstehung der Hassalkörperchen. Das sich aus den Mitochondrien entwickelnde Mitochondriosom wird beschrieben. Die Epithelzellen der Thymusdrüse enthalten zahlreiche lebende und tote Thymozyten, die lebenden Thymozyten bewegen sich lebhaft, zum Teil frei, zum Teil aber in Vakuolen eingeschlossen. Die toten Thymozyten werden in den Vakuolen verdaut; während des Verdauungsprozesses kann die Synthese von saurer Phosphatase, nichtspezifischer Esterase und ATP-ase nachgewiesen werden.

Die beobachteten Erscheinungen werden im Zusammenhang mit der physiologischen Funktion der Thymusdrüse besprochen.

МИКРОКИНЕМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЗОБНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

И. ТЁРЁ, И. ПАЙИ, И. ЧАПО и Л. ГАЖО

Авторы изготовляли микрокинематографические снимки мономолекулярных культур эпителия зобной железы пятимесячных человеческих плодов и новорожденных морских свинок. Они исследовали также гистохимическими методами энзимы, участвующие в пищеварении тимоцитов, включенных в состав эпителиальных клеток.

Наблюдения распространились на структуру, движения, пиноцитоз и деление эпителиальных клеток, на образование эпителиального листка и на появление Гассалевых телец. Дается описание митохондриосома, образующегося из митохондриев. Эпителиаль-

ные клетки зобной железы содержат много тимоцитов, живых и некротических; живые тимоциты энергично передвигаются, отчасти свободно, но отчасти они включены в вакуоли. Мертвые тимоциты перевариваются в вакуолях, причем в течение процесса пищеварения можно выявить продукцию кислой фосфатазы, неспецифической эстеразы и АТФ-азы. Вышеприведенные явления обсуждаются в связи с физиологической функцией зобной железы.

Prof. Dr. I. Törő Dr. IRÉN PÁLYI Dr. I. CSAPÓ Budapest, IX. Tűzoltó u. 58., Hungary Dr. L. Gazsó



PATHOLOGIC CHANGES IN THE PACINIAN CORPUSCLES AROUND THE PANCREAS

M. SELLYEI and J. BALÓ

(Received March 4, 1963)

Pacinian corpuscles of normal size have been found around the pancreas in 35 cases. Enlargement and accumulation of such corpuscles have been observed in 3 additional cases. Enlargement involves the swelling of the concentric capsules of which the structures are composed, further an increase in the number of the capsules and the inner cylinders. Groups of enlarged pacinian corpuscles at sensory nerve-endings may be regarded as tumorous hyperplasia. Animal experiments have shown that hyperplasia of the corpuscles may develop into tumorous growth. Acinously grouped pacinian corpuscles in humans seem to correspond to RIGDON's experimentally induced tumours.

Introduction

The pacinian corpuscles (corpuscula lamellosa) are the largest nerve endings in the human organism. They have a length of 0.5 to 3.0 mm and occur in many parts of the body, e.g. in the loose connective tissue of the palm and the sole, in the external genital organs, in the adventitia of the vessels of the limbs, in the mesentery, around the pancreas, etc. The encapsulated sensory nerve-endings are surrounded by the concentric lamellae.

VATER [35] was the first to describe the corpuscles in 1747 but his report remained unheeded, and the structures in question did not receive attention until PACINI's report [17] a century later. HERBST [12], a contemporary of PACINI, recognized these corpuscles as nerve-endings. Opinions regarding their role and the stimulus they respond to are still controversial. Some authors assume that the pacinian corpuscles respond to mechanical impulses and convey the sensations of depth and pain [1, 11, 15, 23]; others suggest that they are involved in the regulation of blood and lymph circulation [4, 5, 9, 16, 26, 27, 30]. During operations under local anaesthesia, RAMSTRÖM [22] exposed the pacinian corpuscles of the parietal peritoneum to mechanical and thermal impulses. The patients did not feel them, whereas they immediately reported the stimulation of the corresponding skin area. RAMSTRÖM does not, therefore, admit that the pacinian corpuscles represent pressure and heat receptors. HUNT and TAKEUCHI [13] removed the pacinian corpuscles together with the afferent nerve fibre from the mesentery of cats. They found that the nonmedullated fibres continued to conduct impulses even after the detachment of the capsule from the inner cylinder.

M. SELLYEI and J. BALÓ

VIRCHOW [36] regarded the retroperitoneal pacinian corpuscles on the posterior aspect of the pancreas as pathologically hypertrophied nerve endings. He observed them mostly in the cadaver of mentally deranged persons. Pacinian corpuscles in the vicinity of the pancreas were described by several authors at the end of the last and the beginning of the present century [7, 10, 20, 21]. The development of pacinian corpuscles in the retroperitoneum was studied by TAKASHI [32], in the fingers by CAUNA and MANNAN [6]. According to them, the corpuscles first appear in the embryo measuring 14 to 28 cm, and are sometimes mature already one and a half years after birth. They grow most intensively during the first postnatal years and reach a length of 2 to 4 mm in adults. The way in which the corpuscles develop is either the formation of new lamellae on the surface or a retrograde growth of the inner cylinder and the surrounding lamellae along the efferent nerve fibre. The latter phenomenon explains why the axon has no myelin sheath in the central cylinder of young persons, while — with advancing age the myelin sheath penetrates into the corpuscle [5].

ANDREJEW [2] demonstrated in the cat that the pacinian corpuscles of the abdominal cavity received their myelinated fibres from the splanchnic nerves. SARNOFF and YAMADA [26] showed that decrease of blood pressure in the abdominal cavity of cats elicited increased cardiac activity and increased arterial pressure, whereas hypertension produced an opposite effect. According to these authors, changes in abdominal blood pressure are registered by the pacinian corpuscles.

The size and number of the pacinian corpuscles on the posterior pancreatic surface of humans, further in the adventitia of the portal vein and its branches are variable. A length exceeding 4 mm is in any case pathologic. Corpuscles of such length were encountered in the subcutaneous connective tissue of the sole [23] and behind the pancreas [7, 10, 20, 31]. The enlargement of pacinian corpuscles behind the pancreas was regarded by some authors as due to oedematous swelling.

The present paper will discuss cases in which a considerable enlargement and accumulation of lamellated nerve-endings were observed around the pancreas of human subjects.

Observations

Enlarged pacinian corpuscles are greyish translucent vesicles containing one or more white fascicles (Figs. 1, 2). We encountered normal pacinian corpuscles in the cadaver of 35 subjects who had died of different diseases. The corpuscles were usually found on the posterior aspect of the pancreas, further along the splenic artery and the portal vein. Four to eight and even more scattered such corpuscles can always be found in lean cadavers, whereas



Fig. 1. Four enlarged pacinian corpuscles on the posterior aspect of the pancreas. The inner cylinder is well distinguishable. There are two such cylinders in the largest corpuscle. Natural size



corpuscles of normal size seldom occur in accumulated adipose tissue. Smaller corpuscles are like rice-grains, larger ones are spherical or oval.

It was in 3 cases that we found particularly large or an excessive number of pacinian corpuscles.

Case No. 1. Female, 69 years of age. Post-mortem diagnosis: diabetes mellitus; intercapillary glomerulosclerosis. Six pacinian corpuscles were found on the posterior surface of the pancreas, the longest measured 9 mm (Fig. 1).

Case No. 2. Male, 76 years. Post-mortem diagnosis: penetrating duodenal ulcer; circumscribed chronic peritonitis. About 30 pacinian corpuscles, arranged in several groups, were found on the posterior surface of the head of the pancreas and in the lesser omentum. The longest corpuscles measured from 4 to 6 mm (Fig. 2).



Fig. 2. Slightly enlarged pacinian corpuscles on the posterior aspect of the pancreas and in the lesser omentum

Case No. 3. Male, 51 years. Post-mortem diagnosis: acute alcoholic intoxication. The pituitary contained a peanut-sized cyst. Arranged in an acinose pattern, about 20 pacinian corpuscles were situated behind the head of the pancreas. The longest corpuscles reached 3 to 4 mm (Fig. 3).

The pacinian bodies were fixed in formalin, embedded in paraffin and stained with haematoxylin-cosin, van Gieson's stain and Gomori's silver impregnation. The inner cylinder appeared to the naked eye as a white bundle; histological examination revealed a few cell nuclei therein. It was surrounded by capsules consisting of peripheral lamellae and loosely packed fine interlamellar fibres; the gaps were filled with fluid (Figs. 3, 4). Adjacent lamellae were so close that they appeared as a single lamella. It was only in exceptional cases that — as in Fig. 5 — there was a gap between two adjacent lamellae. Spindle-shaped or oval cell nuclei were seen on their surface. The number of capsules per corpuscle varied from 10 to 40. They were usually narrower around the inner cylinder, so that the lamellae lay next to one another. Pacinian corpuscles less than 4 mm in length never had more than 20 capsules, and there was as a rule only a single inner cylinder in such corpuscles. Corpuscles longer than 4 mm had more than 20 capsules, and 2 to 7 inner cylinders were visible in their transverse sections. Each of these juxtaposed cylinders was surrounded by five narrow capsules, and all by a



Fig. 3. A group of pacinian corpuscles of simple structure in loose connective tissue. imes 4



Fig. 4. Pacinian corpuscle of simple structure, sectioned in the paraxial plane. Note inner cylinder of homogeneous structure in the middle. Gomori's silver impregnation. $\times 80$



Fig. 5. Splitting of a lamella bounding adjacent capsules. Note fine intracapsular fibrous network. Gomori's silver impregnation. $\times 160$



Fig. 6. Pacinian corpuscle of complex structure. Transverse section. The inner cylinder are provided with separate capsules, and the latter are surrounded by outer common capsules Gomori's silver impregnation. $\times 80$

number of common outer capsules (Fig. 6). The lamellae consist of elastic fibres and stain with resorcin-fuchsin. The fine intracapsular fibrous network stains red with van Gieson's dye. Both the lamellae and the fine fibres between them are impregnated with silver according to Gomori.

Discussion

CEELEN [7], GENERSICH [10] and PRZEWOSKI [20] regarded the enlargement of pacinian corpuscles on the posterior aspect of the pancreas as due to edema. They agree in that the enlargement of the pacinian corpuscles is seldom accompanied by generalized edema or ascites and that the occurrence of corpuscles of normal (1 to 2 mm) or subnormal size is frequent in cases of generalized edema or ascites. Having encountered enlarged pacinian corpuscles in aged individuals, GENERSICH explained the oedema in the following terms: "Because of the widespread fibrous degeneration in persons of advanced age, the lymph issuing from the blood vessels of the capsule is prevented from diffusing into the interlamellar lymph space." He claimed that the enlarged corpuscles contained 30 or more capsules, and that the peripheral ones were wider. The present investigations confirmed GENERSICH's findings and were in contradiction to those of PRZEWOSKI and CEELEN who observed a diminution in the number of capsules (to 4 or 5) in enlarged pacinian corpuscles. The occurrence of several juxtaposed inner cylinders was likewise noted by GENERSICH. SAKURAOKA [25], further TAKASHI et al. [33] emphasized that corpuscles with a complex structure of this kind can only be found in the retroperitoneum, especially behind the pancreas. The last-named authors distinguished 6 mor phological types of pacinian corpuscles according to the number and course of the inner cylinders.

KEY and RETZIUS [14] claimed that the capsules derive from the neurilemma, while CAUNA and MANNAN [5] regarded them as originating from the surrounding connective tissue. Relying on the evidence of electron-microscopic studies, SCHWARZ [28] suggests that the lamellae belong to the peripheral neuroglia. TAKASHI [32] found that they developed from the fibroblasts of the endoneurium. SHANTHAVEERAPPA and BOURNE [29] suggest that the flat cells covering the lamellae derive from the perineural epithelium. DOGIEL [8] found that the minor arteries, entering together with the nerve, divide into capillaries which run in the capsules; the vein emerges with the nerve.

As to the question whether the enlargement of pacinian corpuscles behind the pancreas is of an oedematous nature, the present experiments have borne out GENERSICH's theory insofar as the number of capsules in enlarged corpuscles amounted to 30 to 40, which is undoubtedly above the normal number. The enlargement may not only be due to oedema but in the first place to hyperplasia. The complex structure of enlarged pacinian corpuscles justifies the assumption that the enlargement is the result of a process of proliferation. A sub-

cutaneous benign tumour of the pacinian corpuscles (pacinian neurofibroma) has repeatedly been described [3, 18, 19, 34]. A tumour of this kind was observed by RIGDON [24] after methylcholanthrene treatment in the subcutaneous connective tissue of ducks. He affirms that the corpuscles contained in such tumours are immature forms.

CEELEN [7], while admitting that oedema may figure as a pathogenic factor, suggests that the enlargement of the corpuscles might also be due to hyperregeneration caused by chronic diseases of the gastrointestinal tract. VORONIN [37], studying the healing of fractures in rats and mice, observed the accumulation of pacinian corpuscle-like nerve-endings in the callus. GENER-SICH [10] described a case of enlarged pacinian corpuscles in which cholelithiasis caused the gall bladder to perforate into the duodenum. Chronic peritonitis induced by non-perforating duodenal ulcer was accompanied by the enlargement and proliferation of pacinian corpuscles in our case No. 3.

The tumour of the pacinian corpuscles, associated with a proliferation of connective tissue, may be regarded as a mixed tumour, whereas corpuscles larger than normal are the result of hypertrophy. Bunches of pacinian corpuscles at nerve-endings, as described in the present paper, have to be qualified likewise as tumours.

REFERENCES

1. ADRIAN, E. D., UMRATH, K.: (1929) The Impulse Discharge from the Pacinian Corpuscles. J. Physiol. (Lond.) 68, 139. - 2. ANDREJEW, I. D.: (1931) Über den Verlauf der sensiblen Leitungsbahnen in der Bauchhöhle. Z. mikr. -anat. Forsch. 24, 17. - 3. Апатенко А. К. (1961 О так называемых невромах тактильных окончаний. Арх. пат. 23/6, 47.-4. Акидт, R.: (1875) Was sind Pacinische Körperchen? Virchows Arch. path. Anat. 65, 131. - 5. CAUNA, N., MANNAN, G.: (1958) The Structure of Human Digital Pacinian Corpuscles (Corpuscula lamellosa) and Its Functional Significance. J. Anat. 92, I. - 6. CAUNA, N. MANNAN, G.: (1959) Development and Postnatal Changes of Digital Pacinian Corpuscles (Corpuscula lamellosa) in the Human Hand. J. Anat. 93, 271. – 7. CEELEN, W.: (1912) Über das Vorkommen von Vater-Pacini'schen Körperchen am menschlichen Pankreas und über eine krankhafte Veränderung derselben. Virchows Arch. path. Anat. 208, 460. — 8. DOGIEL, A. S.: (1910) Zur Frage über den Bau der Kapseln der Vater-Pacini'schen und Herbst'schen Körperchen und über das Verhalten der Blutgefässe zu denselben. Folia neuro-biol. (Lpz.) 4, 218. – 9. GAMMON, G. D., BRONK, D. W.: (1934) Pacinian Corpuscles in Mesentery and Their Relation to Vascular System. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 31, 788. – 10. GENERSICH A.: (1875) Adalékok az ember hasűri együttérző fonatán levő Pacini testek ép- és kórbonctanához. Orv. Hetil. 19, 876. – 10. GENERSICH, A.: (1876) Beitrag zur Anatomie und pathologische Anatomie der am sympathischen Bauchgeflechte der Menschen befindlichen Pacini'schen Körperchen. Wien. med. Jb. 2, 133. – 11. GRAY, J. A. B., MALCOLM, J. L.: (1950) The Initiation of Nerve Impulses by Mesenteric Pacinian Corpuscle. Proc. roy. Soc. B. 137, 96. - 12. HERBST, G.: (1848) Die Pacinischen Körper und ihre Bedeutung, Göttingen. Vandenhoeck u. Ruprecht. - 13. HUNT, C. C., TAKEUCHI, A.: (1962) Responses of the Nerve Terminal of the Pacinian Corpuscle. J. Physiol. (Lond.) 160, 1. 14. KEY, A., RETZIUS, G.: (1873) Studien in der Anatomie des Nervensystems. Arch. mikr. Anat. 9, 365. - 15. KRAUSE, W.: (1881) Die Nervenendigung innerhalb der terminalen Körperchen. Arch. mikr. Anat. 19, 53. - 16. MICHAILOW, S.: (1908) Die Struktur der typischen Vater-Pacinischen Körperchen und ihre physiologische Bedeutung. Folia neuro-biol. (Lpz.) 2, 603. - 17. PACINI, F.: (1840) Nuovi organi scoperti nel corpo umano. Cino Pistoja. - 18. PRICHARD, R. W., CUSTER, R. R.: (1952) Pacinian Neurofibroma. Cancer 5, 297. - 19. PROSE, P. H., GHERARDI, G. J., COBLENZ, A.: (1957) Pacinian Neurofibroma. Arch. Derm. 76, 65. -20. PRZEWOSKI, E.: (1875) Ueber ödematose Schwellung Pacinischer Körperchen. Virchows Arch. path. Anat. 63, 363. – 21. RAINER, F. J.: (1909) Sur l'existence d'un type géant de

6

corpuscle de Pacini. C. R. Soc. Biol. (Paris) 61, 309. - 22. RAMSTRÖM, M.: (1908) Anatomische und experimentelle Untersuchung über die lamellösen Nervenkörperchen im Peritoneum parietale des Menschen. Anat. Hefte 36, 309. - 23. RAUBER, A.: (1867) Untersuchung über das Vorkommen und die Bedeutung der Vaterschen Körperchen. Fritsch. München. - 24. RIGDON, R. H.: (1955) Neurogenic Tumors Produced by Methylcholanthrene in the White Pekin Duck. Cancer 8, 906. – 25. SAKURAOKA, E.: (1954) On the Innervation of Posterior Abdominal Wall in Later Stage of Human Embryo. Arch. histol. jap. 6, 679. - 26. SARNOFF, S., YAMADA, S. I.: (1959) Evidence for Reflex Control of Arterial Pressure from Abdominal Receptors with Special Reference to the Pancreas. Circulat. Res. 7, 325. - 27. SCHUMACHER, S. v.: (1911) Beiträge zur Kenntnis des Baues und der Funktion der Lammellenkörperchen. Arch. mikr. Anat. 77, 157. – 28. SCHWARZ, W.: (1951) Elektronenoptische Untersuchungen am Aussenkolben der Vater-Pacinischen Körperchen. Z. Zellforsch. 36, 436. – 29. SHANTHAVEE-RAPPA, T. R. and BOURNE, G. H.: (1963) New Observations on the Structure of the Pacinian Corpuscle and its Relation to the Perineural Epithelium of Peripheral Nerves. Amer. J. Anat. 112, 97. - 30. SHEEHAN, D.: (1933) The Clinical Significance of the Nerve Endings in the Mesentery. Lancet 1, 409. - 31. SHEEHAN, D.: (1933) The Afferent Nerve Supply of the Mesentery and its Significance in the Causation of Abdominal Pain. J. Anat. 67, 233. - 32. TAKASHI, M.: (1957) On the Development of the Complex Pattern of Pacinian Corpuscle Distributed in the Human Retroperitoneum. Anat. Rec. 128, 665. – 33. TAKASHI, M., SAKAI, I., USIZIMA, H.: (1955) On the Terminal Neural Apparatus Detectable in the Retroperitoneum of Man. - A Complex Pattern of Pacinian Corpuscle. Anat. Rec. 122, 17. - 34. THOMA, R.: (1894) Lehrbuch der pathologischen Anatomie. I. 676. Stuttgart. - 35. VATER, A.: (1747) Dissertatio de consensu partium corporis humani. Haller, Disputationum Anatomicarum selectarum. Vol. II.,953. Gottingae. — 36. Vіясном, R.: (1858) Die Čellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre. Hirschwald, Berlin, 213. - 37. Boponun. F. H. (1951) O развитии телец Фатер-Пачини при регенерации костной ткани. Докл. А. Н. СССР 76., 885.

PATHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN DER SICH UM DIE BAUCHSPEICHELDRÜSE BEFINDENDEN VATER-PACINI KÖRPERCHEN

M. SELLYEI und J. BALÓ

Verfasser haben in der Umgebung der Bauchspeicheldrüse in 35 Fällen normale Vater-Pacini Körperchen festgestellt, und außerdem in 3 Fällen auch ihre Vergrößerung und Prolife, ration beobachtet. Die Vergrößerung ging mit der Schwellung der konzentrischen Kapselnaus denen diese Gebilde bestehen, sowie mit der Proliferation der Kapseln und der inneren Zylinder einher. Die traubenähnliche Wucherung der vergrößerten Vater-Pacini Körperchen an den sensorischen Nervenendigungen kann als eine geschwulstartige Hyperplasie angesehen werden. Gemäß den Ergebnissen von Tierexperimenten können aus der Hyperplasie der Vater-Pacini Körperchen tumorartige Gebilde entstehen. Die beim Menschen beobachteten traubenähnlichen Vater-Pacini Körperchen sind mit den durch Rigdon experimentell hervorgerufenen Tumoren der Vater-Pacini Körperchen identisch.

ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФАТЕР-ПАЧИНИЕВЫХ ТЕЛЕЦ, НАХОДЯШИХСЯ ОКОЛО ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

М. ШЕЙЕИ и Й. БАЛО

Авторы обнаружили в 35 случаях вокруг поджелудочной железы нормальныи кроме того в 3 случаях увеличенные Фатер-Пачиниевы тельца и выявили даже их размножение. Увеличение сопровождается набуханием концентрических капсул, строящих эти образования, размножением капсул и внутренних цилиндров. Гроздевидное размножение увеличенных Фатер-Пачиниевых телец на конце чувствительных нервов по всей вероятностью представляет собой опухолевидную гиперплазию. Согласно данным опытов на животных из гиперплазии Фатер-Пачиниевых телец могут развиваться спухолевидные образования. Наблюдаемое у человека гроздевидное размножение Фатер-Пачиниевых телец можно ставить в аналогию с опухолями Фатер-Пачиниевых телец, экспериментально вызванных Ригдоном.

Dr. M. SELLYEI Prof. Dr. J. BALÓ Budapest, VIII. Üllői út 26., Hungary

MESONEPHROGENES ADENOKARZINOM UND ADENOM DES COLLUM UTERI

F. TÓTH, S. CSÖMÖR und J. MÉSZÁROS

(Eingegangen am 29. April, 1963)

Drei Fälle von mesonephrogenem Adenokarzinom und ein Fall von Adenom werden besprochen. Die Abtrennung dieser Geschwülste von den anderen Adenokarzinomen ist nicht nur von dem histologischen und entwicklungsgeschichtlichen sondern auch vom klinischen und prognostischen Standpunkt begründet. Laut Literaturangaben sind nämlich diese Geschwülste — den anderen embryonalen Tumoren ähnlich — sehr strahlenempfindlich, und demzufolge sind sie im Vergleich zu den gewöhnlichen Adenokarzinomen relativ gutartig.

Mesonephrogene Adenokarzinome und Adenome des Collum uteri wurden in der Literatur selten beschrieben; zwischen 1903 und 1960 wurden laut McGEE und Mitarb. [4] 36 Adenokarzinom-Fälle veröffentlicht. 10 publizierte Fälle von benignen Adenomen sind bekannt. Unter den ungarischen Autoren beschrieb SZENDI [14] ein Karzinom des Gartnerschen Ganges; dieser Tumor wuchs im Scheidengewölbe. Laut NOVAK [7] entkommen die feineren histologischen Unterschiede öfters der Aufmerksamkeit des Pathologen, und so werden auch die echten mesonephrogenen Tumoren zu den anderen zervikalen Adenokarzinomen eingereiht; dies dürfte die seltene Diagnose dieser Tumoren erklären. Wegen ihrer histologischen Struktur des entwicklungsgeschichtlichen Interesses und biologischen Benehmens verdienen diese Geschwülste Beachtung.

Untersuchungsgut und Besprechung der Fälle

An unserer Klinik wurden in der Zeitspanne zwischen 1945 und 1962 2136 Patientinnen mit Kollumkarzinom behandelt. Unter diesen Kranken fanden wir 3 Fälle, bei welchen die Geschwulst mesonephrogenen Ursprungs war. Außerdem konnten wir eine Patientin beobachten, bei der wir histologisch ein Adenom des Gartnerschen Ganges diagnostizierten. An den folgenden geben wir die Krankengeschichten dieser Kranken bekannt.

Fall Nr. 1. M. Zs. (Kgn.: VI/204/1961) 23 Jahre alte Jungfrau kommt mit Blutungsstörungen zur Aufnahme. Vorangehend hatte sie ohnmachtähnliche Anfälle. Bei der gynäkologischen Untersuchung fanden wir für einen Finger durchgängiges Hymen, durch welches eine kleinapfelgroße Portio mit höckeriger Oberfläche zu tasten war, die sich in eine hypoplastische anteflektierte Gebärmutter fortsetzte. Die Scheide wies dem Muttermund entsprechend einen leichtblutenden, wuchernden, teilweise exulzerierten Tumor auf, der das Scheiden-

gewölbe erreichte. Die internistische Untersuchung, die Laboratoriums- und Röntgen-Befunde ergaben keine wesentlichen Veränderungen.

Probeexzision und Gefrierschnitte aus dem Tumor führten zur Diagnose Sarcoma uteri. Wegen der leichten Anämie bekommt die Patientin eine Vorbehandlung mit Bluttransfusionen, und die Gebärmutter wird mit den Adnexen und mit dem oberen Drittel der Scheide durch Laparotomie entfernt. Nach postoperativer Behandlung mit Antibiotika und wiederholten Bluttransfusionen kam es zur ungestörten Heilung.

Die entfernte Gebärmutter war etwas kleiner als normal. An der Stelle der Portio wucherte eine graurötliche Geschwulst, die auch das Scheidengewölbe infiltrierte. Die Ovarien waren kleinapfelgroß, mit weißlich verdickter Oberfläche; an der Schnittfläche waren viele



Abb. 1. Mit einschichtigem kubischem Plattenepithel bekleidete erweiterte Drüsengänge im oberen Abschnitt der Cervix. Hämatoxylin-Eosin. Vergr. $100 \times$

erbsen- bis kirschenkervgroße, rötliche Flüssigkeit enthaltende Zysten zu finden. Histologischer Befund: In dem oberen Teil der Cervix in der Höhe des Os internum sind erweiterte Drüsengänge vorhanden, die mit einschichtigem kubischem Plattenepithel ausgekleidet sind (Abb. 1). Die Membran der Drüsengänge ist mit PAS und Silberimpregnation nach GOMORI gut darstellbar (Abb. 2). Histologisch entsprechen diese Drüsengänge den Resten des Wolffschen Ganges, den sog. Gartnerschen Gängen. Die Epithelzellen sind hier typisch, ohne Polymorphie. Etwas mehr distal gegen den äußeren Muttermund werden die Drüsengänge adenomatös. Noch mehr distal ist eine atypische, aus polymorphen Zellen zusammengesetzte Geschwulst zu sehen. Die Geschwulstzellen bilden an einigen Stellen Lumina; der Epithelzellenbelag ist einschichtig, die Struktur ähnelt den gewundenen Kanälchen der Niere. An anderen Stellen sind hypernephromähnliche Zellhaufen zu sehen; diese Zellen haben ein schaumiges Protoplasma und sind großen Pflanzenzellen ähnlich (Abb. 3). Das Protoplasma enthält größere Mengen von mit Fettrot demonstrierbares, teils doppelbrechendes Lipoid und reichlich PAS-positives Material. Am distalsten Teil nimmt die Geschwulst einen undifferenzierten medullären Charakter an. Die Epithelzellen tubulärer Anordnung und die Zellen der Gartnerschen Gänge erhalten kein Mucin, sind mit Mucinkarmin nicht färbbar, sind PAS-negativ. Nach Konsultation



Abb. 2. Basalmembran der zystisch erweiterten Gartnerschen Gänge. PAS-Färbung. Vergr. $100\,\times$



Abb. 3. Pflanzenzellenähnliche schaumig-protoplasmatische Geschwulstzellen. Hämatoxylin-Eosin. Vergr. 200 \times

(Prof. Haranghy) lautet die Diagnose: mesonephrogene embryonale maligne Geschwulst. Das histologische Bild der Ovarien entspricht einer mikrozystischen Degeneration. Zwischen den Follikeln ist an vielen Stellen eine fokale aktive Stromazellenhyperplasie vorhanden.

Dem histologischen Befund entsprechend geben wir postoperativ Strahlenbehandlung, und zwar in den üblichen 4 gynäkologischen Feldern (10×15 cm). Tiefentherapie (18 kV, 10 Na, 0,5 Cu) in 200 r Fraktionen mit 8000 r Gesamtdosis. Während der Röntgenbestrahlung

hzw. nach deren Beendigung geben wir insgesamt 2900 mgSt Radium in den Scheidenstumpf. Derzeitig — fast zwei Jahre nach Beendigung der Behandlung — ist Patientin symptomfrei.

Fall No. 2. Frau M. S. (Kgn.: XII/26/1956) 80 Jahre alte Patientin wird wegen Wiederauftreten von Blutungen aufgenommen. In der Anamnese sind 4 Geburte und 3 Fehlgeburte, sonst nichts besonderes. Die üblichen Laboratoriumsuntersuchungen geben keine wesentliche Abweichung. Gynäkologische Untersuchung: senile Involution des Uterus, an der glatten Portio ein leichtblutendes Gebiet. Aus dem Muttermund sickert Blut. Mit Rücksicht auf das Alter der Patientin wird wegen der Blutung eine Abrasion und intrauterine Radium-Behandlung durchgeführt.

Histologische Untersuchung des Abrasionsmaterials: In dem rundzellig infiltrierten Stroma sind mit ein oder mehrschichtigem, atypischem kubischem Epithel bekleidete Drüsengänge von verschiedener Form und Größe zu sehen. An anderen Stellen ist der drüsige Charakter



Abb. 4. Schaumig-protoplasmatische Zellen eines Karzinoms vom »clear-cell« Typ. Hämatoxylin-Eosin. Vergr. $200 \times$

des Tumorgewebes verschwunden, nur große, pflanzenzellenähnliche Geschwulstzellen mit schaumigem Protoplasma sind zu beobachten (Abb. 4). Dg.: Adenocarcinoma cervicis (Karzinom des Gartnerschen Ganges). Unter den vorher angegebenen Bedingungen wird 8000 r Röntgentiefbestrahlung und Behandlung mit insgesamt 3800 mgSt Radium durchgeführt. Der Prozeß nahm infolge der Behandlung vorübergehend einen günstigen Verlauf, dann tritt aber Progression ein und starb die Patientin zwei Jahre später. Eine Sektion war nicht möglich.

Fall Nr. 3. Frau P. Z. (Kgn.: V/82/1961) 36 Jahre alte II Para sucht die Klinik mit hartnäckigem, durch Behandlungen nicht beeinflußbarem Fluor und Kreuzschmerzen auf. Vor einem Jahr ist ein Muttermundpolyp entfernt worden. Bei der Aufnahme finden wir einen etwas vergrößerten Uterus und Kollumeinrisse an beiden Seiten. Die üblichen Laboratoriumsuntersuchungen ergaben normale Befunde. Mit Rücksicht auf die Beschwerden und Befunde wird eine Untersuchung der Gebärmutterhöhle und Muttermundrekonstruktion durchgeführt. Histologie der durch die Emmetsche Operation gewonnenen Portioanteile: In den tieferen Schichten sind neben mit hohem hellem Zylinderepithel bekleideten zervikalen Drüsenlumina wuchernde erweiterte Drüsengänge verschiedener Größe zu sehen, letztere sind mit einschichtigem kubischem Epithel bekleidet. Im Protoplasma der zervikalen Drüsenzellen sind reichlich Mukopolysaccharide zu finden, welche nach Diastasedigestion mit PAS-Färbung gut darstellbar sind (Abb. 5). Die Drüsengänge mit kubischem Epithel haben eine deutliche Basalmembran und ihre Epithelzellen erhalten keine Mukopolysaccharide. Diese wuchernden Drüsengänge entsprechen histologisch den Gartnerschen Gängen. Dg.: Adenom des Gartnerschen Ganges in der Cervix.

Nach ungestörter Rekonvaleszenz verließ Patientin die Klinik nach 16 Tagen.

Fall Nr. 4. E. K. (Kgn.: IX/164/1962) 48 Jahre alte Patientin wird wegen Radiumbehandlung aufgenommen. In der Anamnese werden keine Krankheiten und keine Gravidität
erwähnt, die Kranke ging wegen monatelangen Metrorrhagien zur Untersuchung. Ein Kollumkarzinom wurde diagnostiziert, und in der gynäkologischen Abteilung eines Landeskrankenhauses bekam sie Röntgenbestrahlungen. Bei der Klinikaufnahme fanden wir eine Geschwulst an der Portio, einen normalgroßen anteflektierten Uterus und rechts hinten ein bis zur Beckenwand reichendes Infiltrat. Dg.: Carcinoma colli uteri st. III. Die üblichen Laboratoriumsuntersuchungen ergaben nichts Erwähnenswertes.

In der Portiobiopsie sind Drüsengänge verschiedener Größe und Weite zu sehen, welche mit atypischen, in ein oder zwei Schichten gelagerten Geschwulstzellen bekleidet sind. Die Drüsenlumina sind an einigen Stellen den gewundenen Kanälchen der Niere ähnlich. Hie und da werden kleinere oder größere Zellgruppen gebildet. Die einzelnen Geschwulstzellgruppen sind durch Bindegewebsstränge voneinander separiert. Im Stroma sind nur wenige Gefäße zu finden. Im Protoplasma der Geschwulstzellen ist kein Mucin nachweisbar. Dg.: Adenokarzinom des Gartnerschen Ganges.



Abb. 5. Große Mengen von Mukopolysaccharide nach Diastas
edigestion in den zervikalen Drüsenzellen. PAS-Färbung. Vergr. 200
 \times

Patientin wurde dreimal intrazervikal und vaginal mit einer Gesamtdosis von 5800 mgSt Radium behandelt. Zur gleichen Zeit und vorher in der erwähnten gynäkologischen Abteilung hat sie auch Röntgenbestrahlung von 8000 r erhalten. Im Laufe der Behandlung kam es zur deutlich lokalen Besserung, aber das Infiltrat, das bis zur Beckenwand reichte, zeigte keine wesentliche Änderung. Seit der Behandlung sind 3 Monate vergangen, und der Zustand der Patientin verschlechtert sich.

Besprechung

Vor fünfzig Jahren erschien ROBERT MEYERS Arbeit [5] über die selten vorkommenden rudimentären mesonephrogenen Überreste des Gebärmutterhalses und des Scheidengewölbes. Auch die ersten zwei mesonephrogene Cervixkarzinome sind von ROBERT MEYER publiziert worden; das erste im Jahre 1903 [5], das zweite im Jahre 1907 [6]. Er konnte neben dem Tumor die Gartnerschen Gänge finden, so war seine Diagnose sicher richtig. In den seitdem publizierten Fällen erwähnen die Autoren nichts davon, daß sie die

rudimentären Gänge des Mesonephros gefunden hätten. NOVAK und Mitarb. [7] haben diese Geschwülste in zwei Gruppen eingeteilt: in die erste Gruppe wurde das Schillersche Mesonephrom, in die zweite das von SAPHIR und LACK-NER [12] beschriebene »clear-cell« Adenokarzinom eingereiht. Für den ersten Typ ist der glomeruläre Aufbau, für den zweiten das hypernephroide Bild charakteristisch, es können jedoch beide Bilder in ein und derselben Geschwulst vorkommen. PLATE [9] betont, daß die Zervikalschleimhaut intakt sein müsse. In seinen Fällen entwickelte sich die das charakteristische histologische Bild gebende Geschwulst in dem einen Fall aus der Zervikalschleimhaut, im zweiten aus dem Endometrium. Seiner Meinung nach können diese Geschwülste nicht nur aus der Urniere, sondern auch aus dem primitiven mesonephrogenen Mesoderm entstehen.

Mit Rücksicht auf die embryonale Genese der Geschwulst wollen wir die wichtigsten entwicklungsgeschichtlichen Daten kurz schildern. Der mesonephrogene Schlauch erscheint im frühen Embryonalleben, als ein ca 4 mm langes Gebilde das durch Verschmelzung einiger Mesonephroskanäle entsteht. Nachfolgend entwickelt sich aus diesem Wolffschen Gang das Urogenitalsystem des Mannes, in der Frau aber bildet es sich zurück. Seine Reste in der Mesosalpinx und im Hilus des Ovariums bilden im engen Zusammenhang das Epoophoron oder Parovarium. Die Wolffschen Hauptgänge laufen dicht neben dem Uterus und dringen in der Höhe des inneren Muttermundes in die Gewebe der Cervix ein. Später bilden sich auch diese vollkommen zurück, und im Neugeborenen sind sie nicht mehr zu finden. WOLFFE [16] hatte bei 1413 Cervixuntersuchungen nur in einem einzigem Falle einen Gartnerschen Gang gefunden. Zwar selten, doch können diese rudimentären Gänge auch in der Cervix und im Scheidengewölbe der Erwachsenen persistieren und sind mit sorgfältiger Untersuchung zu entdecken. HUFFMANN [2] hat 4 Fälle, MACK-LES. WOLFFE und NEIGUS [3] einen Fall, ROCKSTROH [11] 2 Fälle von Adenomen des Gartnerschen Ganges im Gebärmutterhals beobachtet. Zuletzt hat TORRES [15] einen derartigen Fall beschrieben.

Laut McGEE und Mitarb. [4] darf man die Diagnose des mesonephrogenen Adenokarzinoms des Collum uteri nur in jenen Fällen stellen, wo die folgenden 4 Kriterien vorhanden sind: 1. Die Läsion ist klein und lokalisiert sich auf den lateralen Teil der Cervix. Das endozervikale Epithel ist intakt. 2. Im Tumor sind mit Serienschnitten die Reste der mesonephrogenen Gänge zu finden. 3. In den endozervikalen Drüsenzellen kann man Mucin demonstrieren. Demgegenüber enthalten die Zellen der mesonephrogenen Gänge kein Mucin. 4. Die differenzierten mesonephrogenen Gänge haben eine leicht darstellbare Basalmembran.

Als erste haben FARRAR und NEDOSS [1] diese Membran nachweisen können. Um die normale zervikalen Drüsengänge und im Adenokarzinom gibt es keine derartig deutliche Membran.

MCGEE und Mitarb. beschrieben 4 Fälle. Sie konnten die von ihnen selbst gestellten Charakteristika in den eigenen Fällen nicht auffinden, doch haben sie sich auf eine oder andere der charakteristischen Eigenschaften stützend, neben der mesonephrogenen Genese ihrer Fälle Stellung genommen.

Von unseren 4 Fällen konnten nur zwei histologisch und histochemisch ausführlich bearbeitet werden. In den übrigen zwei Fällen stand nicht genug Untersuchungsmaterial zur Verfügung. Unsere zwei ausführlich untersuchten Fälle haben die obengenannten 4 Bedingungen erfüllt. Anhand des histologischen Bildes der Geschwulst können wir die Behauptungen von NOVAK und Mitarb. bestärken, daß nämlich die zwei histologischen Typen: das Schillersche Mesonephrom und das »clear-cell« Adenokarzinom auch in derselben Geschwulst miteinander verknüpft vorkommen können. Wir möchten hier die Rolle der oestrogenen Stoffe in der Karzinogenese nicht näher berühren, müssen aber die Anwesenheit bilateraler polycystischer Ovarien in unserem ersten Fall hervorheben; dies ist nämlich ein Hinweis auf die gesteigerte Oestrogenproduktion.

In unserem zweiten Fall wurde der Uterus nicht entfernt, so könnten wir den oberen Abschnitt der Cervix nicht untersuchen, und demzufolge das Vorhandensein von Resten der Gartnerschen Gänge nicht beweisen. In dieser Geschwulst dominierte das hypernephroide Bild. Der dritte unserer Fälle war ein typisches Adenom des Gartnerschen Ganges. In unserem vierten Fall entsprach das histologische Bild vollkommen eines Adenokarzinoms vom »clear-cell« Typ. Laut der Literatur dürfte diese Geschwulst auch von mesonephrogener Genese sein. Für die mesonephrogene Genese unseres ersten Falles spricht auch das jugendliche Alter der Patientin und der Krankheitsverlauf. Laut Novak sollen nämlich diese Geschwülste sehr strahlenempfindlich und im Vergleich mit den anderen Adenokarzinomen relativ gutartig sein. Radikale Operation, Radium und Röntgenbestrahlung kann diese Kranken lange Zeit beschwerdefrei halten. PONGRATZ [10] hat bei der Analyse der in der Weltliteratur auffindbaren Fälle behaupten können, daß die Geschwulst meistens langsam wächst, selten rezidiviert und selten Metastasen bildet. Diese Behauptungen bedeuten, daß die Abtrennung dieser Geschwülste von den gewöhrlichen Adenokarzinomen nicht nur vom histologischen, sondern auch von klinischprognostischen Standpunkt wohlbegründet ist.

LITERATUR

1. FARRAR, G. H., NEDOSS, B. R.: (1961) Benign Tumor of the Uterine Cervix. Amer. J. Obstet. Gynec. 81, 124. - 2. HUFFMANN, J. W.: (1948) Mesonephric Remnants in Cervix. Amer. J. Obstet. Gynec. 56, 23. - 3. MACKLES, A., WOLFFE, S. A., NEIGUS, I.: (1958) Benign and Malignant Mesonephric Lesions of the Cervix. Cancer, 11, 292. - 4. McGEE, C. T., CROMER. D. W., GREENE, R. R.: (1962) Mesonephric Carcinoma of the Cervix: Differentiation from Endocervical Adenocarcinoma. Amer. J. Obstet. Gynec. 84, 358. - 5. MEYER, R.: (1903) Über Adenom-und Karzinombildung an der Ampulle des Gartnerschen Ganges. Virchows Arch. path. Anat. 174.-240. 6. MEYER, R.: (1097) Beitrag zur Kenntnis des Gartnerschen Ganges beim Menschen, I. die Ampulle des Gartnerschen Ganges und ihre kongenitalen Abnormitäten: II. über einen zweiten Fall von destruirendem Adenom (Karzinom) an der Ampulle des Gartnerschen Ganges. Z. Geburtsh. Gynäk. 59, 234. - 7. NOVAK, E., WOODRUFF, J. D., No-VAK, E. L.: (1954) Probable Mesonephric Origin of Certain Female Genital Tumors. Amer. J.Obstet. Gynec. 68, 1222. - 8. PLATE, W. P.: (1950) Carcinoma of Mesonephric Duct in Adults and Children. Gynaecologia. (Basel) 130, 203. - 9. PLATE, W. P.: (1962) Die Pathogenese mesonephrischer Tumoren, Geburtsh, u. Frauenheilk. 22, 1052. – 10. PONGRATZ, O.: (1954) Bericht über einen Fall von Gartnergang-Karzinom. Zbl. Gynäk. 75, 1592. – 11. ROCKSTRON, (1935) Adenome, Zysten und Karzinom des Gartnerschen Ganges. Z. Geburtsh. Gynäk. 112, 95. – 12. SAPHIR, O., LACKNER, J. E.: (1944) Adenocarcinoma with Clear Cells (Hypernephroid) of Ovary. Surg. Gynec. Obstet. 79, 539. - 13. SCHILLER, W.: (1939) Mesonephroma Ovarii. Amer. J. Cancer. 35, 1. - 14. SZENDI, B.: (1956) Gartner-Gang Karzinom in der Scheidenwölbung. Wien. klin. Wschr. 44, 875. - 15. TORRES, V. G.: (1961) Lesiones Mesonefricas del Cuello Uterino. Rev. Fac. Cienc. méd. Univ. Córdoba. 19, 7. – 16. Wolffe, S. A.: (1940) Gartner's Duct Lesions of the Cervix. Amer. J. Obstet. Gynec. 39, 312.

MESONEPHROGENIC ANDENOCARCINOMA AND ADENOMA OF THE UTERINE CERVIX

F. TÓTH, S. CSÖMÖR and J. MÉSZÁROS

Three cases of mesonephrogenic adenocarcinoma, and a case of adenoma are described. The differentiation of these tumours from other adenocarcinomas, apart from its histological and embryological interest, is important clinically and prognostically, since these tumours, any tumour of embryonic origin are highly sensitive to irradiation and thus less malignant than other adenocarcinomas.

МЕЗОНЕФРОГЕННАЯ АДЕНОКАРЦИНОМА И АДЕНОМА ШЕЙКИ МАТКИ

Ф. ТОТ, Щ. ЧЁМЁР и Й, МЕСАРОЩ

Авторы сообщают три случая мезонефрогенной аденокарциномы и один случай аденомы, весьма редко наблюдаемые и в венгерской литературе еще не описанные опухоли. Дифференциация этих опухолей от остальных видов аденокарцином очень важно не только с гистологической и биогенетической точек зрения, но и для клиники и прогностики. Согласно литературным данным эти опухоли, подобно остальным эмбриональным опухолям, весьма радиочувствительны и, следовательно, по сравнению с остальными аденокарциномами они относительно доброкачественны.

Dr. F. Tóth Dr. S. Csömör Dr. J. Mészáros

Budapest, VIII. Baross u. 27., Ungarn

90

RECENSIO

V. SCHREIBER: The Hypothalamo-Hypophysial System

Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences. Prague, 1963, 553 pp., 106 ¡llustrations

Schreiber's monograph provides a complete survey of the current knowledge concerning the role and function of the hypothalamo-hypophysial system in 15 chapters. In the first five chapters the general principles, and the function of the hypothalamus are described. In the following seven chapters a detailed description is given of the hypothalamic regulation of the different trophic and posterior hypophysial hormones. This is followed by a well-selected review of the problems of the adenohypophysiotrophic factors of hypothalamic origin, and of the higher nervous centres controlling the function of the hypothalamo-hypophysial complex. The last chapter offers a simple and acceptable classification of the complicated diseases of this system.

More than 2000 papers have been worked up in the monograph which always finds the way to a consistent synthesis among the bulk of the often contradictory statements. The tendency to summarize the reviewed data seems to be a little overdone. There is a summary at the end of every section, of every subchapter, and also at the end of every chapter.

The most interesting and important part of Schreiber's monograph is chapter VIII, in which subchapter D deals with the Thyreotrophin-Releasing Factor. This field forms the special interest of the author and the subchapter in question is based mainly on original experiments of his own. His other results are included only as references in the different chapters.

The documentation is limited mainly to a presentation of the author's own experimental results.

Schreiber's monograph will interest not only the endocrinologists but also the internists and gynaecologists dealing with endocrine problems.

B. MESS

Printed in Hungary

A kiadásért felel az Akadémiai Kiadó igazgatója A kézirat nyomdába érkezett: 1964. VIII. 31. — Terjedelem: 8 (A/5) ív, 85 ábra (28 szines),7 melléklet

64.59414 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 "Kultúra" 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 destinés à la redaction à l'adresse suivante:

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

Toute correspondance doit être envoyée à cette même adresse.

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

On peut s'abonner à l'Entreprise du Commerce Extérieur de Livres et Journaux »Kultúra« (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 «Kultúra» (Budapest I., Fő utca 32. Текущий счет № 43-790-057-181) или его заграничные представительства и уполномоченные.

INDEX

Morphologia Normalis et Experimentalis

Radnai, BDömötör, LKálmán, P.: Openings of Different Origin on the Mitral Valve	3
Dévényi, I.—Endes, P.—Gomba, Sz.: Behaviour of Juxtaglomerular Granulated Cells in the Autotransplanted and Homotransplanted Renal Tissue of Weanling and Foetal Rats	13
Gomba, Sz.—B. Soltész, Margit—Endes, P.: Studies of the Granulated Cells of the Juxta- glomerular Apparatus, III. Effect of Fixatives and Freezing on the Granules	19
Kiss, F. A.: Osteogenesis in Costal Cartilage Induced by Local Administration of Adrenal Extract	25
Rózsa, Gy.—Sótonyi, P.: Histochemische Untersuchung der Autolyse und Bewertung der Gomori—Takamatsuschen alkalischen Phosphatasereaktion	35
Földes, I.—Módis, L.—Süveges, I.: Metachromasia in Cartilaginous Tissues	43
Törő, I.—Pályi, Irén—Csapó, I.—Gazsó, L.: Microcinematographic Studies of the Epi- thelial Cells of the Thymus	51

Pathologia

Sellyei, M.—Baló, J.: Pathologic Changes in the Pacinian Corpuscles around the Pancreas 75

Oncologia

Tóth, FCsömör, SMészáros, J.: Mesonephrogen	nes Adenokarzinom und Adenom des
Collum uteri	
Recensio	

Index: 26.017

Acta Morphologica

Academiae Scientiarum Hungaricae

ADIUVANTIBUS I. BALÓ, P. ENDES, K. FARKAS, L. HARANGHY, B. KELLNER, I. KROMPECHER, GY. ROMHÁNYI, J. SZENTÁGOTHAI

> redigit I. TÖRŐ

TOMUS XIII * FASCICULUS 2



1965

ACTA MORPH. HUNG.

ACTA MORPHOLOGICA

A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA ORVOSTUDOMÁNYI KÖZLEMÉNYEI

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

Technikai szerkesztő:

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. Meg rendelhető 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 »Kultúra« (Budapest I., Fő utca 32. Bankkonto Nr. 43-790-057-181) oder bei seinen Auslandsvertretungen und Kommissionären. Histologisches Institut (Direktor: Prof. G. I. SABUSOW) der Staatlichen Medizinischen Universität in Kasan

ZUR FRAGE DER AFFERENTEN INNERVATION DER NETZHAUT

N. A. MATWEJEWA

(Eingegangen am 6. Oktober, 1962)

Auf Grund experimenteller Ergebnisse wird darauf gefolgert, daß die Ganglienzellenschicht der Netzhaut außer den Nervenzellen des Schnerven auch noch Neuronen enthält, die eine andere funktionelle Aufgabe haben. Es befinden sich darin nämlich periphere afferente Nervenzellen. Die Endverzweigungen der Dendriten dieser Zellen bilden einen lokalen Rezeptorenapparat in Form von freien, buschigen Nervenendigungen.

Die Nervenfasernschicht der Netzhaut besteht vornehmlich, doch nicht ausschließlich, aus Fasern des Sehnerven. Im Bestand seiner Stränge gibt es zentrifugale Nervenfasern. Sie unterscheiden sich von den Fasern des Sehnerven bisweilen durch ihr größeres Kaliber. Die zentrifugalen Nervenfasern bilden nach ihrem Austritt aus dem Bestand der Nervenstränge sensible Nervenendigungen an den Wänden der Blutgefäße. Auf Grund ihrer Struktur gehören die Angiorezeptoren zu den freien, buschigen Endigungen.

Aus dem Erwähnten geht hervor, daß die innerste Haut des Augapfels über einen wohlentwickelten Rezeptorenapparat sowohl lokalen als auch zentralen Ursprungs verfügt.

Die reichhaltige Literatur, die sich dank der Bemühungen der die Mikromorphologie der afferenten Nerven untersuchenden Forscher angehäuft hatte, enthält wenig Angaben über die innerste Haut des Augapfels, obwohl in der Funktion des Sehorgans der Netzhaut die wichtigste Rolle zukommt. Zweifellos ist die Erforschung der afferenten Innervation dieses Gebietes eine äußerst wichtige Aufgabe. Vereinzelte Versuche wurden zwar in dieser Richtung bereits unternommen, doch erbrachten sie keine erschöpfenden Resultate.

RAMONY CAJAL (1894) und DOGIEL (1895) brachten das Vorhandensein von zentrifugalen Fasern in der Retina mit den besonderen sensorischen Apparaten der Netzhaut in Zusammenhang. Im Jahre 1953 wandte sich LEWKOJEWA erneut der Frage der Netzhautinnervation zu, doch gelang es ihr nicht, eine zufriedenstellende Antwort auf diese Frage zu geben. Später wurde eine Reihe von Arbeiten von SCHIBKOWA veröffentlicht (1955, 1958, 1959), die sich gleichfalls mit der afferenten Innervation der Netzhaut befaßten. Überblicken wir diese Angaben, so sehen wir, daß sie das bisher reichste Material über die afferente Innervation der Netzhaut gesammelt hatte.

Die Ergebnisse unserer eigenen Untersuchungen bestätigten in mancher Beziehung die Beobachtungen von SCHIBKOWA, doch weichen unsere Folgerungen in gewisser Hinsicht von den übrigen ab, wie wir es weiter unten ausführlicher darlegen wollen. WOLTER (1956) entdeckte in den Wänden der menschlichen Netzhautgefäße freie, buschig verzweigte Endigungen, die er für terminale Verzweigungen der zentrifugalen Fasern der Retina hält.

Material und Technik

Als Untersuchungsobjekt wählten wir die Katzennetzhaut. Sie wurde nach der Methode von Bielschowsky-Gross vollständig mit salpetrigsaurem Silber imprägniert. In unseren früheren Untersuchungen suchten wir die Verteilung der Endverzweigungen der sympathischen Nervenfasern in der Netzhaut zu klären. Um eine Degeneration dieser Fasern herbeizuführen und sie dadurch von den anderen Fasern differenzieren zu können, führten wir bei 78 Katzen eine unilaterale Exstirpation des oberen (sympathischen) Halsganglions durch. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen haben wir bereits früher veröffentlicht (MATWEJEWA 1961, 1961).

Aus dem gleichen Material erhielten wir Angaben über die sensorische Innervation der Netzhaut. Beobachtungen dieser Art bildeten die Grundlage unserer vorliegenden Arbeit.

Ergebnisse

Bei der Untersuchung der Präparate richteten wir unsere Aufmerksamkeit auf die kleinen Nervenzellen, die sich im Innenteil der Ganglienzellenschicht befinden. Ihr Körper von geringem Ausmaß ist rund, drei- bzw. viereckig. Aus ihrem Perikard entspringt eine geringe Anzahl von Fortsätzen (3 bis 4). Der Achsenzylinderfortsatz dieser Zellen tritt in den Strang der Nervenfasern ein. Die Dendriten beginnen am Zellkörper als äußerst dünne Verzweigungen und ziehen in der Mehrzahl der Fälle auf große Entfernungen. Bisweilen verzweigen sie sich dichotonisch, ohne sich dabei zu verdünnen, im Gegenteil, sie werden noch dicker. Nachher verzweigen sie sich erneut ein- zweimal, um — sich allmählich verjüngend — an den verschiedenen Netzhautstrukturen zu enden. Im Ergebnis dieser Verästelung der Dendriten entsteht eine große Ähnlichkeit mit der Struktur der rezeptorischen baumförmigen Nervenendigungen, deren Endverzweigungen recht ausgedehnt sind (Abb. 1).

Sensible Nervenendigungen ähnlicher Art wurden von uns wiederholt auch in den anderen, früher untersuchten Häuten des Augapfels gefunden (MATWEJEWA 1958, 1961). Dieser Typ der Dendritenverzweigungen, bei dem die Mengen des Nervenplasmas parallel mit der Entfernung der Zweige vom Zellkern zunimmt, ist für die peripheren sensiblen Zellen charakteristisch und legte die Vermutung nahe, daß die obenerwähnten Ganglienzellen zu den afferenten Elementen der Netzhaut gehören.

Die erwähnten Ganglienzellen finden sich sowohl in den peripheren, als auch in den zentralen Teilen der Netzhaut, d. h. nicht nur entlang der Blutgefäße und in der Peripherie der Netzhaut, wie von SCHIBKOWA behauptet wird. Hinsichtlich der Lagerung dieser Elemente in den einzelnen Schichten der Netzhaut läßt sich feststellen, daß sie bald in der Ganglienzellenschicht, bald unmittelbar unter der inneren Grenzmembran liegen. Ihre Neuriten treten

ZUR FRAGE DER AFFERENTEN INNERVATION DER NETZHAUT

— wie bereits erwähnt wurde — in die Nervenfasernschicht ein. Die Dendriten ziehen in einigen Fällen im Niveau der Nervenfasern, in anderen dagegen sind sie oberflächlicher gelagert. Mit anderen Worten erreichen sie den innersten Teil der Netzhaut. Die Zahl der sensiblen Nervenfasern in der Netzhaut ist gering, darin stimmen wir mit SCHIBKOWA überein, aber dennoch vermochten wir in der Katzennetzhaut 10—15 solcher Zellen zu zählen.

Es sei die besondere Reaktivität der erwähnten Zellen gegenüber experimentellen Eingriffen hervorgehoben. Besonders leicht lassen sie sich bei Strah-



Abb. 1. Sensible Nervenzelle aus der Katzennetzhaut. Die Dendriten enden weit vom Zellkörper entfernt. Imprägnation nach Bielschowsky-Gross. 10 × 90fache Vergrößerung

lenkrankheit nachweisen (MATWEJEWA 1958), wobei ihre Dendriten zu wuchern beginnen, einen schlängelnden Verlauf nehmen und als kleine Schlingen, Knöpfchen bzw. Ringchen enden (Abb. 2). Bei der Entfernung des oberen Halsganglions verändern sich auch die sensiblen Neuronen (Abb. 3). Vermutlich gehen in letzterem Fall die morphologischen Veränderungen der Ganglienzellen-Fortsätze mit der durch die Desympathisation des Augapfels bedingten Störung der Trophik einher.

Als die vorliegende Arbeit bereits fertiggestellt war, hatten wir Gelegenheit die Veröffentlichung von A. ÁBRAHÁM zu lesen*, worin der Verfasser auf die Wucherung der Dendriten und auf die Entstehung von semmelförmigen Verdickungen einiger Ganglienzellen am Rindvieh hinweist. Ähnliche Bilder sahen wir in der menschlichen Netzhaut bei Glaukom. Die keulenförmigen Verdickungen der Dendritenenden fassen wir als Reizerscheinungen auf.

1*

^{*}ÁBRAHÁM, A.; Zur Kenntnis der Struktur der Netzhaut, mit besonderer Berücksichtigung der Ganglienzellenschicht. Z. Zellforsch. 53. 1960.

N. A. MATWEJEWA

Neben den soeben beschriebenen Nervenapparaten, welche von den Dendriten der afferenten Nervenfasern gebildet werden, fanden wir an den Blutgefäßwänden der Netzhaut eine beträchtliche Anzahl von rezeptorischen



Abb. 2. Sensible Nervenzelle aus der Katzenretina. Der Dendrit nimmt einen schlängelnden Verlauf. Einige seiner Endverästelungen enden mit semmelartigen Verdickungen oder Schlingen. Akute Strahlenkrankheit. Imprägnation nach Bielschowsky-Gross. 10×90 fache Vergrößerung



Abb. 3. Sensible Nervenzelle aus der Katzenretina. Reaktive Veränderung der Fortsätze nach Exstirpation des oberen Halsganglions. Imprägnation nach Bielschowsky-Gross. 10×90fache Vergrößerung

Nervenendigungen (Abb. 4). Entlang der Blutgefäße finden sie sich ziemlich häufig. Auf Grund ihrer Struktur gehören die Angiorezeptoren zu den freien, baumförmigen Nervenendigungen. Ihre Morphologie zeigt keine spezifischen Züge. Sie sind den in den verschiedenen Organen beschriebenen Angiorezepto-



Abb. 4. Sensibler Nervenapparat an der Wand einer Venula der Katzenretina. Zahlreiche freie und auch an die Endigungen gebundene kleine Schlingen, Knöpfchen bzw. Plaques beweisen die reaktive Veränderung des betreffenden Rezeptors. 48 Stunden nach der Exstirpation des oberen Halsganglions. Imprägnation nach Bielschowsky-Gross. 15 × 90fache Vergrößerung



Abb. 5. Freie sensible Nervenendigung von buschigem Typ, entlang der Venulenwand der Katzennetzhaut. 48 Stunden nach der Exstirpation des oberen Halsganglions. Imprägnation nach Bielschowsky-Gross. 15 × 90fache Vergrößerung

ren ähnlich (SABUSOW 1945, PLETSCHKOWA 1948, MASLOW 1950, GRIGORJEWA 1954, DOLGO-SABUROW 1958 u. a.). In den weiten Gefäßen bestehen sie aus einer großen Anzahl von sich verästelnden Nervenendigungen. In Gefäßen mit

N. A. MATWEJEWA

geringerem Lumen ist ihr Verlauf einfacher. Die sensiblen Nervenapparate ziehen meistens der Gefäßachse entlang, seltener quer über. Sowohl die Untersuchungen von SCHIBKOWA wie auch unsere eigenen Ergebnisse beweisen, daß die Rezeptorenapparate der Netzhautgefäße äußerst reaktiv und leicht verletzbar sind. Die sensiblen Nervenendigungen der Blutgefäße bestehen aus marklosen Nervenfasern, die aus den in der Nervenfasernschicht der Netzhaut befindlichen Säulchen ausgehen (Abb. 5). Bisweilen ist das Kaliber dieser Fasern größer als der Durchmesser der anderen Fasern des Nervenstranges. Zweifellos gehören diese Fasern zu den zentrifugalen Fasern der Netzhaut.

Besprechung

Hinsichtlich des Ursprungs der sensiblen Nervenendigungen in der Netzhaut geht unsere Meinung mit jener von SCHIBKOWA (1955) und der von LAW-ROW (1955) auseinander. Diese Autoren beschreiben zwar genau solche Endigungen, doch sind sie der Ansicht, daß sie spezialisierte rezeptorische Fortsätze der Ganglienzellen des Sehnerven darstellen. In einigen Fällen werden sogar — wie aus den Arbeiten von SCHIBKOWA (1956, 1960) beigefügten Abbildungen hervorgeht — von den erwähnten Forschern die reaktiv veränderten Dendriten der Ganglienzellen des Sehnerven als rezeptorische Fortsätze aufgefaßt. Das gleiche gilt auch für die keulenförmigen Endigungen, die BECHER und KNOCHE (1959) beobachtet haben. Was die von diesen Forschern beschriebenen knollenförmigen Endigungen anbetrifft, haben wir Rezeptoren dieser Form in der Netzhaut nicht gefunden.

Wir müssen annehmen, daß WOLTER in der Gefäßwand der menschlichen Netzhaut die Endverästelung der Dendriten von afferenten Nervenzellen gesehen hat. Die Körper dieser sensiblen Zellen können nämlich nur sehr schwer nachgewiesen werden, während sich die Dendriten leicht imprägnieren lassen, was zu falschen Auslegungen Anlaß gibt. Es sei erwähnt, daß SCHIB-KOWA in ihrer Arbeit (1960) ihrer Übereinstimmung mit BECHER (1955) Ausdruck verleiht, der angeblich die Möglichkeit zugibt, daß es in der Netzhaut des Augapfels Dogielsche Zellen des Typus 2 gäbe. BECHER spricht indessen nicht über sensible Neuronen, sondern über vegetative Nervenzellen, die eine sekretorische Funktion ausüben. Morphologisch unterscheiden sie sich von den Ganglienzellen des Sehnerven durch ihre geringere Größe. Der Zellkörper ist rund oder oval, der Kern groß, exzentrisch gelagert, um den Kern herum ist ein heller Hof zu sehen, das Tigroid befindet sich an der Zellperipherie. Nach Imprägnation lassen sich an ihnen sehr dünne Fortsätze nachweisen. Diese Zellen legen sich häufig eng an die Blutkapillare an. Die durch BECHER beschriebenen und auch von uns beobachteten Zellen sind den Dogielschen Zellen des Typs 2 sehr ähnlich. Indessen wäre es kaum zutreffend zu behaupten, sie seien

vollkommen analog. Die Dogielschen Zellen stellen das afferente Glied des lokalen Reflexbogens im Verdauungskanal dar (DOGIEL 1896; IWANOW 1937; KRO-CHINA 1952; SAIDENBERG 1952; IWANOWA 1953; MILOCHIN, 1953; KOLOSOW 1954 u. a.), während in der Netzhaut das Vorhandensein eines lokalen Reflexbogens noch nicht bewiesen ist. Darüber hinaus treten die Neuriten dieser Zellen in die Fasernstränge des Sehnerven ein, und ihr weiterer Verlauf ist noch unbekannt. Will man jedoch die beschriebenen sensiblen Zellen als spezialisierte, periphere afferente Neuronen auffassen, so sind sie auf Grund ihrer Funktion mit den Dogielschen Zellen des Typs 2 identisch. Entstanden sind diese Zellen wahrscheinlich durch die Differenzierung der lokalen Neuroblasten.

LITERATUR

1. BECHER, H.: (1955) Über ein vegetatives Kerngebiet in der Netzhaut und neurosekretorische Leistungen der Ganglienzellen in der Netzhaut, Auge und Zwischenhirn. Bücherei des Augenarztes. Heft 23. Stuttgart. - 2. BECHER, H. und KNOCHE, H.: (1959) Histologische Untersuchungen über Nervenendigungen in der Retina von Mensch und Säugetieren. Z. mikr. anat. Forsch. 66. - 3. CAJAL, R. W.: (1894) Die Retina der Wirbelthiere. Wiesbaden. -4. KOLMER, W.: (1936) Die Netzhaut (Retina). In: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. Springer, Berlin. Bd. III.2. – 5. DOGIEL, A. S.: (1895) Die Retina der Vögel. Arch. mikr. Anat. Anz. 11. – 6. DOGIEL, A. S.: (1898) Die sensiblen Nervenendigungen im Herzen und in den Blutgefäßen der Säugetiere. Arch. mikr. Anat. 52. - 7. Догель, A. C.: (1905) Строение нервных клеток сетчатки. Изв. Акад. Наук. 3, 5. -8. Долго-Сабуров, Б. А.: (1958) Иннервация вен. Ленинград. — 9. — Григорьева, Т. А.: (1954) Иннер-вация кровеносных сосудов. Москва. — 10. Иванов, И. Ф.: (1936) О рецепторных элементах вегетативной нервной системы кишечника. Диссертация, Казань. — 11. Иванова, Т. С.: (1953) Чувствительная иннервация тонких кишок. Сб. Вопросы морфологии рецепторов внутр. органов и серд.-сосуд. сист. Ленинград. — 12. Яшина, А. И.: (1941) Изменения нейрофибриллярного аппарата ганглиозных клеток и нервных волокон сетчатки после перерезки зрительного нерва. Диссертация, Казань. — 13. Колосов, Н. Г.: (1954) Иннервация внутренних органов и сердечно-сосудистой системы. Ленинград. 14. Колосов, Н. Г.: (1956) Нервный аппарат желудка человека. Вестник Ленинградского университета, Серия Биол. 21/4. — 15. Крохина, Е. М.: (1952) Чувствительная иннервация толстой кишки млекопитающих. Архив анат., гистол. и эмбриологии, 29/5. 16. Лаврсв, К. А.: (1955) О некоторых вопросах строения физиологических свойств — 10. Лаврев, К. А.: (1955) О некоторых вопросах строения физиологических своиств структур нервной системы позвоночных. Тезисы докл. совещ. по проблеме межневро-нальных связей. Ленинград. — 17. Левкоева, Е. Ф., Голубева, К. И., Пригожина, А. Л.: (1953) Щеглова, А. А. Нервнорецепторный аппарат глаза. Офтальмологический жур-нал, № 1. — 18. Маслов, А. П.: (1950) Морфология рецепторной иннервации кровенос-ных сосудов эректильных органов млекопитающих. Диссертация, Казань. — 19. Матвеева, Н. А.: (1958) Морфологические изменения ганглиозных элементов сетчатой оболочки глаза при экспериментальной лучевой болезни. Тезисы VI съезда А. Т. Э. Харьков. — 20. Матвеева, Н. А.: (1958) К вопросу об иннервации белковой оболочки глаза. Сб. научных работ Каз. гос. мед. ин-та, вып. 5. Гистология. — 21. Матвеева, Н. А.: (1958) К вопросу об иннервации сосудистой оболочки глаза. Сб. научн. раб. Каз. гос. мед. ин-та, вып. 5. Гистология — 22. Матвеева, Н. А.: (1961) К вопросу о структуре рецепторного аппарата радужной оболочки глаза. Сб. проблемы морфологии, патоморфологии и реактивности периф. отд. нервн. системы. Казань. - 23. Матвеева, Н. А.: (1961) Экспериментальные доказательства симпатической иннервации сетчатой оболочки глаза. Материалы 2-й конференции физиологов, биохимиков, фармакологов. Казань. 24. Милохин, А. А.: (1953) К вопросу о собственной рефлекторной дуге кишечника. Доклады Академии Наук СССР. Новая серия, 43/5. — 25. Плечкова, Е. К.: (1948) Ре-цепторы миокарда и коронарных сосудов. Сб. Морфология чувствительной иннервации внутренних органов. Москва. — 26. Забусов, Г. И.: (1945) Опыт экспериментально-морфологического анализа иннервации лёгких млекопитающих. Труды Каз. гос. Мед. ин-та. Казань. — 27. Забусов, Г. И. и Иванов, И. Ф.: (1942) О рецепторных нейронах основ-

N. A. MATWEJEWA

ного нервного сплетения желчного пузыря. Труды Казанского гос. мед. ин-та, вып. 1. — 28. Шибкова, С. А.: (1955) О межневрональных отношениях в сетчатке. Тезисы докл. совещ. по проблеме межневрональных связей. Ленинград. — 29. Шибкова, С. А.: (1956) Афферентная иннервация сетчатки. Проблемы морфологии и нервной системы. Ленинград. — 30. Шибкова, С. А.: (1958) Об иннервации сетчатки. Проблемы физиологической оптики, 12. — 31. Шибкова, С. А.: (1959) Ещё о сосудах сетчатки и их иннервации. Сб. научных трудов Ростовского мед. ин-та, кн. 11. — 32. Шибкова, С. А.: (1960) О взаимоотношениях сосудов и нервных структур в сетчатке. Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. 2. — 33. Шибкова, С. А.: (1960) Морфологические особенности ганглиозных клеток сетчатки. Сб. научных трудов Ростовского мед. ин-та, кн. 12. — 34. Зайденберг, М. Д.: (1952) Морфология и функциональное значение внутристеночного нервного аппарата тонкого кишечника. Диссертация, Москва. — 35. Слепков, Ю. И.: (1953) Чувствительная иннервация дуги аорты человека. Сб. Вопросы морфологии рецепторов внутренних органов и сердечно-сосудистой системы. Ленинград. — 36. Слепков, Ю. И.: (1953) Иннервация аорты при гипертонической болезни. Сб. Вопросы морфологии рецепторов внутренних органов и сердечно-сосудистой системы. Ленинград. — 37. Винников, А. Я.: (1947) Сетчатка глаза позвоночных. Москва. — 38. Wolter, J. K.: (1956) Zentrifugale (antidrome) Nervenfasern in menschlichen Sehnerven. Arch. Ophthal. 158, — 39. Wolter, J. K.: (1956) Еіп weiterer Beweis für die Existenz zentrifugaler Nervenfasern in der menschlichen Netzhaut. Arch. Ophthal. 158 — 40. Wolter, J. K.: (1956) Über Endigungen zentrifugaler Nervenfasern an den Blutgefäßen der menschlichen Netzhaut. Arch. Ophthal. 158.

TO THE OUESTION OF THE AFFERENT INNERVATION OF THE RETINA

N. A. MATVEEVA

In the ganglion cell layer of the retina there are not only nerve cells of the optic nerve but also neurons of other functional purpose. It is here that peripheral afferent nerve cells may be found. The terminal arborizations of their dendrites form the local receptive apparatus. The latter has a shape of free busblike nerve endings.

The layer of nerve fibres of the retina consists chiefly, but not exclusively, of the fibres of optic nerve. The centrifugal nerve fibres take part in the composition of its bundles. They differ from the fibres of the optic nerve by their large calibres. Leaving the bundles the centrifugal nerve fibres form the sensitive nerve endings in the walls of blood vessels. According to their structure the angioreceptors of the retina may be regarded as free bushlike nerve endings.

ВОПРОС АФФЕРЕНТНОЙ ИННЕРВАЦИИ СЕТЧАТОЙ ОБОЛОЧКИ ГЛАЗА

H. A. MATBEEBA

На основании полученных данных мы можем сделать следующее заключение. Ганглиозный слой сетчатой оболочки глаза содержит кроме нервных клеток зрительного нерва еще нейроны другого функционального назначения. Именно здесь имеются периферические афферентные нервные клетки. Терминальное разветвление дендритов последних образует местный рецепторный аппарат в виде свободных кустиковидных нервных окончаний.

Слой нервных волокон сетчатки состоит преимущественно, но не исключительно из волокон зрительного нерва. В составе его пучков имеются и центробежные нервные волокна. От волокон оптического нерва они иногда отличаются большим калибром. Центробежные нервные волокна по выходе из состава пучков образуют чувствительные нервные окончания на стенках кровеносных сосудов. По структуре ангиорецепторы сетчатки относятся к свободным кустиковидным окончаниям.

Таким образом, все вышеизложенное показывает, что внутренняя оболочка глаза обладает хорошо развитым рецепторным аппаратом как местного, так и центрального происхождения.

N. A. MATWEJEWA: Kasan, Histologisches Institut der Staatlichen Medizinischen Universität, USSR

Department of Geology and Palaeontology, Museum of Natural History, Budapest

FUNCTIONAL-ANATOMICAL EXAMINATION OF THE INTERCONNEXION BETWEEN THE MORPHOLOGICAL FEATURES OF THE THORACIC VERTEBRAE IN BIRDS OF PREY AND THEIR ACQUISITION OF FOOD

P. Péczely

(Received June, 14 1963)

The specialized manner of life of predatory birds has modified the thoracic portion of their vertebral column. The modification is different according to whether the mode of life requires solidity or elasticity in the first place. Both kinds of mechanism have reached a high degree of perfection in the birds of prey.

The last cervical vertebra and the first four thoracic vertebrae are united and constitute the os dorsale in the genus of falcons. This structure enables the trunk to offer strong resistance to the impact occurring at the collision of the predator and its victim. The fifth thoracic vertebra ensures a mobile attachment between the os dorsale and the os lumbosacrale. Diminished flexibility is the limitation of this mechanism, so that falcons are incapable of taking as sharp turns and changing the direction of the flight at as wide angles as can be observed in the case of hawks.

It is in the genus of accipiters that the elastic and solid mechanism of the thoracic spine is most developed among the birds of prey. The great manoeuvrability and the rapidity of flight are in accordance with the structural pattern of the thoracic vertebrae of these birds. Lateral processes, the furcal part of the dorsal spinous processes, and the specialized form of the articular surfaces are the main components of the elastic but firm mechanism under review. Its limitation is a comparative reduction of solidity.

Although the literature contains numerous data on avian osteology, the attention of investigators seems to have been mostly directed to problems regarding the breast bone, ilium, skull and the bones of the extremities, while the morphology, evolution and functions of the vertebrae commanded less interest. Most works containing references to avian vertebrae deal with the cervical part of the spine, e.g. that of BOAS [1], whereas general references to the morphology of the thoracic vertebrae can only be found in the literature. MILLNE-EDWARDS [7] was perhaps the first to discuss the thoracic vertebrae of birds in some detail. His work presents a description of these vertebrae and states that their coalescence, due to an ossification of the tendons or an osseous fusion of the corpus and the processes, is a frequent phenomenon. Falconides display this structure.

It has been noted by GADOW [3] that the thoracic vertebrae are coalescing to form a uniform backbone in the Falconides. SZAKÁLL [9] described the fused thoracic vertebrae of the hen and the turkey. He is correct in stating that the process of coalescence is promoted by the ossified tendons. STRESEMANN's paper [8] contains a more detailed reference to our subject. He divides the thoracic vertebrae of the birds of prey in two categories, viz [1] the accipitertype in which there is no adhesion between the vertebrae; [2] the falcon-type in which the fused thoracic vertebrae form a uniform backbone.

None of these authors touches upon functional problems concerning the thoracic portion of the spine. Functional anatomic investigations were concerned with the extremities, especially with problems regarding the flight of birds. BÖKER [2] examined the statics and dynamics of flight and relied in his investigations on the results of LORENZ [5]. He drew a parallel between the wing-types and the flying technique of birds. MARSHALL [6] discussed the effect of forces at play in the different flight techniques, and observed the adaptation of the avian body to them. These investigations do not, however, treat in detail of the thoracic segment of the spine or the morphology and function of its vertebrae.

In order to answer the question of the nature of the biological mechanism evolved in the thoracic portion of the spine for the balancing of the different forces at play, it is necessary to subject the thoracic vertebrae of the birds of prey to an anatomico-functional analysis. It offers an instructive example of the perfect functional adaptation of a biological structure to the functions it is required to perform.

Material and method

Two to three skeletons, each, of the following 20 Hungarian species of birds of prey have been studied:

Falco peregrinus peregrinus Tunst.; Falco cherrug cherrug Gray; Falco subbuteo subbuteo L.;

The author is greatly indebted to the Museum of Natural History, Budapest for the skeletons.

Falco columbarius aesalon Tunst. ; Falco vespertinus vespertinus L. : Falco tinnunculus tinnunculus L.; Aquila chrysaetos chrysaetos L.; Aquila heliaca heliaca Sav.; Aquila changa Pall.; Buteo buteo buteo L.; Buteo lagopus lagopus Brünn.; Circus aeruginosus aeruginosus L.; Circus cyaneus cyaneus L.; Accipiter gentilis gentilis L.; Accipiter nisus nisus L.; Milvus migrans migrans Bodd. ; Haliaetus albicilla L.; Pernis apivorus apivorus L.; Circaetus gallicus gallicus Gm.; Pandion haliaetus haliaetus L.

The species Circus aeruginosus aeruginosus L.; Accipiter gentilis gentilis L.; Accipiter nisus nisus L.; Buteo buteo buteo L.; Buteo lagopus lagopus Brünn.; Falco peregrinus peregrinus Tunst, and Falco subbuteo L. were subjected to detailed myological dissection

The investigations had the purpose to study the morphology of thoracic vertebrae in birds of prey, to analyse the mechanism formed by these organs and to examine its functioning.

The vertebrae of birds

Before going into details, it seems necessary to present a brief survey of the avian vertebral types.

In the simplest form of thoracic spine — one which is at the same time suitable for the widest employment — the vertebrae are connected only by joints and non-ossifying ligaments. This type, in which there are no special supporting structures or osseous adhesions, is presumably the most ancient and the least differentiated form, an assumption corroborated by the fact that the thoracic vertebrae of the Archaeopteryx belong to this type. The morphology of the vertebrae and the manner in which they are interconnected lend a certain suppleness and elastic stability to the thoracic portion of the vertebral column. To this type belong the herons, stroks, parrots, cuckoos, goatsuckers, rollers, kingfishers, bee-eaters, woodpeckers and most songbirds.

The thoracic vertebrae undergo certain changes in birds with special habits of life, e.g. in swimming and diving birds, in birds which have to run and pick their food, in birds with highly developed flying power, and in those which acquire their food in a predatory manner. The thoracic vertebrae emit characteristic processes; these are osseously united along the articular surfaces or, else, the vertebrae are connected by ossified ligaments.

Specialization may be of two kinds. Evolution may tend towards consolidation, towards union by means of ossification. The ligaments of the spinal column ossify and become united with the bony substance of the vertebrae (especially with advancing age) in the swan, the goose, the duck and the spoonbill. This often results in an immovable connexion between the thoracic vertebrae. It is a further modification within the same type if the osseous fusion is between the bodies, the articular and the transverse processes of the vertebrae. This arrangement is to be found in grebes, woodcocks, the Gallinaceae, in pigeons and — in its most advanced form in falcons. The development of a rigid skeletal axis is the result of such coalescence.

The other direction of evolution is not towards ossification; differentiation of the thoracic spine manifests itself in this case by the appearance of characteristic processes and the changes thereof. An elastic but firm thoracic spine of this kind is found in sandpipers, plovers, lapwings, certain Laridae, owls, all birds of prey save the Falconidae, and in swallows. Birds of prey exhibit the most typical forms of this type.

It will be evident from the foregoing that modifications of the thoracic vertebrae, as seen in birds of prey, are not exclusive characteristics of this category. Various kinds of vertebral changes are likely to occur according to the special conditions in which birds have to live, acquire food, etc.

Results

Descriptive anatomy of the thoracic vertebrae in birds of prey

Birds of prey have, as a rule, 7 thoracic vertebrae. The two last ones form part of the lumbosacral bone to which ribs may be attached. In the genus of falcons the first four thoracic vertebrae are grown together with the last cervical vertebra (os dorsale), the fifth is free, while the last two merge into the lumbosacral bone also in this case.

The corpus vertebrae is short and becomes caudal more and more bulky. The foveae costales are placed on the antero-lateral part of the corpus. The laterally curving vertebral arches originate with a narrow root (radix arcus vertebrae) and unite in their upper course to form a broad and flat plate. The diameter of the circular vertebral foramen, bounded by the corpus and the arches, decreases in the caudal direction.

The upper spinous process (processus spinosus dorsalis) is usually powerful and has the shape of a rectangle or square. Its free oranial and caudal ends are frequently forked (pars furcalis). The upper spinous processes are especially

well developed in certain species, as manifested by their dimensions and the perpendicularity of the planes that can be layed across them.

Only the first 2 or 3 thoracic vertebrae are, as a rule, provided with lower spinous processes (processus spinosus ventralis). Eagles and hawks are exceptions in this respect: there are ventral spinous processes on the fourth (and, in rudimentary form, even on the fifth) thoracic vertebra.

The transverse processes of the anterior thoracic vertebrae are flattened in a dorso-ventral direction, but those of the posterior thoracic vertebrae are cylindrical and run obliquely backward. Their ventral surface is provided with a costal flovea. The lateral part of the transverse processes broadens out to



Fig. 1. Aquila chrysaetos chrysaetos L. Fourth thoracic vertebra. 1 = Vertebral body. 2 = Lateral process. 3 = Transverse process. 4 = Dorsal spinous process. 5 = Anterior articular process. 6 = Posterior articular process

provide room for the lateral process which runs approximately parallel to the longitudinal axis of the corpus vertebrae (Fig. 1/2). The development of the latter varies not only from species to species but — to a slight extent — even from individual to individual. It is, as a rule, strongest on the third and fourth thoracic vertebra and may be absent from the first (Pernis).

Only the posterior articular processes, which may become elongated and tapering (Accipiter), display differences according to species.

Comparative anatomy of the thoracic vertebrae

According to the manner of their attachment, thoracic vertebrae belong to two types. They may be united by ossification (falcon type) or be free, connected only by fibrous cartilage and ligaments (accipiter type).

A consolidation of the thoracic vertebrae is characteristic of the family Falconidae. The first four thoracic vertebrae are united with the last cervical vertebrae, except in the kestrel where only the first four thoracic vertebrae are free in the other falcons, also the last cervical vertebra stands free in the kestrel. The articular processes of the fifth thoracic vertebra are especially well developed which results in a high degree of mobility.

The vertebral pattern of the thoracic spine is most peculiar in *Falco* peregrinus peregrinus Tunst. (Fig. 2) where the bodies and the processes of the vertebrae are completely fused. The last cervical vertebra and the well-developed ventral spinous process of the first thoracic vertebra are grown together,



Fig. 2. Falco peregrinus peregrinus Tunst. Os dorsale. View from above. 1 =Articular surface of ventral spinous process. 2 =Dorsal spinous process. 3 =Intertransversal foramina. 4 =Transverse process. 5 =Lateral process



Fig. 3. Falco peregrinus peregrinus Tunst. Os dorsale. Lateral view. 1 = Dorsal spinous process. 2 = Ventral spinous process. 3 = Articular surface on the caudal edge of the ventral spinous process. 4 = Anterior articular process. 5 = Transverse process. 6 = Lateral process

and a bony ridge is running towards the corresponding weakly-developed process of the second thoracic vertebra without reaching it. The anterior edge of the ventral spinous process of the os dorsale (Fig. 3/3) forms a special articulation with the last free cervical vertebra. Two saddle joints, one below the other, are thus formed which, serving as a support, promote the stability of the os dorsale. The caudal fossa of the latter is bounded by strong rims. The fifth, free, thoracic vertebra has no lateral process. The cranial edge of the dorsal spinous process of this vertebra forms a protruding fork which lodges the caudal edge of the dorsal spinous process of the os dorsale. The articulating surfaces of the fifth thoracic vertebra ensure a high degree of mobility.

The only difference between the thoracic spine of Falco subbuteo subbuteo L, and that of the peregrine falcon is that the articular surface of the ventral spinous process on the os dorsale is less developed in the latter.

The ventral spinous process of the os dorsale has no articular surface, and the cranial edge is but weakly curved in *Falco cherrug cherrug Gray*. The cranially placed furcal part of the dorsal spinous process is undeveloped on the fifth thoracic vertebra.

In *Falco columbarius aesalon Tunst.*, the third (ventral) spinous process of the os dorsale and the pars furcalis processus spinosi dorsalis of the fifth thoracic vertebra are lacking. The latter is indicated by a slightly broadening projection.



Fig. 4. Falco tinnunculus tinnunculus L. Last cervical vertebra, os dorsale, fifth thoracic vertebra. 1 = Dorsal spinous process. 2 = Ventral spinous process. 3 = Transverse process. 4 = Lateral process

The thoracic segment of the vertebral column of the kestrels is somewhat different from that of the common falcon type. The os dorsale consists only of the first four thoracic vertebrae in Falco tinnunculus tinnunculus L. The last free cervical vertebra is short and high, its ventral spinous process is archedly pointed both cranially and caudally (Fig. 4/2), its caudal fossa is bounded by sharp edges. The vertebrae of the os dorsale are imperfectly united, the boundary line between the first and second vertebra is clearly visible. The first and the second ventral spinous process of the os dorsale appear to be fused in a strong-boned specimen. No articular surface or articular cavity can be seen on the anterior edge of the ventral spinous process of the os dorsale. The fifth thoracic vertebra is thick-set, and the dorsal spinous process has no fork, whereas its transverse process is provided with a weak caudally running lateral process. In Falco vespertinus vespertinus L., the last cervical vertebra merges into the os dorsale. The second and the third ventral spinous process of the os dorsale are bridged by a bony ledge. The same phenomenon is found in certain strong-boned kestrels. There is a clearly perceptible suture between the articular processes of the last cervical and the first thoracic vertebra. The tall dorsal spinous process of the latter is provided with a weak cranial pars furcalis. Not even a rudimentary form of a lateral process is perceptible.

An elastic but firm connexion between the freely standing thoracic vertebrae characterizes the second type, which comprises all the examined species

with the exception of the genus of falcons. The characteristic form of this type of the thoracic spine is due to modifications in the osseous and ligamentous pattern.

It is the evolutionary degree of the lateral processes which is of significance in this connexion. Three stages can be distinguished. In the first, the lateral processes are weakly developed and their posterior and anterior ends do not meet; their connexion is ensured by elastic bands. The lateral processes are in contact and mutually superimposed in the following stage of evolution. The caudal part of the lateral process reclines on the transverse process of the adjacent vertebra in the third and most advanced stage.

The furcal part of the dorsal spinous process may be differently developed.



Fig. 5. Falco tinnunculus tinnunculus L. Fifth thoracic vertebra. 1 = Vertebral body. 2 = Rudiment of lateral process. 3 = Transverse process. 4 = Dorsal spinous process. 5 = Vertebral foramen

There are many transitory structures between its primordial form (cuneiform process) and its most advanced type (where the planes of the anterior and posterior fork are at right angles to one another). This process is absent from all thoracic vertebrae in some species (Pandionidae) or from only certain ones in others (Pernis).

The tapering caudal articular process is another organ which promotes firmness while ensuring a high degree of mobility. The articular surfaces and the attaching portions of the corpus are bounded by strong bony flanges which are particularly well developed on the posterior vertebrae.

Among the elastic bands, the strong lateral, the common longitudinal dorsal, the interspinous and the supraspinous ligaments are worthy of note. Strongly developed, they produce a pulling effect and so become important factors in the afore-mentioned modification of the osseous pattern.

It is in the genus Accipiter that the type of elastically stable thoracic spine is best developed. The lateral processes of *Accipiter nisus nisus L*. (Fig.6/2) are in contact on the first and second thoracic vertebra; they are leaning against each other and the transverse processes between the second and the fifth thoracic vertebra.

Their posterior shank is especially well developed. The caudal articular process is tapering backward on the first and second thoracic vertebra. The furcal part of the dorsal spinous process is well developed on all of the five

vertebrae. The first cranial may be absent, but both the cranial and the caudal are present on the others. Their planes form right angles, and are mutually interlocking in dorsal flexion. The thoracic vertebrae of *Accipiter gentilis gentilis L.* are stronger and its dorsal spinous processes are taller than the corresponding structures of the sparrow hawk.

In Circus aeruginous aeruginosus L., the well developed lateral processes lean against each other and the transverse processes on the second, third and fourth thoracic vertebra, but are weak on the first and fifth one. The caudal articular processes of the first vertebra are tapering. The dorsal spinous processes are shorter than those of the Accipiter. Only the third and the fourth vertebra are provided with dorsal spinous processes.



Fig. 6. Accipiter nisus nisus L. Thoracic vertebrae. 1 = Vertebral body. 2 = Lateral process
3 = Transverse process. 4 = Dorsal spinous process. 5 = Pars furcalis of dorsal spinous process. 6 = Ventral spinous process

Conditions are exactly the same in Circus cyaneus cyaneus L.

In the genus of eagles thoracic vertebrae are bulky and emit strong processes. The well developed lateral processes of the third, fourth and fifth vertebra recline against each other and the transverse processes in Aquila chrysaetos chrysaetos L. Its first three thoracic vertebrae are provided with backward tapering caudal articular processes. The furcal part of the dorsal spinous process appears only on the third vertebra; the planes layed across on the latter and the fourth vertebra are parallel. Only the cranial fork is present on the fifth vertebra. In Aquila clanga Pall., the first and the second thoracic vertebra, their lateral processes and the forks of the dorsal spinous processes are more developed. A strong development of the fourth and fifth thoracic vertebra is characteristic of Aquila heliaca heliaca Sav. Its dorsal spinous processes have only caudally running forks. A conspicuously strong development of the ventral spinous processes is characteristic of the genera Aquila and Buteo (the latter to be discussed further below), a phenomenon pointing to the strength of the longus colli muscle arising from the said processes.

The genera Milvus and Circaetus constitute the transition to the last type in the series of specialization in which the lateral processes and the furcal parts of the dorsal spinous process are weak, while the dorsal spinous processes themselves are comparatively tall and strong (the longissimus dorsi muscle is

well developed). The elastic-solid mechanism of the thoracic segment of the spinal column reveals no strong development. To this category belong several genera and species.

Haliaetus albicilla L. The vertebral bodies are bulky, the ventral and dorsal spinous processes short. The lateral process appears on the second thoracic vertebra, and is strongest on the third and the fourth one. They are just contacting without being fused. The furcal parts of the dorsal spinous processes are weak and malformed.

Within the genus Buteo, there are considerable differences between *Buteo* buteo buteo L. and Buteo lagopus lagopus Brünn. The lateral processes are short, and the furcal part of the dorsal spinous process appears only on the fourth thoracic vertebra in the common buzzard, whereas this structure is present on the third, fourth and fifth vertebrae in the roughlegged hawk.

In *Pernis apivorus apivorus L.*, it is only on the fourth and the fifth thoracic vertebrae that the short lateral processes are contacting. It is likewise on these two vertebrae that the weak and distorted furcal part of the dorsal spinous process appears. These processes are relatively tall.

The short lateral processes of *Pandion haliaetus haliaetus L*. come in contact on the second and the third vertebrae only. The dorsal and ventral spinous processes are strongly developed (strong dorsal musculature).

The technique of prey

Two main trends of specialization can be distinguished as regards the manner in which birds of prey seize other animals for food. Falcons, attacking their victims in the open and free air-space, belong to the first category, while birds swooping and pouncing upon their prey, such as hawks, harriers, eagles, buzzards, kites, secretary birds, ospreys, etc. constitute the second category.

The manner of obtaining their food has left its imprint on the bodily structure of the falcons: they have a strong but fairly rigid trunk, powerful muscles, long and pointed wings. Their wingbeats are quick and strong, their flight is rapid and pertinacious but not supple.

Let us try to analyse the preying movements of the falcons. They hunt at different heights, and their flight is rapid. They overtake their quarry after a short or long pursuit in the course of which they manage to arrive above their intended victim. This is the moment of seizure: the legs, hitherto stretched backward, are now suddenly extended forward. With the wings in an obliquely up-and backward position, the bird sweeps upon the victim and seizes it with the talons. The falcon and its victim fall together for a short time after the mighty collision; the predator then slows down the rate of descent by spreading and beating its wings. This done, it flies to its "place of tearing".

2

Although the manner in which the prey is obtained is essentially the same in respect of all members of the family Falconidae, there are nevertheless considerable differences between the various species as regards the composition of the food and the way of acquiring it.

In Hungary, it is the peregrine falcon which captures the greatest number of flying birds. The latter include even such excellent fliers as the swift turtle dove, pigeon, kestrel and hobby.

Likewise flying animals constitute the principal nutriment of *Falco subbuteo subbuteo L*. This bird feeds principally on insects but, if they are wanting, it seizes smaller birds (e.g. migrating swallows); the act of chasing and seizure requires, however, less strength, and the impact is weaker than with the peregrine falcon.

The number of flying birds captured by *Falco cherrug cherrug Gray* is significantly less than that hunted by the peregrine falcon. Its food often consists of small rodents which are caught by a kind of retarded swoop. Its avian quarry consists of weak fliers, such as crows and jackdaws.

Falco columbarius aesalon Tunst. consumes insects in summer, and catches flying birds only in winter. The latter are seized by a sudden swoop.

The preying technique of the kestrels differs in several respects from that of the falcons. As soon as they catch a glimpse of the quarry, they pounce upon it. Yet, because of constant braking by means of the wings and the tail, the swoop of the kestrel does not compare with the impetuous attack of the falcon. There is no collision. The victim, a small rodent, lizard, or a larger insect, is caught on the ground. *Falco vespertinus vespertinus L*. consumes chiefly flying insects, and only exceptionally smaller birds which are seized in the manner of falcons. Its flight is much more rapid than that of the kestrel.

It is the genus Accipiter which displays the most perfect technique of seizing the quarry by sudden swoop. Their elastic but strong trunk, the powerful musculature of their chest and wings, the shortness and round shape of the wings, the long tail enable Accipiters to fly rapidly and with great manoeuvrability. Their preying technique is truly characterized by the words of CHERNEL: "They are swiftly flying and daring birds of prey; yet, falcons are more dangerous to flying birds, and are inferior to hawks in the pursuit of the quarry; they are shooting down on their victim, winding in all directions between trees and shrubs and flitting through thickets with a nimbleness unparallelled among predatory birds". While hunting, they fly low, at a height of a few metres. They make good use of the unevenness of the ground, of the covers offered by trees, shrubs and hedgerows. Their flight in such surroundings is not swift, they advance with moderate, uniform wing beats. They get their quarry by a sudden impetuous attack. If a bird is flushing, they get above and sweep down on it. They pounce from a comparatively moderate height, with legs stretched forward and frequently with their wings and tail in a braking position.

If the first attack is unsuccessful, they pursue the victim pertinaciously and with incredible agility.

The preying technique of the members of the genus Circus is likewise well developed. Goshawks are agile predators of a graceful flight; when hunting, they cruise at an altitude of a few metres and mostly seize animals crouching on the ground with a sudden curving swoop which indicates great suppleness and agility.

The quarry of the eagles (Aquila) consists of larger birds or mammals; they pounce upon the prey after a gliding or diving flight, seize it and usually crush its spine by a single powerful jerk of their legs.

A study of the preying technique of the genera Milvus, Circaetus and Haliaetus which obtain their food by a sudden sweep upon the quarry leads us to the group of birds which require no special physical strength for the acquisition of food, as also to the category of predatory birds whose preying technique is quite different from the usual ones.

It is, as a rule, from an ambush that the buzzards (Buteo) pounce upon their quarry which is usually no flying bird. Like eagles, they crush the spine of their victim with their powerful legs. The rough-legged hawk may occasionally pursue also flying birds; its victims are usually larger than those of the common buzzard.

The honey buzzard catches wasps, bumblebees and their larvae; it scratches the latter from their underground passages in the manner of hens. To obtain this kind of food requires no sudden swoop, no agile flight but merely strong legs suitable for scratching the soil.

Ospreys feed on aquatic animals. Cruising above lakes or rivers, they hover for a short time above the selected victim, and swoop down upon the quarry with legs stretched forward. They sometimes even plunge under water to catch the selected fish.

Functional anatomic evaluation of results

The thoracic vertebrae of birds of prey may - as regards morphology, attachment and function - be divided in two categories.

The first category is characterized by a rigid and firm thoracic spine, as found in the Falconidae. Its biological significance manifests itself in the acquisition of food. To understand its mechanism, it is necessary to analyse the forces to which the trunk or rather the axial skeleton is exposed. Forces operating during the phase of pursuit are different from those at play when the prey is caught.

The muscles of the wings are under maximum stress during the chase of the intended victim. The trunk is exposed to considerable, variously directed tensile, bending and tractive forces owing to the strong and swift wing beats

2*

and the steering movements of the tail. It is due to the structural properties of the axial skeleton that the tensile, bending and tractive forces to which the trunk is exposed are balanced by the static strength of the os dorsale in the first place, and by the mobile attachment of the dorsal and lumbar portions in the second place only. It is on account of the high degree of rigidity which characterizes the thoracic spine of falcons that the flight of these birds is straight rather than sinuous.



Fig. 7. Falco sp. at the moment of seizing the prey. 1 = Repelling force. 2 = Inertial tractive force. 3 = Resultant of the opposite forces

The main direction of forces operating at the moment when the prey is seized can well be defined (Fig. 7). A strong repelling force arises when the two animals collide: it represents the difference between the respective kinetic energies of the predator and the prey. This force strikes the bird of prey along the outstretched legs so that its direction forms a relatively small angle with the longitudinal axis of the body (Fig. 7/1). The point of attack with reference to the axial skeleton is the acetabulum-antitrochanter. There arises, at the same time, a force in the opposite direction owing to the sudden arrest of the downward swoop at the moment of impact. This represents the moment of inertia of the falcon's body in the given condition of movement (Fig. 7/2). Its magnitude is considerably inferior to that of the repelling force because of the movement and the relatively light weight of the victim. The resultant of the opposite forces and different magnitudes is a still considerable repelling power by which the os lumbosacrale and the thoracic portion of the spinal column are bent up and backward (Fig. 7/3).

The next movement is a spreading of the wings in order to decelerate the rate of descent (Fig. 8). It manifests itself as a short, transitory but strong, forward-directed elevating force acting upon the anterior portion of the thoracic spine at the juncture of the shoulder girdle and the ribs (Fig. 8/1). Synchronous-



Fig. 8. Falco sp. slowing down the rate of swoop. 1 = Leverage. 2 = Tractive force of the prey's weight. 3 = Raising effect of the spread of tail. 4 = Tractive force of the predator's own weight

ly, a considerable downward tractive force arises owing to the still unbalanced weight of the falling victim (Fig. 8/2). This force affects the pelvic region and the posterior portion of the thoracic spine. Its direction is opposite to the leverage of the wings, and its magnitude is, as yet, superior to that of the leverage. This tractive force is somewhat diminished by the spreading of the tail feathers (Fig. 8/3). The proper weight of the falling predator is another downward force, and its effect is felt along the entire vertebral column (Fig. 8/4). The play of opposite forces gives rise to a tension in the thoracic axial skeleton which is strongest in its middle portion.

113

P. PÉCZELY

The first decelerating spreading of wings is immediately followed by vigorous beats, so that the downward tractive forces are soon counteracted and exceeded by the buoyant force of the beating wings. The forward-directed component of the gradually strengthening lifting force changes the swoop first into a slightly curving glide and then into a straight forward flight.



Fig. 9. Falco sp. carrying off the prey. 1 = Leverage. 2 = Tractive force of the prey's weigh

The last phase of the hunt is the conveyance of the prey to the "place of tearing". Forces in this phase are well balanced. A lasting elevating force acts upon the spinal column adjacent to the shoulder girdle (Fig. 9/1). This is especially strong as the wings have to keep in the air the combined weights of the falcon and its prey. The weight of the captured animal exerts a downward pull on the pelvic region and the posterior portion of the thoracic spine (Fig. 9/2). These opposite forces provoke a tension in the middle part of the os dorsale and along the articulations of the fifth thoracic vertebra.

The flight of the falcons is neither too supple nor tortuous, a phenomenon in perfect agreement with their rigid and solid thoracic spine. It is, in the main, the static strength of the os dorsale which bears the tractive and bending forces arising at the moment of the seizure of the quarry. The necessary solidity of the os dorsale is due to the perfect coalescence and the special configuration

of the vertebrae. The mobile articulation of the fifth thoracic vertebra between the rigid os dorsale and the os lumbosacrale is of secondary significance. It permits of a moderate dorsal flexion, while the displaced articular surfaces act as brakes.

The elevating and the tractive forces arising at the deceleration of the downward swoop affect chiefly the region between the movably articulating last cervical vertebra and the os dorsale as also that between the fifth thoracic vertebra and the os lumbosacrale. Equilibrium is additionally ensured by the cranial edge of the ventral spinous process of the os dorsale. In extreme cases (peregrine falcon and hobby) an articular surface develops on the said cranial edge which is supported by the corresponding part of the last free cervical vertebra. This counteracts the undesirably strong dorso-ventral flexion of the os dorsale. When in movement, the fifth thoracic vertebra bears considerable tractive-repelling forces. Its articular surfaces allow significant displacements. The furcal part of the dorsal spinous process serves for the stabilization and limitation of such displacements. The comparatively wide articular capsules and the strong elastic ligaments play an important part in the moderation and balancing of tractive and repelling forces. The sudden deceleration of the downward swoop induces considerable tension in the os dorsale which is strongest in its middle part. It is presumably for this reason that the ventral spinous processes are connected by a bony ridge in this portion. The opposite (i.e. lifting and tractive) forces at play during the transportation of the prey are balanced by the articular surfaces and the strong elastic bands, as also by the structural firmness of the os dorsale.

Morphological differences between the thoracic vertebrae of the different species within the family of Falconidae are in agreement with the different manners in which they obtain their food.

The mechanism of the rigidly solid thoracic spine is best developed in the peregrine falcons which have the most advanced technique of hunting their flying quarry. This mechanism is gradually less and less developed in the common buzzard, in *Falco cherrug cherrug Gray* and in *Falco columbarius aesalon Tunst.*, a phenomenon in perfect agreement with the mechanical stresses to which the trunk of these birds is exposed in the pursuit of the prey.

Movements of the tail feathers, enabling them to hover above the selected prey and to slow down their descent, play a much more significant role in the preying technique of the kestrels. The second and third ventral spinous processes of the os dorsale are united by a bony bridge in the red-footed falcon, a phenomenon presumably connected with a backward shift of the body's centre of gravity which explains the significance of the longer tail feathers. Kestrels do not need an as solid os dorsale as does the peregrine falcon, and so the last cervical vertebra is not united with the thoracic portion of the spinal column.

P. PÉCZELY

The second type of thoracic spine displays a firmly elastic mechanism, and is most perfect in the genus of Accipiters. While pursuing their quarry, hawks are able to speed up or brake their flight very suddenly. The direction of the flight is frequently changed at a sharp angle. Such technique of movement requires considerable tractive, deflective and tensile forces that are much stronger than those arising in the flight of falcons. Sudden turns, rapid ascent and impetuous swoop expose the axial skeleton to especially great stresses. When pouncing upon the prey, the centre of gravity (which is at the height of the third and the fourth thoracic vertebra during balanced forward flight) "jumps" backward and forward. The point of the trunk's greatest mechanical stress changes accordingly.

Hawks pounce upon the prey from a comparatively moderate altitude. Accordingly, there is no significant acceleration, and the impact is correspondingly weaker. Unlike falcons, accipiters frequently attack animals perched on branches or sitting on the ground, so that the collision at the moment of capture cannot be too strong because, otherwise, the assailant would smash itself. The impact is mitigated by the outstretched long legs which act as springs; yet, the os lumbosacrale still receives a strong shock. This repelling force is, however, considerably less than that to which the corresponding part of falcons is exposed at the moment of collision with the quarry.

To balance the weight of the falling prey requires no significant power since the impetus of the swoop is moderate, especially if a perching animal is to be seized. It often occurs that an accipiter "kicks down" its flying quarry, i.e. instead of seizing the selected prey, the hawk lets it drop downward at the moment of impact.

Easy manoeuvrability of the flight requires a high degree of suppleness of the trunk. It is to this task that the thoracic spine of hawks is adapted. The thoracic vertebrae are capable of balancing by a dynamic elasticity the strong forces to which the axial skeleton of these birds is exposed. To balance the tractive, deflecting and tensile forces arising at the pursuit of the quarry, the vertebral column has to perform significant movements made possible by the extensive articular surfaces of the vertebral bodies and articular processes. This is indicated by the elastic ligaments and the wide articular capsules. The extremely strong bending stresses are borne mainly, by the elastic supporting mechanisms and bands. It is in the middle part that we find the best developed lateral processes which have to bear the strongest stress.

Part of the impact occurring at the seizure of the prey is likewise taken up by the elastic mechanism of the lateral processes and the attached ligaments, so that the elastic firmness of the dorsal column is, in the main, due to these structures. An elastic but firm thoracic spine characterizes the members of the genus Circus.

The manner in which eagles pounce upon their quarry, and the important role played by their legs in the act require a different axial skeleton. It is the pelvic region which has to bear the strongest stresses, and it is for this reason that, in contradistinction to Accipiters, the components of the elastic and firm dorsal mechanism are best developed on the fourth and the fifth thoracic vertebrae. This mechanism is weaker in the genera Milvus, Circaetus and Haliaetus. The strong development of the lumbosacral bone, due to the important part played by the legs in seizing the prey, further a less specialized mechanism of the elastic-firm thoracic spine are characteristic features of the genera Buteo, Pernis and Pandion. This shows that the axial skeleton is not exposed to strong stresses either during the flight or at the moment of the prey's capture. It is only the fifth (or the fourth and fifth) vertebra adjoining the lumbosacral bone which displays characteristic modifications.

LITERATURE

1. Boas, J. E. V.: (1929) Biologisch-anatomische Studien über den Hals der Vögel. – Danske Vidensk. Selsk. Sko., Naturv. Afd. 9, I, 3. – 2. Böker, H.: (1935) Vergleichende biologische Anatomie der Wirbeltiere. Gustav Fischer Jena, 103-121. – 3. GADOW, H.: (1891) In: Klassen und Ordnungen des Tierreichs, Ed. H. G. Bronn, Winter, Leipzig. Vol. 6, 46–47. – 4. CHERNEL, I.: (1899) Magyarország madarai. Guttenberg. Budapest, 387. – 5. LORENZ, K.: (1933) Beobachtungen über das Fliegen der Vögel und über die Beziehungen der Flügel und Steuerform zur Art des Fluges. J. Ornithol. 81, 107. – 6. MARSHALL, A. J.: (1960) Biology and Comparative Physiology of Birds. Academic Press New York, 289–304. – 7. MILLNE-EDWARDS, M. A.: (1867–68) Recherches anatomiques et paleontologiques pour servir l'histoire des oiseaux fossiles de la France. Masson Paris, 33–37, 428–429. – 8. STRESEMANN, E.: (1927–1934) Aves. In: Handbuch der Zoologie, Ed. W. Kükenthal. W. de Gruyter Berlin-Leipzig, 518–519. – 9. SZAKÁLL, GY.: (1897) Háziszárnyasok bonctana. Guttenberg Budapest, 18–19.

ÜBER DIE BEZIEHUNGEN ZWISCHEN DER THORAKALEN WIRBELSÄULE DER RAUBVÖGEL UND DEM BEUTEFANG

P. Péczely

Die Lebensweise der Vögel bringt gewisse Unterschiede bei der thorakalen Wirbelsäule mit sich. Der Mechanismus der thorakalen Wirbelsäule kann sich in zwei Richtungen spezialisieren, je nach dem, ob die Lebensweise vor allem Stabilität oder elastische Biegsamkeit erfordert. Unsere Raubvögel verfügen über beide Mechanismen, die den höchsten Entwicklungsgrad gerade bei diesen Arten erreichten.

In der Gattung *Falco* ist der letzte Halswirbel mit den vier Rückenwirbeln verwachsen, und sie bilden zusammen das Os dorsale. Dadurch verhält sich der Rumpf beim starken Zusammenprall beim Niederschlagen des Opfers sehr stabil. Der fünfte Rückenwirbel stellt eine bewegliche Verbindung zwischen dem Os dorsale und dem Os lumbosacrale her. Ein Nachteil dieses Mechanismus ist die geringe Biegsamkeit, und deshalb sind die Falken nicht fähig, so schnelle Wendungen und so plötzliche, in großem Winkel erfolgende Richtungsänderungen auszuführen, als die Habichte.

Der Mechanismus des elastisch-festen thorakalen Rückgratabschnittes erreicht in der Gattung *Accipiter* seine höchte Entwicklung. Die wendige, schnelle Flugfähigkeit dieser Arten steht im Einklang mit dem hierauf spezialisierten Typ der spinalen Wirbelsäule. Der elastischfeste Mechanismus besteht aus folgenden Komponenten: den lateralen Fortsätzen, der dorsalen Pars furcalis processus spinosi, ferner den speziellen Formen der Gelenkoberflächen. Ein Nachteil dieses Mechanismus ist die relativ geringe Festigkeit.

P. PÉCZELY

ФУНКЦИОНАЛЬНО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СВЯЗИ МЕЖДУ ИЗМЕНЕНИЯМИ ГРУДНОГО ОТРЕЗКА ПОЗВОНОЧНИКА ХИЩНЫХ ПТИЦ И ПРИОБРЕТЕНИЕМ ДОБЫЧИ

п. пецели

Специализация образа жизни птиц вызывает изменения также в области грудного отрезка позвоночного столба. Механизм грудного отрезка позвоночного столба может специализироваться в двух направлениях, в зависимости от того, требует ли образ жизни прежде всего прочности или упругой гибкости. У хищных птиц имеются оба механизма, которые развились наиболее совершенно именно у хищных птиц.

В роде соколиных последний шейный позвонок и первые четыре грудные позвонка срослись, образовав оs dorsale. Это создает очень большую стабильность туловища относительно весьма сильного столкновения при захвате жертвы. Пятый грудной позвонок создает подвижное соединение между os dorsale и os lumbosacrale. Недостатком этого механизма является незначительная гибкость позвоночного столба, поэтому соколы неспособны к таким быстрым поворотам и внезапному изменениях направления под большим углом, как напр. ястреб.

Упруго-прочный спинной участок позвоночного столба среди хищных птиц наиболее развит у рода Accipiter. Большая подвижность и быстролетность представителей этого рода согласуется с особым оформлением грудного отрезка позвоночного столба. Составными элементами упруго-прочного механизма являются латеральные отростки, pars furcalis processus spinosi, а также специальные формы суставных поверхностей. Недостатком этого механизма является его относительно меньшая прочность.

DR. P. PÉCZELY: Budapest, VIII. Puskin u. 3., Hungary
First Department of Surgery (Director: Prof. L. ΡόκΑ), University Medical School, and Army Hospital, Pécs

THE EFFECT OF AGING-INDUCED CHANGES OF COLLAGEN PROTEIN ON FIBRILLOGENESIS IN VITRO

M. NÉMETH-CSÓKA and MARIA KAISER

(Received July 12, 1963)

Differences in fibril formation have been demonstrated to exist between the neutral and acid collagen solutions obtained from rats of different age groups. With the advance of age the activation energy required for fibril formation decreased, and the factors enhancing fibril formation exerted a more marked effect on the collagen from old than from young animals. The phenomenon may be explained by an aging induced intramolecular transformation of collagen, so that the old collagen, which contains beta components, shows an increased tendency to nucleation, but this affects functional properties of the formed fibres unfavourably and also alters their morphological appearence.

Chemically, the changes caused by aging in connective tissue are characterized by an increase of cross bonds [2], a progression of the process of crossbinding. This process takes place in the interfibrillar, intermolecular [11], and also in the intramolecular [8a, b] dimensions alike. The intramolecular crossbinding process occurs in the elementary tropocollagen molecules the collagen fibres are composed of, so that the chains of the triple peptide spiral become linked with one another. The development of these bonds cannot be studied under physiological conditions, but after denaturation of the collagen three fractions can be demonstrated by ultracentrifugation, depending on the bonds. In the absence of bonds the molecule disintegrates into three peptide chains (alpha components). When two peptide chains are linked up the molecule falls apart into an alpha component and a beta component composed of two peptide chains [15], when all three peptide chains are linked to one another the socalled gamma component composed of a triple peptide chain is demonstrable [8a]. When young collagen, or collagen inhibited in maturation, is denaturated, it is mainly the alpha component that is demonstrable [8b], while in mature collagen the beta component is also demonstrable beside the alpha one.

On the basis of precipitability [6a, b, c], fractionation of the neutrally extractable, apparently uniform collagen solution yields A, B, and C fractions, of which on denaturation the C fraction contains more beta components than the other fractions [18c]. Fraction C is the one showing the greatest tendency to fibril formation.

As the formation of fibrils from collagen solutions depends also upon the intramolecular structure of the collagen molecules the solution is composed of

studies of fibrillogenesis in vitro seemed to be suitable for the investigation of that intramolecular change caused by aging.

We have subjected to study the differences in fibrillogenesis between collagen solutions obtained from rats of different ages, to answer the following questions.

1. Does aging cause changes in the so-called activation energy required for fibril formation?

2. How does the milieu (shifts in pH, protein and chondroitin sulphuric acid (in the following: ChSA) influence fibril formation at different ages?

3. What is the effect of slight denaturation on fibril formation at different ages?



Fig. 1. Precipitation of 100 mg per 100 ml neutral collagen dissolved in 2 M NaCl, at different temperatures. Ordinate: extinction. Abscissa: time from onset of experiment. The time required for precipitation, the so-called reaction time, is indicated by arrows

Materials and methods

Collagen solutions were isolated from rats of different ages. To obtain a neutral collagen solution, suitably prepared rat skin was extracted first with M/20 pH 7,1 buffer for a few hours, then with 2 M NaCl for 3 to 4 days at $+ 4^{\circ}$ C, by the method of COOPER and DEASY [4a, 5]. The viscous eluate obtained was centrifuged at 8000 r.p.m. for 30 minutes, and the supernatant was used for the study, after adjusting the collagen concentration to 80-100 mg per 100 ml, on the basis of the hydroxyproline value.

The energy required for fibril formation was calculated by *Bensusan* gelation test [1a]. The essence of this procedure is that on exposure to higher temperatures the collagen sol stable at $+4^{\circ}$ C precipitates, depending in rapidity on the temperature. In our studies the reaction time of fibril development was plotted against the temperatures applied.

The measure of gelation is expressed by the extinction of the turbidity determined in the cuvette. The reaction is biphasic, after the so-called flat phase comes a phase of logarithmic rise. The time required to reach the end point of the log phase was considered to be the reaction time (Fig. 1).

The energy of activation was computed on the basis of the Arrhenius formula,

ln. k =
$$\frac{H^{++}}{RT}$$
 + const.

In the formula the constant (frequency variant) does not change with the temperature, and a linear relationship is demonstrable between the reaction time and the reciprocal value of temperature expressed in absolute degrees.

Acta morph. tomus XIII.

120

Thus, the activation energy ${
m H}^+_+=$ ln. R $~{k\over 1/T}$. The quantity of ln. R being 4.57, and

using the reaction rate for k, therefore $\frac{k}{1/T}$ can be calculated as the tangent alpha of the correlation shown (Fig. 2).

Acid collagen solutions were prepared from rats of different ages. After extracting the rat skins first with a pH 7.1, M/20 phosphate buffer for 4 to 5 hours, then with 0.4 per cent acetic acid for 3 to 4 days, the extract was precipitpated by dialysis against tap water, then dissolved in 0.02 M acetic acid. For the tests, 100 mg per 100 ml solutions were prepared simultaneously. The preparations contained also 20 to 30 per cent non-collagen protein. To cause precipitation, the acid collagen solution was neutralized according to WOOD and KEECH [18a, 18b] by adding to 2.5 ml of collagen solution 4.5 ml of n sodium acetate solution. This mixture of pH 6.8 to 7.4 was measured the turbidity arising on fibril formation.



Fig. 2. Precipitation of neutral collagen, extracted from the skin of a 250 g rat (-...) and from that of a 50 g rat (-o-o) Ordinate: log 100/time [time = reaction time]. Abscissa: $1/T \times 10^3$ [T = absolute temperature]. The collagen from the younger rat shows a greater activation energy (calculations see in text)

The effects of substances influencing fibril formation were studied in a similar system, dissolving the substances in question in the sodium acetate solution serving for neutralization. To denature the acid collagen solution, it was kept at 37°C for various lengths of time, and examined then for precipitability and ChSA bond, on the addition of ChSA. The chemical composition of the fibrils obtained was tested as follows: total protein was assayed by the biuret method, the collagen content was computed from the hydroxyproline value, ChSA content was calculated from the hexuronic acid and hexosamine contents. The precipitated fibrils were examined by polarization microscopy by *Ebner*'s phenol reaction in paraffinembedded sections. The details of all these procedures have been described previously [14].

Results

1. Does aging cause changes in energy activation required for fibril formation?

The activation energy required for the formation of fibrils from a neutral collagen solution is influenced by several factors, first of all by the temperature interval employed. Therefore, the tests were made at the same temperature, at 20° to 26° C. Another factor influencing the activation energy is the concentration of collagen. The values found were 20 kcal at 200 mg per 100 ml, 31 kcal at 80 mg, and 50 kcal at 40 mg per 100 ml concentration. In the comparative studies 100 mg per 100 ml collagen solutions were used, at the same pH, ionic

strength and temperature interval. The activation energy of collagen isolated from young (50 g) rats proved to be 28 to 30 kcal, as opposed to the 11 to 15 kcal values for collagen extracted from old rats (weighing more than 250 g). This means that fibril formation from "young" collagen requires more energy than that from "old" collagen.



Fig. 3. Precipitation by neutralization of collagen solutions prepared from the skin of rats of different ages. Ordinate: extinction. Abscissa: time from onset of experiment. a) Neutralization only. b) Neutralization in presence of 30 mg per 100 ml of plasma protein. c) Neutralization in presence of 0.25 mg per 100 ml of ChSA. I. 50 g rat. II. 100 g rat. III. 250 g rat. In the collagen from old rat (curve III) fibrils are formed faster in response to both protein and ChSA

2. How does the milieu (pH, ChSA, protein effect) influence fibril formation at different ages?

The formation of fibrils in response to neutralization of acid collagen solutions was studied in solutions of collagen extracted from young, middleaged and old rats, using skin specimens from rats weighing 50 g, 100 g and over 250 g.

Precipitation at room temperature was induced the easiest in collagen of middle age, and easy in young or old collagen (Fig. 3a). This difference disappears, however, when neutralization is carried out at 37 °C or 56 °C, instead of

at room temperature. As a result of enhanced precipitation at these temperatures no difference is demonstrable between the three kinds of collagen. There is also a gradual decrease in the overall extinction values at higher temperatures.

In response to ChSA and plasma protein, old collagen shows the most rapid precipitation (Fig. 3). To cause precipitation at a similar rate in young collagen, about 5 to 10 times more ChSA is required (Fig. 4).



Fig. 4. Acid collagen solution extracted from young rat (50 g) skin. Precipitation induced by neutralization at different ChSA concentrations. Ordinate: extinction. Abscissa: time from onset of experiment. 1. In presence of 0.25 mg per 100 ml of ChSA. 2. In presence of 1.25 mg per 100 ml of ChSA. 3. In presence of 2.5 mg per 100 ml of ChSA. To cause the young collagen to precipitate as fast as the old one, a tenfold ChSA concentration is needed (see curve III in Fig. 3c)

As examined in embedded sections, the fibrils precipitated at 37 $^{\circ}$ C and 56 $^{\circ}$ C are thinner than those precipitated at room temperature. No such difference could be demonstrated between the collagens of different ages precipitated at an identical temperature.

3. What is the effect of slight denaturation on fibril formation at different ages?

The acid collagen solution was incubated at 37 $^{\circ}$ C for 1 to 11 hours, during which period no change in molecular weight was demonstrable (Fig. 5). The young and old collagens so preincubated showed a characteristic difference in response to neutralization (Fig. 6). As incubation progressed, fibril formation became protracted in the case of young collagen, but the fibrils obtained showed unchanged high extinction values. As opposed to this, less and less fibres could be produced from old collagen with the progress of previous denaturation, the maximum of turbidity continued to decrease. At the same time, the fibrils precipitated became thinner and thinner (Fig. 7). Thus, slight denaturation at 37 $^{\circ}$ C has a more intense effect on old than young collagen, retarding fibril formation in an increasing measure. As determined by studying the chemical

composition of the fibrils obtained by mixing 10 parts of collagen with 2,5 parts of ChSA, a characteristic change occurs in the combination with ChSA with the advance of age (Fig. 8). In general, combination with ChSA tends to decrease with the advance of age. Previous denaturation caused a temporary decrease in the collagen and ChSA contents of the fibrils. As preincubation progresses, in the embedded sections the fibrils become thinner and thinner, independently from age.



Fig. 5. Ultracentrifugal pattern of native acetic acid collagen solution. Solvent: 0.4 per cen acetic acid, collagen 2 mg/ml. u = 50,000/min, at 27.3 °C.

The single-component collagen protein shows the same pattern after preincubation at 37 °C for from 1 to 5 hours ("denaturation"), thus the intervention does not break up the molecule into components.

(The picture has been made at the Central Laboratory, University Medical School, Pécs. We are indebted to Mrs. S. Farnadi for assistance)

Discussion

Aging not only reduces the amount of extractable collagen [9a] and changes the intramolecular structure of the collagen molecules [8], but also alters the functional properties of the collagen solution. This is characterized by a change in fibril formation, in the first place.

Neutral, salt-extracted collagen solution is known to form a stable sol owing to the considerable hydrogen bridge binding capacity of water at low temperature [9b], but at higher temperatures fibrils are precipitated from this solution.

Likewise, in response to the ionic effect, on a shift in pH fibres precipitate from the acid collagen solution if to this colloids of a negative charge are added

in this case, some role falls to the free peptide-bonds [16], yet more importance is attributed to the free electrical charges of the collagen molecule [13, 1b]. Fibril formation is attributed to electrostatic attraction, the force of which under appropriate circumstances overcomes the repulsive resistance of the hydrate capsule, and as a result of the orienting action of the van der Waals



Fig. 6. Precipitation on neutralization of acid collagen solutions prepared from animals of different ages, following incubation at 37 °C ("denaturation"). a) collagen solution from young (50 g) rat. b) collagen solution from old (250 g) rat. Ordinate: turbidimetric values of formed fibrils. Abscissa: time required for precipitation. The numbers near the curves indicate the duration of preincubation, in minutes or hours. In response to denaturation, precipitation of the old collagen becomes protracted, extinction is lower than with young collagen

forces and of the specifically developing side to side electrostatic attraction fibrils are formed. Both types of fibril formation - from the neutral and acid collagen - take place in two phases.

In the first phase occurs the so-called nucleation, the unvisible development of the fibril's nucleus. The factors influencing fibril formation (temperature, ion effects, pH effect, polyanions, protein, etc.) are acting in this phase [18a, 18b).

In the second phase takes place the visible logarithmically accelerating development of the fibril. In this phase the above-mentioned factors do not influence fibril formation, or in the case of polyanions they exert some inhibitory effect. Since the most important property of fibril formation, nucleation,

takes place in the first phase, the recent studies have been focussed at that process. It is known from the experiments of FESSLER [6a, b, c] that from the point of view of fibril formation it is mainly the fraction C that is important,



Fig. 7. Phenol reaction of fibrils obtained from rats of different ages on neutralization from acid collagen solution after preincubation for 5 hours at 37 $^\circ$ C

Polarization microscopic appearance, magnification \times 100. a) collagen fibrils from young rat. b) collagen fibrils from old rat. In the case of old collagen the fibrils formed are thinner, corresponding with the decrease of the extinction values (see Fig. 6b)

which, when denatured, contains also beta components [18c]. WOOD separated the presumed nucleoles by ultracentrifugation, during the first phase of collagen development and induced fibril formation by inoculating with the nucleoles a stable collagen sol. As a matter of fact, the primary importance of nucleation was pointed out as early as 1942 by BUZÁGH [3].

The intramolecular changes of collagen protein caused by aging have extensively been studied by physicochemical methods, especially after denaturation and fractionation. Evidence is, however, scarce as to the changes caused by aging in the functional properties of extractable collagen [4b].



Fig. 8. Precipitation of acid collagen solutions prepared from rats of different ages in response to ChSA, (collagen — ChSA ratio 10:2.5) following preincubation of acid collagen at 37° C for various lengths of time. I. Acid collagen from young (50 g) rat. II. Acid collagen from 100 g rat. III. Acid collagen from old (250 g) rat. Right columns: ChSA added. Left columns: collagens mixed. In the left columns the black part represents the collagen protein precipitated in the fibrils. In the right columns the shaded part represents the precipitated ChSA. The numbers above the columns indicate the duration of preincubation, those under the columns show the ChSA content of the fibrils. With the advance of age the ChSA bound to the fibrils decreases from 20-36 per cent to 19-24 per cent. At the same time, in response to preincubation, the ChSA content of the fibrils first decreases then increases

The study of this problem was the aim of our investigations i.e. to demonstrate that collagen solutions prepared from older animals yielded fibres easier and assuming that the beta-type linkages present in them would increase the tendency to nucleation. This was suggested by the decrease from 28-30 kcal to 11-15 kcal of the activation energy with the advance of age, as well as by the circumstance that protein or ChSA increased to a much greater extent the formation of fibres from old than from young collagen, or that much higher ChSA concentrations were required to induce an identical measure of fibril formation from young than from old collagen. Although with the advance of its age, it becomes easier and easier to causue the soluble collagen to precipitate, it was

3*

denatured easier and the structural stability of the fibres underwent a decrease. Without altering the molecular weight, gentle denaturation presumably causes a reversible change in the helical structure [7], but this manifests itself mainly in a change in nucleation, in the first phase of fibril formation. The formed fibrils then differ from one another in morphological properties, as well as in the dynamics of the fibrillogenesis. Thus, the intramolecular transformation of the tropocollagen molecules, which decreases with age [17], does not enhance fibril formation, denaturation is more apt to alter the character of the fibrils, and this may explain the torpid reaction of connective tissue in old age. Under the conditions employed, the young, active collagen, composed of alpha components, shows a tendency to yield functionally and structurally more stable collagen fibres.

REFERENCES

1/a BENSUSAN, H. B., HOYT, B. L.: (1958) The Effect of Various Parameters on the Rate of Formation Fiber from Collagen Solutions. J. Amer. Chem. Soc. 80, 719. - 1/b BENSUSAN, H. B., MUMAW, V. R., SCANU, A. W.: (1962) Fiber Formation from Solutions of Collagen. IV. On the Role of the Basic Amino Acid Residues. Biochemistry 1, 215. – 2. BJORKSTEN, J.: (1962) Aging: Present Status of Our Chemical Knowledge. J. Amer. Geriat. Soc. 10, 125. - 3. BUZÁGH. A.: (1942) Über die Bedingungen der Entstehung künstlicher Kollagenfasern. Kolloid Z. 101. 149. - 4/a COOPER, D. R., JOHNSON, P.: (1957) The Soluble Proteins of Bovine Hide I. Extraction by Aqueous Sodium Chloride. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 26, 317. - 4/b COOPER, D. R.: (1957) The Formation of Fibrils from Extracts of Bovine Hide. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 26, 330. – 5. DEASY, C.: (1959) Some Notes on the Problem of the Preparation of Pure Fibrous Collagen. J. Amer. Leather Chem. Ass. 54, 246. – 6/a FESSLER, J. H.: (1957) Fractionation of Neutral Salt Soluble Collagen Using Temperature Dependence of Solubility. Fed. Proc. 16, 37. - 6/b FESSLER, J. H.: (1960) Some Properties of Neutral-Salt-Soluble Collagen. 1. Biochem. J. 76, 452. - 6/c FESSLER, J. H.: (1960) Some Properties of Neutral-Salt-Soluble Collagen. 2. Biochem. J. 76, 463. - 7. FLORY, P. J., WEAVER, E. S.: (1960) Helix Coil Transitions in Dilute Aqueous Collagen Solutions. J. Amer. chem. Soc. 82, 4518. - 8/a GRASS-MANN, W., HANNIG, K., ENGEL, J.: (1961) Das quantitative Verhältnis zwischen alfa- und beta-Komponenten des denaturierten, löslichen Kollagens in der Ultrazentrifuge, sowie Beschreibung einer schneller sedimentierenden gamma-Komponente. Hoppe Seylers Z. physiol. Chem. 324, 284. - 8/b GRASSMANN, W.: (1963) The Structure of the Collagen Fiber and its Significance in Technology. Collagen Curr. 3, 35. - 9/a GRoss, J.: (1958) Studies on the Formation of Collagen II. The Influence of Growth Rate on Neutral-Salt Extracts of Guinea-Pig Dermis. J. exp. Med. 107, 265. - 9/b Gross, J.: (1958) Studies on the Formation of Collagen III. Time-Depent Solubility Changes of Collagen in vitro. J. exp. Med. 108, 215. - 10. HANNIG, K., ENGEL, J.: (1961) Physikalisch-chemische Untersuchungen an Tropokollagenlösungen. Leder 12, 213. - 11. Hör-MANN, H.: (1962) Zur Frage der Quervernetzung von Kollagen. Leder 13, 79. – 12. KEECH, M. K.: (1961) The Formation of Fibrils from Collagen Solutions. Effect of Mucopolysaccharides and Nucleic Acids: An Electron Microscope Study. J. biophys. biochem. Cytol. 9, 193. 13. KÜHN, K., ZIMMER, E.: (1961) Eigenschaften des Tropokollagen-Moleküls und dessen Bedeutung für die Fibrillenbildung. U. Naturforsch. 16b, 648. – 14. Néметн-Csóка, М.: (1961) Untersuchungen über die Kollagenfasern II. Teil. Vergleichende chemische, polarisations- und elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Kollagenfasern mit Chondroitinschwefel-säure als Grundsubstanz. Acta histochem. (Jena) 12, 255. — 15. Опесноvісн, W. N., Sири-KITER, W. O.: (1958) Sedimentation und Diffusion der alfa- und beta-Komponenten von Prokollagen und ihr Mengenverhältnis in diesem Eiweiß. Biokhimiya 23, 285. cit. Chem. Zbl. (1960) 47, 13 256. – 16. VINOGRADOV, J. R., BELLO, J.: (1958) The Biuret Complex of Gelatin and the Mechanism of Gelation. Nature, (Lond) 181, 273. – 17. WIRSCHAFTLER, Z. T., BENTLEY, J. P.: (1962) The Influence of Age and Growth Rate on the Extractable Collagen of Skin of Normal Rats. Lab. Invest. 11, 316. - 18/a WOOD, G. C., KEECH, M. K.: (1960) The Formation of Fibrils from Collagen Solutions: I. The Effect of Experimental Conditions, Kinetic and Electronmicroscope Studies. Biochem. J. 75, 588. - 18/b WOOD, G. C.: (1960) III. Effect of Chondroitin

Sulphate and Some Other Naturally Occurring Polyanions on the Rate of Formation. Biochem. J. 75, 605. - 18/c WOOD, G. C.: (1962) The Heterogeneity of Collagen Solutions and Its Effect on Fibril Formation. Biochem. J. 84, 429.

Acknowledgements

We are indebted to Mrs. I. Echer and Mrs. S. Czipó for skilful technical assistance.

WIRKUNG VON ALTERSVERÄNDERUNGEN AUF DIE FIBRILLOGENESE IN VITRO

M. NÉMETH-CSÓKA und M. KAISER

Aus Ratten verschiedener Altersgruppen (50, 100, 250 g wiegenden Tieren) gewonnene neutrale und saure Kollagenlösungen zeigen hinsichtlich der Fasernbildung gewisse Unterschiede: mit zunehmendem Alter verminderte sich die zur Fasernbildung nötige Aktivierungsenergie bzw. die die Fasernbildung beschleunigenden Faktoren wirkten stärker auf die aus älteren Ratten gewonnene Kollagenlösung. Diese Erscheinung läßt sich mit der altersbedingten intramolekularen Transformation des Kollagens erklären, und zwar in der Weise, daß das ältere Kollagen, das beta-Komponente enthält, eine größere Affinität zur Nukleation zeigt. Diese Erscheinung wirkt sich aber auf die funktionellen Eigenschaften der sich bildenden Fasern ungünstig aus bzw. ändert deren morphologisches Bild.

ДЕЙСТВИЕ ВОЗРАСТНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ КОЛЛАГЕННЫХ БЕЛКОВ НА ФИБРИЛЛОГЕНЕЗ IN VITRO

М. НЕМЕТ-ЧОКА и М. КАЙЗЕР

Нейтральный и кислый коллагенные растворы, полученные от крыс различных возрастных групп (весом в 50, 100, 250 г) показали различия в отношении образования волокон: по мере старения энергия активации, необходимая для образования волокон, снижалась, или же ускоряющие образование волокон факторы оказывали более выраженное действие на коллагенный раствор, взятый от группы более старых животных. Это явление можно объяснить внутримолекулярными превращениями коллагена, вызванными старением, а именно,старый коллаген, содержащий бета-компоненты, обладает большей склонностью к нуклеации. Однако это неблагоприятно сказывается на функциональных особенностях образующихся волокон, то есть изменяет их морфологическую картину.

Dr. M. Néметн-Csóka Dr. Maria Kaiser Pécs, Dischka Győző u. 7., Hungary 129



Lehrstuhl für Zoologie (Leiter: M. A. SCHEREBZOW) des Pedagogischen Institutes, Kremenetz, USSR

ANGABEN ÜBER DIE MORPHOLOGIE DER NERVENFASERN IN EINIGEN NERVEN VON HAUSTIEREN

M. A. Scherebzow

(Eingegangen am Dezember 3, 1963)

Unsere Untersuchungsmethode kann zur Erforschung der Morphologie der Nervenfasern in verschiedenen Nerven zusammen mit der Methode der Querschnitte und der Elektronmikroskopie angewandt werden.

Die Gewebe der somatischen Organsysteme werden von dicken und mittleren (motorischen und sensorischen) markhaltigen Fasern innerviert. Für die vegetativen Nerven sind dünne markarme und marklose Fasern charakteristisch, mit ovalen oder verlängerten Kernen der Schwannschen Hülle, vorwiegend ohne Einschnürungen, welche aber bei der Myelinisation oder mit dem Alter erscheinen können.

In den vegetativen Nerven, welche zu den inneren Organen laufen, befinden sich dicke und mittlere markhaltige Fasern, die wir zu den sensorischen Fasern zählen.

Im Laufe der Geschichte der Erforschung der morphophysiologischen Eigenschaften der Nervenfasern verschiedener Nerven des Menschen und der Tiere, waren die letzten Jahrzehnte besonders produktiv. In erster Reihe war das der Anwendung elektronmikroskopischer und elektrophysiologischer Forschungsmethoden zu verdanken. Es ist allgemein anerkannt, daß solche physiologischen Eigenschaften der Nervenfasern, wie die Impulsleitungsgeschwindigkeit, die Schwelle der Erregbarkeit, die Dauer der refraktären Phase usw. in engem Zusammenhang mit den Besonderheiten der Struktur stehen. Endgültig festgestellt ist die Polyaxonalität der marklosen Nervenfasern im Gegensatz zu den monoaxonalen markhaltigen Fasern (NAGEOTTE 1932; DOJNIKOV 1933, 1935; DOUGLASS 1933, LAWRENTJEV und PORTUGALOW 1936; u. a.), obwohl die Lage der Axone in bezug auf das Schwannsche Syncytium bei beiden Arten von Nervenfasern prinzipiell dieselbe ist (GASSER 1955, HESS 1956).

Bis jetzt wurden jedoch keine ausreichend genaue morphologische Kriterien zur Charakterisierung physiologischer Eigenschaften der Nervenfasern gefunden, und folglich gibt es auch keine zufriedenstellende morphophysiologische Klassifikation. Diese Lage steht in engem Zusammenhang mit dem Fehlen einheitlicher Ansichten über einige prinzipielle Fragen der Struktur des Nervensystems, besonders ihres vegetativen Abschnittes. Einige Forscher bestreiten z. B. die Individualität des motorischen Neurons des vegetativen Nervensystems (KNOCHE 1952, 1954; JABONERO 1953, 1955, u. a.) und die Bestimmung des morphologischen Substrates der sympathischen und parasympathischen Innervation ist auch nicht völlig geklärt. All das weist auf die Not-

M. A. SCHEREBZOW

wendigkeit der weiteren Untersuchung der Morphologie und Physiologie der Nervenfasern als ein wichtiges Glied des Reflexbogens hin. Es ist klar, daß die Untersuchungen mit verschiedenen Methoden durchgeführt werden und einander ergänzen müssen.

Eine der bemerkenswerten Methoden der Untersuchung der Struktur der Nervenfasern ist die Nervenzerfaserung nach der Modifikation von WOROBJOW (1931). Ein Ende des mit Weigertschem Eisenhämatoxylin gefärbten Nervenabschnittes wird auf einen Objektträger befestigt, das andere Ende unter Lupenkontrolle mittels einer spitzen Präparationsnadel in Form eines Pinsels in einzelne Fasern oder in Gruppen von 2-3 Fasern zerlegt. Das fertige Präparat wird unter dem Mikroskop untersucht. Im Vergleich zur Methode der Querschnitte besitzt obige Methode den Vorteil, daß man die Nervenfasern und ihre Struktur im ganzen Verlauf untersuchen kann. An den mit Eisenhämatoxylin gefärbten Fasern sind im Gegensatz zu den mit Silber imprägnierten Präparaten die Ranvierschen Einschnürungen, die Lantermannschen Einkerbungen, die Kerne des Schwannschen Syncytiums, der Achsenzylinder sowie die Konturen der Fasern gut sichtbar. Unzulänglichkeit dieser Methode ist, daß ihre Durchführung viel Arbeit erfordert, weiterhin die Schwierigkeit der Zusammenzählung der dünnen Fasern und die Unmöglichkeit, die dünnen markhaltigen Fasern von den marklosen Fasern zu differenzieren. Deshalb ist es wünschenswert, die Zählung mittels der Methode der Querschnitte durchzuführen.

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, die Charakteristik der Nervenfasern einiger Nerven von Haustieren zu besprechen. Wenn wir die Morphologie der Fasern einzelner Nerven mit den physiologischen Besonderheiten des durch diesen Nerv innervierten Organs oder Gewebes vergleichen, so kann man bis zu einem gewissen Grade ein Bild über die funktionellen Eigenschaften der Nervenfasern und des Nerven als Ganzes bekommen.

Mittels obiger Methode untersuchten wir die Nerven von drei erwachsenen Hunden, zwei Pferden und zwei Schweinen, und zwar die dorsalen und ventralen Wurzeln der thorakalen Rückenmarknerven, die weißen und grauen Äste des Thorakalabschnittes, den vagosympathischen Stamm im Gebiete des mittleren Halsdrittels, den Anfangsteil des N. vertebralis, den N. splanchnicus major, die Herzäste des N. vagus und des sympathischen Grenzstammes, sowie die Äste zur Lunge, die dorsalen und ventralen Oesophagusäste des Vagus, den N. epigastricus, N. ovarialis, pelvicus, pudendus, phrenicus, die Hautnerven der Brust, die Muskeläste des N. ischiadicus, die zur Gebärmutter und zur Vulva laufenden Äste des Plexus pelvicus, und die des Plexus solaris zur Leber und zum Darm. Es wurden alle Bündel der obengenannten Nerven untersucht und mehr als 400 Präparate verfertigt.

Die Untersuchungen zeigten folgende Ergebnisse: In den dorsalen und ventralen Wurzeln der thorakalen Rückenmarknerven herrschen die dicken markhaltigen Fasern mit einem Durchmesser von 16-25 Mikron und ziemlich häufigen Lantermannschen Einkerbungen vor. In den ventralen Wurzeln sind etwas mehr (68%) als in den dorsalen Wurzeln (58%), außerdem gibt es eine große Menge von markarmen Fasern mit ovalen Kernen der Schwannschen Hülle (von 25% in den ventralen und 32% in den dorsalen Wurzeln) und sehr wenig (1,5-6,0%) dünne marklose Fasern mit spindelförmigen Kernen der Schwannschen Hülle.

Die Mehrzahl der markarmen Fasern der ventralen Wurzeln gehört zu dem R. communicans albus, welcher innerhalb dieser Wurzeln verläuft, und nach unseren Angaben hauptsächlich aus solchen Fasern besteht.

Die dicken markhaltigen Fasern bilden die Mehrheit auch in den anderen motorischen, vorwiegend somatischen (N. phrenicus: 95%; N. intercostalis: 70%), sowie den sensorischen Nerven (Thorakale Hautnerven: 80%). Wesentliche morphologische Unterschiede zwischen den markhaltigen Fasern der motorischen und der sensorischen somatischen Nerven konnten nicht festgestellt werden. In diesen Nerven befindet sich eine relativ geringe Anzahl von markarmen und marklosen Fasern mit mehr oder weniger verlängerten Kernen der Schwannschen Hülle mit einem Durchmesser von 1-4 Mikron.

In den Muskelästen des N. ischiadicus ist die Zusammensetzung der Nervenfasern ziemlich verschieden; man findet 38-50% dicke, 7-11% mittlere und ebensoviele dünne markhaltige Fasern, sowie viele (30-42%) marklose und markarme Fasern mit spindelförmigen Kernen der Schwannschen Hülle. Es ist bekannt, daß die statischen sowie die dynamischen Muskeln von Nerven innerviert werden, deren Fasernzusammensetzung verschieden ist.

Diejenigen Nerven, welche in den Lehrbüchern sowie in der Fachliteratur sympathische Nerven genannt werden (sympathischer Grenzstamm in den Brust- und Halsgebieten, N. vertebralis, N. splanchnicus major, N. hypogastricus, NN. ovarialis), bestehen vorwiegend aus markarmen oder marklosen Fasern mit einem Durchmesser von 2-5 Mikron und oval verlängerten Kernen der Schwannschen Hülle ohne Einschnürungen und mit gut sichtbaren Einkerbungen. Dasselbe bezieht sich auch auf die grauen RR. communicantes, aber in einigen von ihnen gibt es eine große Menge (bis zu 20%) dicker markhaltiger Fasern. Dieses Bild sehen wir z. B. an dem Ast, welcher vom Ganglion stellatum zum N. intercostalis I. geht.

Der N. vagus besteht im mittleren Drittel des Halses aus typischen markhaltigen Fasern verschiedenen Kalibers (bis zu 20%), aus markarmen Fasern mit ovalen Kernen der Schwannschen Hülle (bis zu 60%) und aus dünnen marklosen Fasern mit spindelartigen Kernen (bis zu 22%). Dieselbe Zusammensetzung zeigen die Fasern in einigen zu den Lungen und zum Herzen laufenden Ästen des N. vagus.

Die dorsalen und ventralen Ösophagusäste des N. vagus bestehen fast ausschließlich aus markarmen und marklosen Fasern mit ovalen verlängerten und spindelförmigen Kernen der Schwannschen Hülle.

Die Zusammensetzung der Fasern des N. pelvicus ist mit denen des Halsabschnittes des N. vagus analog.



Abb. 1. Die Nervenfasern des N. vagus des Hundes im mittleren Drittel des Halses. Färbung Weigertsches Eisenhämatoxylin. MBI-3, Obj: 20. Ok: 15 Abb. 2. Nervenfasern des Tr. sympathicus des Hundes im mittleren Drittel des Halses. Fär-

bung: Weigertsches Eisenhämatoxylin. MBI-3, Obj: 20, Ok: 15 Abb. 3. Nervenfasern des Tr. oesophagealis N. vagi ventralis. Färbung: Weigertsches Eisen-hämatoxylin. MBI-3, Obj: 20, Ok: 15



Abb. 4. Nervenfasern des N. splanchnicus major des Hundes. Färbung: Weigertsches Eisenhämatoxylin. MBI-3, Obj: 20, Ok: 15
 Abb. 5. Nervenfasern des N. phrenicus des Hundes. Färbung: Weigertsches Eisenhämatoxylin

MBI-3, Obj: 20, Ok: 15

Abb. 6. Nervenfasern des R. muscularis N. ischiadici des Pferdes. Färbung: Weigertsches Eisenhämatoxylin. Reichert-3, Obj: 66, Ok: 4

M. A. SCHEREBZOW

Besprechung

Die von uns angewandte Methode wurde vor mehr als 30 Jahren im Worobjows Laboratorium ausgearbeitet. WOROBJOW (1931) und seine Schüler (BROMBERG 1948, MAXIMOWITSCH 1948, OTELIN 1948) teilten alle Nervenfasern in markhaltige, - welche sie als somatische Nervenfasern betrachteten - und in markfreie Fasern ein. Zwischen den letzteren hoben sie die dicken marklosen Fasern mit ovalen Kernen der Schwannschen Hülle hervor, welche sie als sympathische Fasern bezeichneten und die marklosen Fasern mit spindelartigen Kernen, welche sie zu den parasympathischen zählten. Später wurde dieselbe Methodik auch an der Kasaner Tierärztlichen Hochschule (MINDUBAJEW 1956, 1959, 1960, MICHAJLOW 1961, 1962, u. a.) angewandt. Diese Verfasser unternahmen Versuche zur morphologischen Klassifikation der Nervenfasern. MINDUBAJEW (1959) unterscheidet 6 Arten von Nervenfasern, und zwar 3 Arten von markhaltigen (dicke, mittlere und dünne) und 3 marklose Fasern, welche hauptsächlich nach der Form der Kerne der Schwannschen Hülle unterschieden werden. MICHAJLOW (1962) beschrieb bei Vögeln ebenfalls 6 Arten von Nervenfasern, wovon 4 markhaltig und 2 marklos sind. Beide Verfasser nehmen zur Grundlage ihrer Klassifikation den Durchmesser der Nervenfasern, die Form der Kerne der Schwannschen Hülle sowie die Anwesenheit oder das Fehlen einer Myelinhülle mit Ranvierschen Einschnürungen und Lantermannschen Einkerbungen. Sie versuchten auch einen Zusammenhang zwischen den morphologischen und den funktionellen Eigenschaften zu finden. Beachtung verdient die Meinung MICHAJLOWS (1962), wonach die Besonderheiten der Struktur der Nervenfasern von dem innervierten Gewebe abhängen.

Auf Grund dieser und vorhergehender (1961--1963) Untersuchungen unterscheiden wir 5 Hauptgruppen von Nervenfasern in den Nerven von Haustieren.

1. Dicke markhaltige Fasern (Durchmesser 16-20 Mikron und mehr);

2. mittlere markhaltige Fasern (Durchmesser 8-15 Mikron) und

3. dünne markhaltige Fasern (Durchmesser 3-7 Mikron). Charakteristisch für diese sind die ausgesprochenen Ranvierschen Einschnürungen und Schmidt-Lantermannschen Einkerbungen. Die Einkerbungen sind umso häufiger, je dicker die Faser ist.

4. Markarme und marklose Fasern mit einem Durchmesser von 1-5Mikron, ohne gut sichtbare Einkerbungen und meistens Einschnürungen, mit ovalen Kernen der Schwannschen Hülle.

5. Dünne (1–2 Mikron) marklose Fasern mit spindelartigen Kernen der Schwannschen Hülle, deren Durchmesser denjenigen der Fasern übersteigt.

Diese Klassifikation entspricht im Grunde den Klassifikationen von MICHAJLOW und MINDUBAJEW, sowie ERLANGER und GASSER (1937).

Die Literaturangaben und eigenen Untersuchungen zeigen, daß die Fasern der ersten 3 Gruppen für die somatischen Nerven charakteristisch sind.

Starkes Überwiegen der dicken markhaltigen Fasern in den ventralen und dorsalen Wurzeln der Rückenmarknerven, im Zwerchfellnerv, den Hautnerven der Brust und in anderen Nerven erlaubt uns, sie als typische motorische und sensorische Fasern zu betrachten. Als afferente somatische Fasern betrachten wir weiterhin die dicken markhaltigen Fasern in einigen Herz- und Lungenästen des N. vagus und des N. sympathicus und in einigen zu den Beckenorganen laufenden Ästen des Beckennerves usw.

Die dünnen markhaltigen Fasern gehören ihrer Struktur nach zu den Fasern der 4. Gruppe. Wir finden sie in fast allen vegetativen und in den Muskelästen der somatischen Nerven. Anscheinend sind diese afferente Fasern, bei denen der Myelinisationsprozeß in Anbetracht der spezifischen Funktion der innervierten Organe behindert ist.

Die Fasern der 4. und 5. Gruppen sind charakteristisch für die vegetativen Nerven, wo sie dominieren. Auf Grund ausführlicher Untersuchungen überzeugten wir uns davon, daß die Morphologie der Fasern der 4. Gruppe in bezug auf Alter und Funktion sehr labil ist. Wir stellten fest, daß sie mit dem Alter und in den Perioden der funktionellen Aktivität der innervierten Organe myelinisationsfähig werden (1962). An vielen dieser Fasern kann man manchmal genau Einschnürungen sehen, weshalb diese Fasern auch von MINDUBAJEW als eine besondere Gruppe betrachtet wurden. Manchmal kann man auch die Lantermannschen Einkerbungen klar sehen, was bei Myelinisation gesetzmäßig ist. Wir müssen darauf hinweisen, daß bei gleichen Fixierungs- und Färbungsbedingungen die Einkerbungen an den Fasern der somatischen Nerven viel besser sichtbar sind als an denen (sogar an den dicken markhaltigen Fasern) der vegetativen Nerven. Die Form der Kerne der Schwannschen Hülle der zur 4. Gruppe gehörenden Fasern ist verschieden, rund bis stark verlängert. In Anbetracht dessen, daß Übergangsformen existieren, gibt es keine scharfe morphologische Grenze zwischen den Fasern der 4. und 5. Gruppe. Das Überwiegen der Fasern dieser Gruppen in den Nerven der Leber, des Magens, des Darmes, der Gebärmutter, der Harnblase und in den Gefäßnerven weist auf den engen Zusammenhang zwischen diesen Nerven und der glatten Muskulatur sowie den Drüsen und dem Bindegewebe.

Die Differenzierung dieser Fasern in motorische und sensorische ist nicht möglich. Es ist unwahrscheinlich, daß die afferenten Fasern irgendeines Gewebes sich morphologisch wesentlich von den afferenten Fasern unterscheiden, welche dasselbe Gewebe innervieren (Abb. 1-6.).

137

LITERATUR

1. Бромберг, Э. Д.: (1948) Строение n. oculomotorius собаки. Материалы к макромикроскопии вегетативной нервной системы и желез слизистых оболочек и кожи. М. 190-195. — Воробьев, В. П.: (1958) Исследование нервной системы человека и животных. В кн. «Избранные труды» Медгиз, 29—113. — Григорьева, Т. А.: (1957) Строение безмя-котных нервных волокон. Арх. анат., гистол., эмбриол. XXXIV 1, 121—128. — Дойников, Б. С.: (1961) Цитир. по Т. А. Григорьевой, там же. — Жеребисв, Н. А.: К вопросу о морфологии нервов скелетных мышц у некоторых домашних животных. Учен. зап. Казан. ветер. ин-та 80, 173-177. — Он же.: (1962) Возрастные особенности морфологии нервных волокон в половых органах крупного рогатого скота и собак. Тез. докл совещания по проблеме: «Закономерности индивидуального развития сельскохозяйственных животных. Вып. 1. М., 48. — Он же.: (1963) Некоторые вопросы возрастной морфологии иннервации внутренних половых органов у самок домашних животных. Тез. докл. отчетно-научной конференции Кременецкого пединститута. Кременец. 38-39. — Лаврентьев, Б. И.: (1946) К вопросу о строении безмякотных нервных волокон в периферических нервных сплетениях. Сб. «Морфология автономной нервной системы» Медгиз. М. — Максимович. Н. А.: (1948) Строение п. phrenicus человека. Материалы к макромикроскопии вегетативной нервной системы и желез слизистых оболочек и кожи. Медгиз. 200-204. — Миндубаев, Ю. Х.: (1955) Скелетотопия спинного мозга и взаимосвязи спинномозговых и симпатических нервов. Диссертация. Казань. — Он же.: (1959) Материалы по внутриствольному строению периферических нервов. Бюлл. Татарск. республ. отд. Всесоюзн. научн. об-ва анат., гистол. и эмбриологов вып. 2. Казань. 103—106. — Он же.: (1960) Вегетативная иннервация органов грудной, брюшной и тазовой полостей у домашних животных. Лиссертация. Казань. - Михайлов, Н. В. (1961) Биомеханические комплексы заплюсны. коленного сустава и их роль в движении лошади. Учен. зап. Казан. ветер. ин-та 80, 139-154. — Он же.: (1962) О макро-микроморфологии грудных спинномозговых нервов птиц в связи с биомеханикой их грудной клетки. Учен. зап. Казан. ветер. ин-та 85, 61-73. Отелин, А. А.: (1948) Строение корешков блуждающего нерва человека. Материалы к макромикроскопии вегетативной нервной системы и желез слизистых оболочек и кожи. Медгиз. 196-199. - Португалов, В. В.: (1946) Строение безмякотных нервных волокон периферических нервов. Сб. «Морфология вегетативной нервной системы». Медгиз, М. Сагеева, С. А.: (1963) Материалы к сравнительной анатомии добавочного нерва (XI) пары у некоторых млекопитающих. Диссертация. Казань. 2. Douglass, Т. С.: (1933) Могphology of Unmyelinated Nerve Fibers. Anat. Rec. 55, Suppl. 4, 55. - GASSER, H. S.: (1955) Properties of Dorsal Root Unmedullated Fibers on the Two Sides of the Ganglion. J. gen. Physiol. 38, 5. – HESS, A.: (1956) The Fine Structure and Morphological Organization of Non-Myelinated Nerve Fibre. Proc. Roy. Soc. (B), 144, 496, 917. – KNOCHE, H.: (1952) Über die feine Innervation der Art. uterina des Menschen. Zugleich ein Beitrag zum Bau der neurovegetativen Endformation. Zellforsch. 37, 3. - KNOCHE, H.: (1954) Untersuchungen von vegetativen Nervenfasern. Zellforsch. 40, 162. – JABONERO, V.: (1955) Die anatomischen Grundlagen der peripheren Neurosecretion. Acta neuroveget. (Wien). Suppl. 6, 159.

MORPHOLOGY OF NERVE FIBRES IN CERTAIN NERVES OF DOMESTIC ANIMALS

M. A. Sherebtsov

A method has been worked out which together with the cross section technique and electron microscopy allows a clear view of the morphology of diverse nerve fibres. The findings yielded by these methods were as follows.

Somatic organs are innervated by thick and medium-sized (motor and sensory) myelinated fibres. The nerves of the autonomic nervous system are characterized by thin, unmyelinated or poorly myelinated fibres; the nuclei in the cells of Schwann's sheath are oval or elongated; these nuclei show no constrictions, but such may appear along with myelination or with advancing age.

Nerves of the automic system which run toward the inner organs contain thick or moderately thick myelinated fibres which are thought to represent sensory fibres.

ANGABEN ÜBER DIE MORPHOLOGIE DER NERVENFASERN

ДАННЫЕ О МОРФОЛОГИИ НЕРВНЫХ ВОЛОКОН В НЕКОТОРЫХ НЕРВАХ ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ

М. А. ШЕРЕБЦОВ

Предложенный автором метод исследования можно применять параллельно с методом поперечных сечений и электронной микроскопии для изучения морфологии нервных волокон в различных нервах.

Ткани соматических систем органов иннервируются толстыми и среднее-толстыми (двигательными и чувствительными) мякотными волокнами. Для вегетативных нервов характерны тонкие, бедные мякотыю и безмякотные волокна с овальными или продолговатыми ядрами в Шванновской оболочке, в большинстве случаев без отшнуровываний. Однако, в ходе миэлинизации или при старении отшнуровывания могут появиться.

В вегетативных нервах, идущих к внутренним органам, имеются толстые и среднетолстые мякотные волокна, относящиеся, по мнению автора, к чувствительным нервным волокнам.

M. A. SCHEREBZOW: Kremenez, Lehrstuhl für Zoologie, Pädagogisches Institut, USSR



Institute of Anatomy, Histology and Embryology (Director: Prof. St. KROMPECHER), University Medical School, Debrecen

INVESTIGATION OF THE MUCOPOLYSACCHARIDES IN THE PROXIMAL EPIPHYSEAL CARTILAGE OF THE RAT: A COMPARISON OF THE METHODS OF HISTOCHEMICAL ASSAY

I. FÖLDES, L. MÓDIS and ILDIKÓ SÜVEGES

(Received August 6, 1963)

Comparative investigations have been carried out on the proximal epiphyseal cartilage of the tibia of 30 and 85 day-old rats in order to determine the value of histochemical methods used for the demonstration of mucopolysaccharides.

It is emphasized that when judging the histochemical results the biochemical data of the examined organ must also be considered. In the case of epiphyseal cartilages the following methods seem to be adequate for the demonstration of mucopoly-saccharides.

1. For acid mucopolysaccharides (chondroitin sulphate A and C) the Hale reaction (especially with Ritter-Oleson's technique) and its modification according to MÜLLER at low pH levels, as well as the toluidine blue, gamma metachromasia, methylene blue below pH 2,0, the Astra violet and Alcian blue, reactions provided they are sensitive to hyaluronidase.

2. Schiff's periodic acid reaction proved to be adequate for the demonstration of mucopolysaccharide-protein complexes, as it does not respond to saliva digestion, is suppressed by acetylation and moderately restored following desacetylation. It is sensitive to pepsin, trypsin and mucoproteinase, giving at the same time beta metachromasia with toluidine blue and a blue reaction with methylene blue, at low pH level.

3. For the demonstration of weakly acid mucopolysaccharides, WOLMAN's reaction seems to be suitable, as well as methylene blue at high pH levels, and also toluidine blue beta metachromasia.

Introduction

There is no general agreement on the value of the different methods used for the demonstration of mucopolysaccharides, chiefly owing to the differences in technique and material applied by the different authors. The purpose of the present study has been a comparison of the different methods used for the demonstration of mucopolysaccharides, on the same material, the epiphyseal cartilage.

Similar investigations were carried out by HADHÁZY and PERJÉS in this Institute [33] on the regenerating articular surface of the knee-joint of dogs, by MALINSKY [53, 54] on the intervertebral disk of human embryos, and BÉ-LANGER and MIGICOVSKY [13] on the epiphyseal cartilage of chick embryos. These authors studied the histochemical demonstration of carbohydrates while MÜLLER [67] investigated glucose absorption. ZACCHEO and VIALE [91] have made an attempt to establish the value of the histochemical methods used for the demonstration of different mucopolysaccharides.

I. FÖLDES, L. MÓDIS and I. SÜVEGES

Material and method

The material was the proximal epiphyseal cartilage of 30 and 85 day-old rats. The methods employed were RITTER-OLESON'S, HALE'S, SCHIFF'S periodic acid (PAS), HALE'S method in MÜLLER'S modification toluidine blue, methylene blue (at various pH values), Alcian blue, Astra violet, WOLMAN'S colloid gold 89, 90, methylgreen pyronine and the Feulgen reaction. The methods were complemented with acetylation, desacetylation and digestion with human saliva, pepsin, trypsin and mucoproteinase (BANGA), and treatment with hyaluronidase.

Results

85 day-old stage

This stage was examined since according to our previous studies [26] important changes are evidenced by the 85th day in the process of ossification.

With Ritter-Oleson's method in the epiphyseal cartilage Hale positivity predominated, i.e. the cartilage cells of the different zones were Hale positive except for the zone of maturation towards the metaphysis where part of the cells was already PAS positive. The ground substance of the proliferation zone was mostly Hale positive, whereas the zone of maturing cartilage PAS positive.

Hale's method (Fig. 1, Table I.)

The localization of the reaction corresponded with the Hale positive area obtained by Ritter-Oleson's technique. The reaction was given chiefly by the cells and slightly by the ground substance of the proliferation zone.

Müller's modified reaction (Fig. 2, Table I.)

At pH 1.5, 3 and 4.5 the staining area corresponded roughly with that obtained by Hale's method. Staining was most selective and most intensive at pH 1.5; the result here was similar to that yielded by Hale's method, though with a more marked colour effect. This seemed to suggest that the groups having low dissociation optima, i.e. the strong anionic groups, are responsible for the reaction. Since according to present knowledge chondroitin sulphuric acid is the most acid compound in the cartilage cells and ground substance, the basophilic reaction can well be explained.

PAS reaction (Fig. 3, Table I.)

Its localization corresponded with the area staining with Ritter-Oleson's technique. A positive reaction was given by the nuclei of the cartilage cells (this may be considered as an aspecific reaction), by some cells of the distal part of the zone of maturation, the whole ground substance of the same zone and, to a certain extent, by the ground substance in the proliferation zone.

Toluidine blue (Fig. 4, Table I.) showed a distinct reaction in the whole area of the epiphyseal cartilage, i.e. both the cells and the ground substance stained well. The stained area thus corresponded with those showing Hale and PAS positivity. The cell nuclei displayed an orthochromatic reaction and the cells and ground substance of the proliferation zone showed gamma metachromasia, whereas part of the cells of the maturation zone and its ground substance, beta metachromasia.



Fig. 1—10. Proximal epiphyseal cartilage of the tibia of 85 day-old rat. Fixation in Susa's fluid. \times 300. Fig. 1. Hale reaction. Fig. 2. Müller reaction at pH 1.5. Fig. 3. PAS reaction. Fig. 4. Toluidine blue staining. Fig. 5. Methylene blue staining at pH 1.42. Fig. 6. Methylene blue staining at pH 4,92. Fig. 7. Astra violet staining. Fig. 8. Wolman's colloid gold reaction at pH 5,2. Fig. 9. Proximal epiphyseal cartilage of the tibia of 30 day-old rat. Fixation in Susa's fluid. Ritter-Oleson's method. \times 400. Fig. 10. Proximal epiphyseal cartilage of 30 day-old rat. Fixation in Susa's fluid. Müller's reaction at pH 1,5, \times 200



Table I

	Reaction	Age				
		30 Days		85 Days		
		Cell	Ground Substance	Cell	Ground Substance	
Zone of Resting Cartilage	PAS	+	+	+	+	
	Müller pH 1.5	++	+	++	+	
	Müller pH 3.0	++	+	++	+	
	Müller pH 4.5	++	+	++	+	
	Hale	++	+	++	+	
	Toluidine Blue	++Mg	++Mg	++Mg	+Mg	
	Wolman	+++*	+	++*	+	
	Astra Violet	++	+	+	-+	
	Alcian Blue	++	+	++	-+	
	Best Carmin	++		+	-	
Zone of Proliferating Cartilage	PAS	+		+	++	
	Müller pH 1.5	++++	+++	++	++	
	Müller pH 3.0	+++	++	+	+	
	Müller pH 4.5	+++	++	+	+	
	Hale	++++	+++	++	++	
	Toluidine Blue	++++Mg	+++Mg	++Mg	++Mg	
	Wolman	++*		++*		
	Astra Violet	++++	+++	+++	+++	
	Alcian Blue	++++	+++	++	++	
	Best Carmin	++		+		

Summary of results obtained with different histochemical methods used for the demonstration of mucopolysaccharides

Methylene blue (Fig. 5.) at pH 1,42 gave roughly the same picture as that obtained with toluidine blue, i.e. the entire epiphyseal cartilage was stained. If the pH was raised, staining became more intense and extended to the metaphysal trabecules. In some cells of the maturation zone beta-metachromasia could be observed; the intensity of this increased on raising the pH (Fig. 6).

Acta morph. tomus XIII.

4*

Table	II
-------	----

	Reaction		Age				
			30 Days		85 Days		
			Cell	Substance	Cell	Substance	
	PAS		+	+	+	+	
Zone of Resting Cartilage	Acetylation	+ PAS	+	+	+	+	
	Desacetylation	+ PAS	+	+	+	+	
	Pepsin Digestion	+ PAS	+	+	+	+	
	Salivary Digestion	+ PAS		+		+	
	PAS		+		+	+	
	Acetylation	+ PAS	+		+		
7	Desacetylation	+ PAS	+		+	+	
Zone of Proliferating Cartilage	Pepsin Digestion	+ PAS	+		+	+	
	Salivary Digestion	+ PAS				+-	
	PAS				+	+++	
	Acetylation	+ PAS			+-	+	
7	Desacetylation	+ PAS			+	++	
Zone of Maturing Cartilage	Pepsin Digestion	+ PAS			+	+	
	Salivary Digestion	+ PAS			+	+++	
Zone of Calcifying Cartilage	PAS				+	+++	
	Acetylation	+ PAS					
	Desacetylation	+ PAS			-+	+	
	Pepsin Digestion	+ PAS			-+	+	
	Salivary Digestion	+ PAS			+	+++	

Summary of different complementary interventions

This points to the ability of this dye to stain weaker acids having higher dissociation optima.

Astra violet (Fig. 7, Table I.) gave a positive reaction in the epiphyseal disk, but only in the ground substance and the cells of the proliferation and maturation zones. The zone of resting cartilage and that of calcification reacted

		Age				
	Reaction	30 Days		85 Days		
		Cell	Ground Substance	Cell	Ground Substance	
Zone of Maturing Cartilage	PAS			+	+++	
	Müller pH 1.5	+++	++	++		
	Müller pH 3.0	++	+	+		
	Müller pH 4.5	++	+	+		
	Hale	+++	++	++		
	Toluidine Blue	+++Mg	++Mg	++Mg-b	+++Mb	
	Wolman	++*		++*		
	Astra Violet	+++	++	++	+	
	Alcian Blue	+++	++	++	+	
Zone of Calcifying Cartilage	PAS			+	+++	
	Müller pH 1.5	++	+		-+	
	Müller pH 3.0	+	+		+	
	Müller pH 4.5	+	+		+	
	Hale	++	+		-+	
	Toluidine Blue	++Mg	+Mg-b	+Mb	+++Mb	
	Wolman	++*	+	+++*	++	
	Astra Violet	++	+		+	
	Alcian Blue	++	+		+	

faintly, the bone did not stain. The reaction was most intensive in the proliferation zone. This finding seems to confirm the assumption that the weaker acid compounds with higher dissociation optima are localized near the metaphysis.

Alcian blue (Table I.) gave a picture similar to that obtained with Astra violet.

Wolman's colloid gold reaction (Fig. 8., Table I.) was negative in the epiphyseal disk, with the exception of the upper layer of the resting cell zone and the trabecules of the calcification zone. The reaction was positive in the meta-

physis and the bone and slightly so in the most distal cells of the maturation zone. The nuclei of the cartilage cells stained aspecifically; here it was probably the nucleic acid which took the stain, as the nucleus is Feulgen positive.

Best's carmine (Table I.) resulted in a faint positivity of the cells of the resting and proliferating zones. Feulgen's reaction was positive in the nuclei.

Methylgreen pyronine stained the cell nuclei. The cartilage ground substance showed aspecific pyroninophilia.

Of the complementary reactions, *acetylation* (Table II.) resulted in the suppression of the PAS reaction which was usually restored on saponification, except for the maturation zone where staining was restored only partially.

Digestion with pepsin and trypsin (Table II.) decreased the intensity of the PAS reaction in the zone of maturing cartilage.

Digestion with mucoproteinase did not affect Hale's reaction but suppressed the PAS positivity.

Digestion with human saliva (Table II.) had no appreciable effect on the PAS reaction. On pretreatment with hyaluronidase, staining with methylene blue, Alcian blue and Astra violet were decreased in intensity.

30 day-old stage

According to our previous studies [26], this stage differs in certain respects from the previous ones.

Ritter-Oleson's method revealed the Hale positivity of the entire epiphyseal cartilage, in both the cells and the ground substance (Fig. 9.).

Hale's method (Table I.) gave a similar result, staining the whole epiphyseal disk.

Hale's reaction modified by Müller (Fig. 10., Table I.) was performed at three different pH levels. The staining area corresponded with that displaying Hale positivity. Staining was most intensive at pH 1,5.

PAS reaction (Table I.). The same area was stained as by Ritter-Oleson's method, i.e. positive reaction was given by the epiphyseal margins of the cartilage, by both the old and the new bone and, aspecifically, by the nuclei of the cartilage cells and of the resting zone.

Toluidine blue (Table I.) stained the entire epiphyseal cartilage. In this stage gamma metachromasia prevailed with slight beta metachromasia, especially in the lower layers of the zone of maturing cartilage.

Methylene blue (Table I.) At pH 1.42 the same reaction was obtained as with toluidine blue, extending to the whole epiphyseal cartilage. Raising the pH resulted in a more intensive reaction in the trabecules and the osteoblasts.

Astra violet (Table I.). The entire epiphyseal disk displayed a uniform staining.

Alcian blue (Table I.) was negative in the epiphyseal cartilage with the exception of the aspecific nuclear reaction in the cartilage cells and a slight positivity on the metaphyseal border.

Acta morph. tomus XIII.

146

Best's carmine (Table I.). Staining was intensive in the cells of the resting and proliferating cartilage zones.

Feulgen's and methylgreen pyronine gave the same reactions as in the previous stage.

Following desacetylation and digestion with pepsin and trypsin no changes resulted in the PAS reaction (Table II.).

Pretreatment with hyaluronidase had a diminishing effect on staining with Alcian blue, methylene blue and Astra violet.

Discussion

The purpose of our investigations was to achieve the best possible histochemical differentiation of mucopolysaccharides by means of different techniques and control reactions.

The greatest problem was encountered at the evaluation of the PAS reaction. The essence of this method is that the binding of the neighbouring carbon atoms connected with hydroxyl groups is broken down and oxidized to aldehydes (MALAPRADE, 52). The aldehydes, on the other hand, show a very intense red staining with Schiff's reagent (KENT and WHITEHOUSE, 41; ANDREANI and GRASSI, 4). The PAS reaction is variously interpreted in the literature, as evidence of the presence of

1. Acid mucopolysaccharides (WOLFROM et al. 88; STROUGHTON and (WELLS, 82). This is denied by DEANLOZ and FORCHIELLI [38]; BRADEN [15]; GLEGG et al. [28]; JORPES et al. [40], MEYER et al. [60];

2. Neutral mucopolysaccharides (LISON [49,50]; BENHAMOU et al. [8]; KROM-PECHER [43]);

3. 1,2 glycol group or its amino- and alkylamino (alpha hydroxy acid) variants (PEARSE [70]; HOTCHKISS [35]; LILLIE [46]; GLEGG et al. [28]). The data reported by FLEURY and LANGE [24], GRAUMANN [31], NICOLET and SHINN [69], BANGLE and ALFORD [6] are partly in disagreement with this view;

4. Carbohydrate-protein complex (LEBLOND et al. [44]; GERSH and CATCH-POLE [27], AKAMINE et al., [1])

In addition, cerebrosides and lipids (MURELLI and PELLEGRINI [65]) and unsaturated fatty acids (BELT and HAYES [7]) may also give a positive PAS reaction.

According to MONTAGNA [61] and SHEEHAN [75], fats are constant plasmatic components of the cartilage cells; they are considered by NAGY *et al.* [68] to be phosphatides. IRVING [37] has shown that staining with Sudan B in ossification areas corresponded to a mucopolysaccharide fraction. According to HADHÁZY and PERJÉS [33], the reactions aimed at excluding lipid substances (glycolipid, unsaturated lipids, phospholipids) may be neglected in the case of

cartilage. In connexion with a positive PAS reaction one may think also of the presence of glycogen, but this can be readily ruled out by saliva digestion.

It has been demonstrated biochemically that the cartilage, and thus the cells of the epiphyseal cartilage, contain chondroitin sulphate A and C (MEYER 58). The amount of chondroitin sulphate was, however, found to decrease with age (LOEWI, 51, STIDWORTHY *et al.* [79], JOEL *et al.* [39] and at the beginning of calcification. The latter finding was explained by SYLVEN [84] in that a more alkaline environment is required by calcification. A close relation between the mucopolysaccharides of the ground substance and calcium has been suggested by SUNDERMAN and SUNDERMAN [83]. According to STRAUB [81], the acid group of the chondroitin sulphate and its hydroxyl group readily forming complexes permit the binding of large quantities of calcium. In the opinion of numerous authors, Ca is bound to mucopolysaccharideprotein complexes (SOBEL and BURGER, 78; BÉLANGER, 10; MCLEAN and URIST, 55; ZAMBOTTI, 92; ARM-STRONG, 5, etc.).

Our examinations have revealed the PAS positive reaction to appear in that portion of the epiphyseal cartilage which is in the vicinity of the metaphysis, particularly in the later stage of ossification. This localization is in full agreement with the biochemical data mentioned. It is to be noted that the Hale positive reaction was entirely distinguishable from the PAS positivity, both with Ritter-Oleson's technique, and if the reactions were performed separately.

There is no general agreement as to the evaluation of the Hale reaction, as it is believed by numerous authors that it demonstrates not only the acid mucopolysaccharides but also the neutral ones and the proteins as well (McMA-NUS, 56, 57; PEARSE, 70; DAVIES, 18; BRADEN, 15; IMMERS, 36). Still, the reaction and its different modifications are used extensively (RINEHART-ABUL-HAJ, 74: GOMORI, 29; MÜLLER, 66), chiefly within the compass of Ritter-Oleson's technique. On the basis of our experiments with different metal colloids, the negative reaction obtained with colloid iron, having a negative charge, the staining with Alcian blue, the toluidine blue metachromasia and the radioactive sulphate autoradiography (Fig. 11, 12, 13), it seems reasonable to consider the Hale reaction as the most appropriate method for the demonstration of acid mucopolysaccharides. A similar opinion has been expressed by VINOGRADOV et al. [85]. The fact that Hale positivity was the most intensive in the zone of proliferating cartilage where the formation of mucopolysaccharides is known to take place (AMPRINO, 2,3; BERENSEN et al., 9; FAVILLI, 21; RAGAN, 73, etc.) adds support to our assumption.

The metachromatic reaction is the most commonly accepted sign of the presence of acid mucopolysaccharides. Nevertheless, there is no general agreement regarding its evaluation. According to data in the literature the metachromatic reaction would demonstrate the presence of sulphated mucopolysaccharides (DEMPSEY, 19; BÉLANGER and HARTNETT, 11), non-sulphated mucopoly-



Fig. 11-13. Portion of cartilaginous callus of rat

Fig. 11. Ritter-Oleson's technique. Strong Hale positivity in the cartilage cells and sparse positivity in ground substance, the margins of which are PAS positive. \times 800 Fig. 12. Toluidine blue staining. Strong gamma metachromasia in cartilage cells and weak

Fig. 12. Toluidine blue staining. Strong gamma metachromasia in cartilage cells and weak staining of ground substance, with beta metachromasia of the margins. \times 1000

Fig. 13. S³⁵ autoradiography. Strong activity in cartilage cells and in spots in the ground substance (Kodak AR 10 stripping film). \times 800



saccharides (LISON, 50; HOLMGREN, 34) and that of metaphosphate and carboxyl (WISLOCKI*et al.*, 87; WIAME, 86). The problem of the possible role of nucleic acids has also been raised in connexion with the metachromatic reaction (SIN-GER, 76, 77; KRAMER and WINDRUM, 42) but on the basis of the work of FLAX and HIMES [23] they seem to be responsible only for the nuclear reaction.

The epiphyseal cartilage displayed gamma and beta metachromasia which varied according to age and zones. Gamma metachromasia — which according to PEARSE [70] is indicative of sulphated mucopolysaccharides — occurred chiefly in the proliferation zone. Thus, the results obtained by the Hale reaction are in agreement with the toluidine blue metachromasia and the biochemical data. The essence of the methylene blue extinction introduced by PISCHINGER [72] is that in a weak acid medium the acid groups of the amphoter proteins the main components of the staining tissue — do not dissociate, whereas the basic groups, though dissociating considerably, remain unstained, since their ions have an identical charge (LIPP, 47). Our results with methylene blue staining were similar to those obtained with toluidine blue.

Alcian blue is believed to be suitable for the demonstration of acid mucopolysaccharides and sulphate esters. However, McManus and Mowry [57], Mowry [62, 63, 64], PEARSE [70], DIEZEL [20] have a certain reserve as to the specificity of this dye. Its use resulted in positivity especially in the proliferation zone.

Astra blue according to PIOCH [71] or as modified by BLOOM and KELLY [14], is used for the demonstration of acid mucopolysaccharides. We used Astra violet instead of Astra blue, the properties of the two dyes being identical. Astra violet staining yielded clear positive reactions chiefly in the proliferation zone. No staining was observed in the bone. The reaction is simple and its colour differs from that obtained with the former techniques. Its staining area corresponds approximately to that of Alcian blue.

Wolman's colloid gold reaction modified by us yielded positivity only in the metaphysis. In this area — according to data in the literature — acidity is weak and thus the reaction, in agreement with WOLMAN's opinion [89, 90], would represent weaker acid components.

On pretreatment with hyaluronidase, the Hale reaction, Alcian blue, Astra violet, toluidine blue and methylene blue staining have lost in intensity. This observation adds support to the assumption that staining by these dyes is due to acid mucopolysaccharides. The PAS reaction was not affected by hyaluronidase pretreatment which seems to contradict the possibility of mucopolysaccharide demonstration by this method, in agreement with the data of CURRI [17] and LEFÈBVRE [45]. On the other hand, digestion with pepsin and trypsin, the abolition of the PAS reaction by acetylation and its less intense restoration following desacetylation, seem to indicate the presence of carbohydrates and protein-like substances in the PAS positive area. Regarding the different histochemical methods used for the demonstration of mucopolysaccharides, the following evaluation seems to be substantied with regard to cartilage.

The strongly positive colloids — as the Hale and Müller's iron-colloid are absorbed by macromolecular acid compounds, presumably by chondroitin sulphate. Toluidine blue, methylene blue, Alcian blue and Astra violet may be bound partly by these macromolecules but partly also by the more depolymerized molecules of weak acids. The PAS positive material seems to correspond to the mucopolysaccharide-protein complex. This assumption is based on the following.

1. The reaction is only partially restored on saponification;

2. it decreases in intensity following digestion with pepsin, trypsin or mucoproteinase;

3. at higher pH levels methylene blue staining is enhanced in the area where the PAS reaction is also more intensive and in such areas beta metachromasia is obtained;

4. the PAS reaction is unaffected by digestion with hyaluronidase;

5. digestion with saliva does not affect the reaction; and, finally,

6. according to data in the literature, calcium is bound to mucopolysaccharide-protein complexes and in our preparations an increased PAS positivity was observed in the areas corresponding to the site of calcification.

Wolman's colloid gold was found to react with depolymerized weak acids, such as hyaluronic acid.

REFERENCES

1. AKAMINE, R. N., ENGEL, M. B., SARNAT, B. G.: (1954) Histochemical Studies of Cartilage Implants. J. Bone & Jt. Surg. A. 36, 1166-74, - 2. AMPRINO, R.: (1955) Autoradiographic Research on the S35 Sulphate Metabolism in Cartilage and Bone Differentiation and Growth. Acta anat. (Basel) 24, 121. - 3. AMPRINO, R.: (1956) Uptake of S35 in the Differentiation and Growth of Cartilage and Bone. In: Ciba Foundation Symposium on Bone Structure and Metabolism. Ed. Wolstenholme, G. E. W., O' Connor M. Churchill, London. – 4. ANDREANI, D., GRASSI, B.: (1954) Frazionamento delle Glicoproteine Seriche. Rass. Fisiopat clin. ter. 10, 769. - 5. ARMSTRONG, W. D.: (1952) Phosphorus Metabolism in the Skeleton. Phosphorus Metabolism. Ed. Elroy, W. D., Glass, B. J. Hopkins Press, Baltimore, Pp. 698-727. - 6. BANGLE, R. JR., ALFORD, W. C.: (1954) The Chemical Basis of the Periodic Acid-Schiff Reaction of Collagen Fibers with Reference to Periodate Consumption by Collagen and by Insulin. J. Histochem. Cytochem. 2, 62. – 7. BELT, W. D., HAYES, E. R.: (1956) An Ultraviolet-Schiff Reaction for Unsaturated Lipids. Stain. Technol. 31, 117–22. – 8. BENHAMOU, E. P., PUG-LIESE, CHICHE, J. C., AMOUEH, P.: (1954) La microélectrophorèse sur papier avec le bleu de toluidine et ses applications pratiques. Presse méd. 62, 651. - 9. BERENSEN, G. S., LUMPKIN, W. M., SHIPP, V. G.: (1958) Study of the Time-Course Production of Acid Mucopolysaccharides by Fibroblasts in Synthetic Medium. Anat. Rec. 132, 585-96. - 10. BÉLANGER, L. F.: (1956) Autoradiographic Studies of the Organic Matrix of Cartilage, Bone and the Tissues of Teeth. In: Ciba Foundation Symposium on Bone Structure and Metabolism. Ed. Wolstenholme, G. E. W., O'Connor, M. Churchill, London, Pp. 75–87. – 11. BÉLANGER, L. F., HARTNETT, A.: (1960) Persistent Toluidine Blue Metachromasia. J. Histochem. Cytochem. 8, 75. – 12. BÉLANGER, L. F., MIGICOVSKY, B. B.: (1960) Comparative Effects of Vitamin D, Calcium, Cortisone, Hydro-cortisone and Norethandrolone on the Epiphyseal Cartilage and Bone of Rachitic Chicks. Develop. Biol. 2, 329-42. – 13. BÉLANGER, L. F., MIGICOVSKY, B. B.: (1961) A Comparison Between Different Mucopolysaccharide Stains as Applied to Chick Epiphyseal Cartilage. J.
151

Histochem. Cytochem. 9, 73-8. - 14. BLOOM, G., KELLY, J. W.: (1960) The Copper Phtalocyanin Dye "Astra-blau" and Its Staining Properties, Especially the Staining of Mast Cells. Histochemie, 2, 48-57. - 15. BRADEN, A. W. H.: (1953) The Reaction of Isolated Mucopolysaccharides to Several Histochemical Tests. Stain Technol. 30, 19-26. - 16. Совв, J. D.: (1953) Relation of Glycogen, Phosphorylase and Ground Substance to Calcification of Bone. Arch. Path., 55, 496-503. - 17. CURRI, S. B.: (1959) Istochimia dei Mucopolisaccaridi. Riv. Anat. pat., 16, 900-38. - 18. DAVIES, D.V.: (1952) Specificity of Staining Methods for Mucopolysaccharides of the Hyaluronic Acid Type. Stain Technol, 27, 65-70. - 19. DEMPSEY, E. W., BUNTING, H., SINGER, M., WISLOCKI, G. B.: (1947) The Dye-binding Capacity and Other Chemohistological Properties of Mammalian Mucopolysaccharides. Anat. Rec., 98, 417-29. 20. DIEZEL, P. B.: (1957) Die Stoffwechselstörungen der Sphingolipoide. Springer, Wien. -21. FAVILLI, G.: (1952) Probleme der Mucopolysaccharide des Bindegewebes, der Schleimsubstanzen und ihre spezifischen Enzyme. Wien. klin. Wschr., 23, 405-11. - 22. FLAX, M. H., HIMES, M. H.: (1950) A Differential Stain for Ribonucleic and Desoxyribonucleic Acids. Anat. Rec. 108, 529. - 23. FLAX, M. H., HIMES, M. H.: (1952) Microspectrometric Analysis of Metachromatic Staining of Nucleic Acids. Physiol. Zool. 25, 297-311. - 24. FLEURY, P., LANGE, J.: (1933) Étude de l'action de l'acide périodique sur les composés polyhydroxylés. Action de l'acide périodique sur les acides alcools. J. Pharm., Chim., (Paris), 17, 313-26. - 25. FÖLDES, I., Bor, Gy.: (1961) Die Wirkung der Phosphatester bei der Knochenbildung unter normalen, regenerativen und pathologischen Verhältnissen. Biologicke Prače, Prague VII/8 105-9. -26. FÖLDES, I., MÓDIS, L., SÜVEGES, I., GÉHL, Á.: (in press) Postembrionális chondralis csontképződés. 27. GERSH, I., CATCHPOLE, H. R.: (1949) The Organization of Ground Substance and Basement Membrane, and its Significance in Tissue Injury, Disease and Growth. Amer. J. Anat., 85, 457-522. - 28. GLEGG, R. E., CLERMONT, Y., LEBLOND, C. P.: (1952) The Use of Lead Tetraacetate, Benzidine, O-Dianizidine and "Film-Test" in Investigating the Periodic Acid Technic Stain. Stain Technol, 27, 277-305. - 29. GOMORI, G.: (1952) Microscopic Histochemistry, Principles and Practice. Univ. of Chicago Press, Chicago. 30. GOMORI, G.: (1955) The Histochemistry of Mucopolysaccharides. Brit. J. exp. Path., 35, 177-80. - 31. GRAU-MANN, W.: (1953) Die histochemische Reaktion der Knorpelgrundsubstanz mit Perjodsäure und Bleitetraazetat. Mikroskopie, 8, 218-25. - 32. GRAUMANN, W.: (1957) Über die zelluläre Speicherung von Carboxymethylzellulose und Polyorhetin phosphat. Ein Beitrag zur Kenntnis des Depotmechanismus von ACTH Präparaten. Z. Zellforsch, 46, 430-45. - 33. HADHÁZY, Cs., PERJÉS, I.: (1962) Untersuchungen über die Knorpelbildung VIII. Histochemische Untersuchung der Mucopolysaccharide regenerierender Gelenkoberflächen. Acta biol. Acad. Sci. hung., 13, 145-68. - 34. HOLMGREN, H.: (1940) Studien über Verbreitung und Bedeutung der Chromotropen Substanz, Z. mikr.-anat. Forsch., 47, 489-521. - 35. HOTCHKISS, R. D.: (1948) A Microchemical Reaction Resulting in the Staining of Polysaccharide Structures in Fixed Tissue Preparations. Arch. Biochem., 16, 131-41. - 36. IMMERS, J.: (1954) Chemical and Histochemical Demonstration of Acid Esters by Acetic Iron Reagent. Exp. Cell Res. 6, 127-33. - 37. IRVING, H. T.: (1958) A Histological Stain for Newly Calcified Tissues. Nature (Lond.), 181, 704-5. - 38. JEANLOZ, R. W.: (1951) Studies on Hyaluronic Acid Related Substances. Periodate Oxidation. J. biol. Chem., 190, 537-46. - 39. JOEL, W., MASTERS, Y. F., SHETLAR, M. R.: (1956) Comparison of Histochemical and Biochemical Methods for the Polysaccharides of Cartilage. J. Histochem. Cytochem. 4, 475-8. - 40. JORPES, E., WERNER, B., ABERG, B.: (1948) The Fuchsin Sulfurous Acid Test after Periodate Oxidation of Heparin and Allied Polysaccharides. J. biol. Chem., 176, 277-62.- 41. KENT, P. W., WHITEHOUSE, M. W.: (1955) Biochemistry of the Amino Sugars. Academic Press, New-York. - 42. KRAMER, H., WINDRUM, G. M.: (1955) The Metachromatic Staining Reaction. J. Histochem. Cytochem., 3, 227-37. - 43. KROMPECHER, ST.: (1960) Hypoxybiose und Mucopolysaccharid-Bildung in der Differenzierung und Pathologie der Gewebe, sowie über den Zusammenhang zwischen Schilddrüsenfunktion und Mucopolysacchariden. Barth, Leipzig. - 44. LEBLOND, C. P., GLEGG, R. E., EIDINGER, D.: (1957) Presence of Carboxyhydrates with Free 1.2-Glycol Groups in Sites Stained by the Periodic Acid-Schiff Technique. J. Histochem. Cytochem., 5, 445-58. 45. LEFÈBVRE, P.: (1957) Utilisation de la pyocyanine dans l'étude histochimique de certains mucopolysaccharides. Comparaison de son action avec celle de deux préparations commerciales d'hyaluronidase d'origine différente. Ann. Histochim., 2, 11-8. 46. LILLIE, R. D.: (1954) Histopathological Technic and Practical Histochemistry. 2nd ed. Blakiston, New-York. 47. LIPP, W.: (1954) Perjodsäure-Oxydationstechnik. Histochem. Meth. (München) Lfg. 1, 9-14. - 48. LIPP, W.: (1955) Färbung mit gepufferten Farbstofflösungen (Puffer-Färbung). Histochem. Meth. (München), 8, 1-14. 49. LISON, L.: (1932) Sur la specifité de la réaction de Schiff envers les aldéhydes. Bull. Histol. Techn. micr., 9, 177-95. - 50. LISON, L.: (1953) Histochimie et Cytochimie Animale. Gauthier-Villars Paris. - 51. LOEWI, G.: (1953) Changes in the Ground Substances of Aging Cartilage. J. Path. Bact., 65, 381. - 52. MALAPRADE, L.:

(1934) Étude de l'action des polyalcools sur l'acide périodique et les periodates alcalins. Bull Soc. chim. Fr. Ser.V. 1, 833. - 53. MALINSKY, J.: (1955) Histochemical Demonstration of Carbohydrates in Intervertebral Disc of Human Foetuses Aged 3-4 Months. (Histology of Intervertebral Disc, 2nd Communication.) Acta histochem. (Jena), 2, 153-64. - 54. MALINSKY, J.: (1956) Histochemical Demonstration of Carbohydrates in Intervertebral Disc of Human Embryos. Acta histochem., 3, 297-307. - 55. McLEAN, F. C., URIST, M. R.: (1955) Bone. An Introduction to the Physiology of Skeletal Tissue. Univ. of Chicago Press, Chicago. - 56. MCMANUS, J. F. A.: (1954) Histochemistry of Connective Tissue. In: Connective Tissue in Health and Disease. Ed. Asboe-Hansen. Munksgaard. Copenhagen. Pp. 31-53. - 57. Mc-MANUS, J. F. A., MOWRY, R. W.: (1958) Effects of Fixation on Carbohydrate Histochemistry. J. Histochem. Cytochem., 6, 309-316. - 58. MEYER, K.: (1956) The Mucopolysaccharides of Bone. Ciba Found. Symposium on Bone Structure and Metabolism. Ed. Wolstenholme G. E. W., O'Connor, M. Churchill, London, Pp. 65-74. - 59. MEYER, K. H., ODIER, M. E.: (1946) Contribution à l'étude de l'acide chondroitine-sulfurique. Experientia, (Basel), 2, 311-2. 60. MEYER, K. H., ODIER, M. E., SIEGRIST, A. E.: (1948) Constitution de l'acide chondroitinesulfurique. Helvet Chim. Acta, 31, 1400-19. - 61. MONTAGNA, W.: (1949) Glycogen and Lipids in Human Cartilage with some Cytochemical Observations on the Cartilage of the Dog, Cat and Rabbit. Anat. Rec., 103, 77-92. - 62. MOWRY, R. W.: (1956) Alcian Blue Technic for the Histochemical Study of Acidic Carbohydrates. J. Histochem. Cytochem., 4, 407. - 63. Mowry, R. W.: Personal communication. - 64. MOWRY, R. W.: (1958) Improved Procedure for the Staining of Acidic Polysaccharides by Müller's Colloidal (Hydrous) Ferric Oxide and its Combination with the Feulgen and the Periodic Acid Schiff Reactions. Lab. Invest., 7, 566-76. -65. MURELLI, P., PELLEGRINI, G.: (1957) Serum Glycoproteins. Comparison of the Different Staining and Reading Methods of the Electrophoretic Strip and Chemical Dosing with Anthrone and Orcinol. R. C. ital. Lomb. Scie. e. Lett., 91, 789. - 66. Müller, G.: (1955) Über eine Vereinfachung der Reaction nach Hale (1946). Acta Histochem. (Jena), 2, 68-70. - 67. MÜLLER, H.: (1956) Histophotochemische Untersuchungen über Glucoseresorption im Darm der weissen Maus. Acta histochem. (Jena), 3, 165. - 68. NAGY, I., SÁVAY, GY., ČSILLIK, B.: (1951) A porcsejtek lipoidtartalma és a csontosodás közötti összefüggésről. Kisérl. Orvostud. 3, 267-70. – 69. NICOLET, B. H., SHINN, L. A.: (1939) The Action of Periodic Acid on Amino Alcohols. J. Amer. Soc., 61, 1615. - 70. PEARSE, A. G. E.: (1953) Histochemistry. Theoretical and Applied. Little, Brown Co., Boston. - 71. PIOCH, W.: (1957) Über die Darstellung saurer Mucopolysaccharide mit dem Kupferphthalocyaninfarbstoff Astrablau. Virchows. Arch. Path. Anat., 330, 337-46. - 72. PISCHINGER, A.: (1926) Die Lage des isoelektrischen Punktes histologischer Elemente als Ursache ihrer verschiedenen Färbbarkeit. Z. Zellforsch., 3, 169-97. - 73. RAGEN, CH.: (1953) The Physiology of the Connective Tissue. Ann. Rev. Physiol. 14, 51-72. - 74. RINEHART, J. F., ABUL HAJ S. K .: (1951) An Improved Method for Histologic Demonstration of Acid Mucopolysaccharides in Tissues. Arch. Path., 52, 189-94. - 75. SHEEHAN, J. F.: (1948) A Cytological Study of Cartilage Cells of Developing Long Bones of the Rat, with Special Reference to the Golgi Apparatus, Mitochondria, Neutral Red Bodies and Lipid Inclusions J. Morph., 82, 151-99. - 76. SINGER, M.: (1948-49) Some Histochemical Studies of Proteins with Acid Basic Dyes. Proc N. Y. path. Soc., 90-93. - 77. SINGER, M.: (1954) The Staining of Basophilic Components. J. Histochem. Cytochem., 2, 322-31. - 78. SOBEL, A. E., BURGER M. (1954) Studies of Chondroitin Sulfate in Relation to the Mechanism of Calcification. Fed. Proc. 13, 300-1. - 79. STIDWORTHY, G. E., MASTERS, Y. F., SHETLAR, M. R.: (1958) The Effect of Aging on Mucopolysaccharide Composition of Human Costal Cartilage, as Measured by Hexosamine and Uronic Acid Content. J. Geront., 13, 10. - 80. STIEBELING, H. K.: (1940) Dietary Levels in the United States. J. Nutr. Suppl., 19, 44-52. - 81. STRAUB, F. B.: (1958) Biokémia. Medicina, Budapest. - 82. STROUGHTON, R., WELLS, G.: (1950) A Histochemical Study on Polysaccharides in Normal and Diseased Skin. J. invest. Derm. 14, 37-51. - 83. SUNDERMAN, W. F., SUNDERMAN, W. F.: (1957) Interstitial Calcinosis. Amer. J. med. Sci. 234, 287. - 84. Sylvén, B.: (1947) Cartilage and Chondroitin Sulphate. II. Chondroitin Sulphate and the Physiological Ossification of Cartilage. J. Bone Jt Surg. 29, 973-6. - 85. VINOGRADOV, V. V., DONSKY, N. V., SUBBOTIN, M. J., ESREMNY, L. P. (1962) Сравнительная оценка методов гистохимического выявления мукопилисахаридов в тканях провизорных органов человека и млекопитающих. Архив Анатомии, Гистологии и Эмбриологии 42. 1. 103. — 86. WIAME, J. M. (1947) The Metachromatic Reaction of Hexametaphosphate. J. Amer. Chem. Soc. 69, 3146-7.-87. WISLOCKI, G. B., BUNTING, H., DEMPSEY, E. W. (1947) Metachromasia in Mammalian Tissues and its Relationship to Mucopolysaccharides, Amer. J. Anat., 81, 1-37. 88. WOLFROM, M. L., MADISON, R. K., CRON, M. J. (1952) The Structure of Chondrosine and of Chondroitinsulfuric Acid. J. Amer. Chem. Soc., 74, 1491-4. -89. WOLMAN, M.: (1956) A Histochemical Method for the Differential Staining of Acidic Tissue Components (Particulary Ground Substance Polysaccharides). Bull. Res. Coun. Israel, E., 6, 27-35. - 90. WOLMAN,

M.: (1961) Differential Staining of Acidic Tissue Components by the Improved Bi-Col Method. Stain Technol., **36**, 21-5. – 91. ZACCHEO, D., VIALE, G.: (1958) Considerazioni sui procedimenti tecnici per la qualificazioni istochimica dei mucopolisaccaridi. Bol. Soc. ital. Biol. sper., **34**, 1063-1958. – 92. ZAMBOTTI, V.: (1957) The Biochemistry of Preosseus Cartilage and of Ossification. Sci. med. ital., **5**, 614-43.

ÜBER DEN NACHWEIS VON MUKOPOLYSACCHARIDEN

I. FÖLDES, L. MÓDIS und I. SÜVEGES

Vergleichende Untersuchungen wurden zum Nachweis der Mukopolysacchariden in der proximalen Epiphysenfuge von 30- und 85tägigen Ratten mit verschiedenen histochemischen Methoden durchgeführt. Es wird betont, daß sich die Ergebnisse nur unter Berücksichtigung der biochemischen Daten des untersuchten Organs auswerten lassen. Demnach sind zum Nachweis der Mukopolysacchariden in der Epiphysenfuge die folgenden Methoden geeignet.

1. Zum Nachweis der sauren Mukopolysacchariden (so auch von Chondroinsulphat A und C): die Halesche Reaktion (in erster Linie im Rahmen der *Ritter-Olesonschen* Technik) und ihre Müllersche Modifikation bei niedrigem pH; die Gamma-Metachromasie von Toluidinblau; Methylenblau; bei einem pH unter 2,0, die Astraviolett- und Alzyanblau-Reaktionen, falls sie hyaluronidase-empfindlich sind.

2. Zum Nachweis eines Mukopolysacchariden-Protein-Komplexes: die PAS-Reaktion, da sie auf Sp. icheldiastase nicht reagiert, bei Azetylierung verschwindet, nach Desazetylierung wieder erscheint, pepsin-, trypsin-mukoproteinase-empfindlich ist und mit Toluidinblau Beta-Metachromasie und mit Methylenblau bei niedrigen pH eine blaue Farbreaktion gibt.

3. Zum Nachweis von weniger sauren Mukopolysacchariden dienen die Wolmansche Reaktion, Methylenblau bei hohem pH, und die Beta-Metachromasie mit Toluidinblau.

ИССЛЕДОВАНИЕ МУКОПОЛИСАХАРИДОВ

И. ФЁЛЬДЕШ, Л. МОДИШ, И И. ШЮВЕГЕШ

Проводились сравнительные исследования различных гистолохимических методов, служащих для выявления мукополисахаридов в проксимальном эпифизарном хряще большеберцовой кости 30- и 80-дневных крыс. Авторы подчеркивают, что результаты, получаемые при помощи современных гистохимических методов, можно ценивать лишь при учете биохимических данных исследуемого органа. На основе сказанного, из методов, служащих для выявления мукополисахаридов в эпифизарном хряще, наиболее пригодными — по-видимому — являются следующие:

1. Для выявления кислых мукополисахаридов (в том числе и хондроитинсульфата A и C) рекомендуется модификация по *Хеил* (прежде всего в рамках техники Риттер-Олесона) и Мюллеру при низкой величине pH, гаммаметахромазия толуидиновой синьки, метиленовая синька при pH ниже 2,0 и реакции с астрафиолетом и альциановой синькой, если они чувствительны к действию гиалуронидазы.

2. Реакция ПАС указывает на мукополисахаридно-протеиновый комплекс, поскольку она не реагирует на переваривание диастазой, после ацетилирования она исчезает, а после дезацетилирования возобновляется, но в меньшей мере, чувствительна к пепсину, трипсину и мукопротеиназе и в то же время с толуидиновой синькой дает бета-метахромазию, а с метиленовой синькой при низком pH — синюю цветную реакцию.

 Для выявления менее кислых мукополисахаридов пригодны: реакция Вольмана, метиленовая синька с высоким pH и бета-метахромазия с толуидиновой синькой.

DR. I. FÖLDES DR. L. MÓDIS DR. I. SÜVEGES Debrecen, Anatómiai Intézet, Hungary



Department of Pathology (Director: Prof. G. ROMHÁNYI), University Medical School, Pécs

ELECTRON MICROSCOPY OF THE HARDERIAN GLAND OF THE RAT: MATURATION OF THE ACINAR CELLS AND GENESIS OF THE SECRETORY DROPLETS

G. KELÉNYI and S. ORBÁN

(Received September 3, 1963)

Harderian glands of infantile and adult rats have been examined electron microscopically. The maturation of the acinar cells was found to be represented by four cell types which show a gradual increase in the number and size of their large vesicles (secretory droplets). These vesicles develop from the membranes and small vesicles of the Golgi apparatuses.

The Harderian gland (glandula palpebrae tertiae profundae), the third intraorbital lacrimal gland present in most terrestrial vertebrates, is well developed in the adult rat, contains a large amount of porphyrins and lipids, which, as a result of the apocrine-like secretory activity of the gland, appear on the eyelids. As a result of its high porphyrin content, in states of functional hyperactivity the secretion of the gland is as red as blood ("chromodacryorrhoea", MCELROY et al., 1941, TASHIRO et al., 1940).

Early light microscopic observations showed that the cytoplasm of the glandular cells is full of sudanophilic birefringent lipid droplets. According to more recent observations by KANWAR (1960) the lipid or secretory droplets are of complex structure, surrounded by an outer unsaturated lipid-containing membrane, whereas the inner part consists of saturated lipids. Our own previous findings also support the complex structure of the secretory droplets and provide some data concerning their composition (ORBÁN *et al.* 1962).

CHIQUOINE's observations (1958) have shown that electron microscopically the secretory droplets are large vesicles, apparently empty in their centre, with osmiophilic, partly fenestrated surface membranes. BJÖRKMAN *et al.* (1960) suggest that in the Harderian gland of the rabbit the secretory droplets originate from an electron-dense cytoplasmic ground matrix rich in Golgi-apparatuses, with the reservation, however, that it is difficult to judge the special structure of the cytoplasmic organelles in the highly osmiophilic ground cytoplasm. According to HAYES (1958), microvilli are present on the acinar surface of the glandular cells.

In spite of the light and electron microscopic findings concerning the structure of the Harderian gland, the process of maturation of the acinar cells and the genesis of the secretory droplets is still obscure. Our own findings, based on electron microscopic observation of the Harderian gland of infantile and adult rats, have thrown some light on these processes.

G. KELÉNYJ and S. ORBÁN

Materials and methods

Infantile and adult albino rats weighing 15 to 280 g were used. The animals were killed under light ether anaesthesia by decapitation. The Harderian glands were immediately removed, cut into small pieces of about 1 to 2 mm³ and, 60 to 90 seconds after decapitation, fixed in a 1 per cent solution of osmium tetroxide in pH 7.2 veronal buffer isotonized with sucrose at 4 °C for 60 to 180 min. In some cases potassium permanganate (LUFT, 1956) and isotonized neutral formol (HOLT *et al.*, 1961) were also used. Fixation was followed by washing with isotonic buffer solution, then the material was dehydrated in 25 to 100 per cent ethanol and finally embedded in an 8 : 2 mixture of buthylmethacrylate and methylmethacrylate. The glands fixed in potassium permanganate were embedded in methacrylate or Araldite (Ciba, Basel). During dehydration some of the neutral formol-fixed material was stained with 3 per cent phosphotungstic acid or with saturated uranyl acetate. The sections were cut on an LKB-Ultrotome-type ultramicrotome, floated on 20 per cent ethanol or water and picked up with form-var coated copper grids. Electron microscopic observations were performed with an ELMI-D₂ (Zeiss, Jena) and a TESLA (Brno, CSSR) microscope, type BS 242 A.

Observations

Electron microscopic observations on a large number of Harderian glands of infantile and adult rats have shown that four types of cells may be distinguished in them, types 1 and 2 occurring in the infantile, and types 2, 3 and 4 in the adult gland. The four cell types are not sharply separated forms of the acinar cells as there is a continuous transition between them. The morphology of the gland cells shows great variability, which is obviously due to the functional activity of every individual acinus and cell.

In the following we shall describe the submicroscopic structure of the gland cells of *infantile animals* (I) and of *adult rats* (II), then, based on our findings, we shall give a brief survey of the process of acinar cell maturation (III) and the *genesis of the large vesicles* (secretory droplets) (IV).

(I) Electron microscopic structure of the Harderian gland of infantile rats. In infantile rats of 15 to 70 g body weight the lumina of the acini of the Harderian gland are narrow, on the luminal surface there are microvilli, the cells are high and pyramidal with basal nuclei. The acini are made up of two cell types (types 1 and 2), which show distinct morphological features. Transitional forms also occur.

Cell type 1 (Fig. 1). These poorly differentiated cells contain a small number of large vesicles (secretory droplets) surrounded by a thick osmiophilic membrane. Between, and closely associated with the large vesicles there are many dense mitochondria with a large number of mitochondrial cristae. The ground cytoplasm is relatively clear, finely granular and only ribosomes and smooth-surfaced tubules, fine vesicles and granules are observable. It does not contain ergastoplasm. The tubules, the fine vesicles and the granules are arranged in small complexes consisting of 2 to 6 parallel membranes with a large number of fine vesicles and granules around them, i.e., they may be regarded as Golgi-apparatuses. Their number in cell type 1 is small.

Cell type 2. In the acini of glands of infantile rats a small number of very dense cells containing large vesicles (secretory droplets) may be seen (Figs. 2, 4



Fig. 1. Low power view of an acinus of the Harderian gland of infantile rat (25 g body weight). The cells are of type 1, with a few large vesicles (secretory droplets) connected by a thick osmiophilic membrane. The acinar lumen is narrow, the cytoplasm is finely granular and many mitochondria are present. Cell boundaries are clearly visible. Magnification: 3.000 (electron optical). N = nucleus, L = lumen, M = mitochondria, LV = large vesicles (secretory droplets), CM = cell membranes

Fig. 2. Detail of cytoplasm in Harderian gland of infantile rat (35 g body weight). Transitional cell (stage between cell type 1 and 2) with large vesicles (secretory droplets) connected by a thick osmiophilic membrane, consisting of small semicircles (arrows), Golgi apparatuses (granules vesicles and membranes). At top: the very dense cell type 2. Magnification: 8.000 (electron optical)

TR = transitional cell, 2 = cell type 2, LV = large vesicles, G = Golgi apparatuses, M = mitochondria



Fig. 3. Details of three transitional type cells of the Harderian gland of the infantile rat (25 g body weight). A few large vesicles (secretory droplets) connected by a thick osmiophilic membrane built up of small semicircles, mitochondria, cell membranes, Golgi apparatuses, cytoplasmic holes representing the initial stage of large vesicle development (arrows)

Magnification: 8.000 (electron optical). N = nucleus, CM = cell membranes, G = Golgi apparatuses, LV = large vesicles, M = mitochondria, H = holes (initial developmental stage of large vesicle)

Fig. 4. Parts of the cytoplasm of three cells of the Harderian gland of an adult rat. In the centre: Cell type 2. At left: Cell type 3. At right: Cell type 4. The cytoplasm contains large vesicles the diameter of which shows a stepwise increase from cell type 2 to cell type 4. Magnification: 3.000 (electron optical). LV = large vesicles (secretory droplets); N = nucleus; 2, 3 and 4 = cell type 2, 3 and 4 =

and 5). The large vesicles are a little more numerous and always larger than in cell type 1. According to observations in this Department the average large vesicle diameter in cell type 1 and 2 is about 1.05 μ (Mázló and ROHONYI, 1963). The high electron density of the cytoplasm in cell type 2 makes it impossible to observe the fine structure of the cytoplasm.



Fig. 5. Parts of the cytoplasm of three cells of the Harderian gland of adult rat. At right: Cell type 2 with dense cytoplasm, large vesicles with osmiophilic bounding membrane. At left: Cell type 3. At top in centre: Cell type 4. The diameter of the large vesicles shows a gradual increase from cell type 2 to cell type 4. There are more mitochondria in cell type 3 than in cell type 4

Magnification: 3.000 (electron optical). N = nucleus; LV = large vesicles (secretory droplets); M = mitochondria; 2,3 and 4 = cell type 2,3 and 4 M = mitochondria; 2, 3 and 4 = cell type 2, 3 and 4

Transitional form (Figs. 2 and 3). As mentioned above, in the infantile gland transitional forms between cell types 1 and 2 also occur. In these the number of the large vesicles (secretory droplets) is always larger than in the quite immature type 1. There is also a gradual increase in the number of Golgi-apparatuses giving the impression that the high electron density in cell type 2 is the result of an overdevelopment of the Golgi-apparatuses. On the other hand, the large vesicles seem to develop from the Golgi-apparatuses, the first stage being a small membrane bound hole, which gradually increases in size. The further increase in size of the large vesicles is due to the incorporation by them of the fine vesicles of the Golgi-apparatuses. The boundary of the large vesicles appears as an interrupted line consisting of small semicircles, suggesting that the fine vesicles of the Golgi-apparatuses together with the Golgi-membranes are incorporated by the large vesicles.

Acta morph. tomus XIII.

5*

A more complete picture of the genesis of the large vesicles (secretory droplets) may be obtained by observing the more mature cells of the glands of adult rats after fixation with special fixatives.

(II) Electron microscopic structure of the Harderian gland of adult rats. In the Harderian gland of adult rats of 70 to 280 g body weight, three cell types (types 2, 3 and 4) may be recognized.

The acini of the glands of adult rats contain a small number of cells of type 2, which are similar to those occurring in infantile glands. These very dense cells generally do not reach the acinar lumen, thus it may be assumed that they are not so high as the more mature types 3 and 4. According to KAN-WAR (1960) the height of the acinar cells depends on the secretory activity of the gland, the fully active cells being the highest.

Cell types 3 and 4 (Figs. 5 and 6): From cell type 2 characterized by a dense ground cytoplasm and few vesicles, there is a gradual transition to more mature cells which contain more larger vesicles (secretory droplets) and whose cytoplasm is clearer. An increase in diameter of the large vesicles also occurs, the avarage being 1.37 μ (Mázló and ROHONYI, 1963). Cell type 3 contains fewer large vesicles than cell type 4, the ground cytoplasm is somewhat denser, the number of mitochondria larger. In the cells of type 4 the cytoplasm is completely occupied by the large vesicles and is represented only by narrow strands between them. The bounding membranes of the large vesicles in cell types 3 and 4 show gradual thinning, they are generally fenestrated, sometimes completely absent.

(III) The process of maturation of the acinar cells. The increase in number and diameter of the large vesicles and the stepwise clearing up of the ground cytoplasm are the main features of acinar cell maturation. The acinar cells become increasingly higher and filled with large vesicles, which, detached from the apical (luminal) end of the cells, enter the acinar lumen. In Fig. 8 the process of acinar cell maturation is shown schematically.

(IV) The development of the large vesicles (secretory droplets). Considering the inverse relationship between the clearing up of the ground cytoplasm of the gland cells in types 3 and 4, and the increase in number and diameter of the large vesicles, it might be suggested that the genesis of the large vesicles is connected with the gradual disappearance of the overdeveloped Golgi-apparatuses of cell type 2.

The first steps of this process are well discernible in the cells of infantile rats. The large vesicles appear in the Golgi-apparatuses as small membranebound holes; later they increase in size, incorporating more and more membranes and fine vesicles from the Golgi-apparatuses. This second stage of development of the large vesicles occurring in cell types 2, 3 and 4 of glands fixated in osmium tetroxyde and embedded in methacrylate is scarcely observable due to the pronounced density of the ground cytoplasm.



Fig. 6a and b Low power electron micrographs of parts of acini of the Harderian gland, of an adult rat. a.: Acinus built up of cells of type 3. b.: Acinus built up of cells of type 4. Fusion of large vesicles (secretory droplets) (arrows). Magnification: 3.000 (electron optical). N = nucleus; L = lumen; ME = myoepithelial cell; LV = large vesicles (secretory droplets); D = detritus like material containing large vesicles in the state of detachment. 3 and 4 = cell type 3 and 4



Fig. 7. Cell type 1, 2, 3 and 4 in acinus of Harderian gland, representing the process of acinar cell maturation (see text)



Fig. 8. Details of the cytoplasm in Harderian gland of an adult rat, fixed in potassium permanganate and embedded in Araldite. Large vesicles (secretory droplets), mitochondria, and a great number of small vesicles and membranes surrounding the large ones may be seen (arrows)

In tissues fixed in potassium permanganate and embedded in methacrylate or Araldite the ground cytoplasm of the cells of types 2, 3 and 4 is, however, quite clear and the profiles of the cytoplasmic organelles and their membranes

are well preserved (Fig. 8). The cytoplasm of the cells is full of small vesicles probably representing Golgi-apparatuses. Swollen mitochondria with mitochondrial cristae may also be seen. The fine vesicles surround the large ones and seem to be incorporated by them. The clearing up of the cytoplasm in cells fixed with potassium permanganate may result from oxydation by the fixative as well as from the swelling of the structures, a possibility which has been described in connection with potassium permanganate fixation (LUFT, 1956). In the present case, however, these fixation artefacts proved useful for the understanding of the development of the large vesicles. Fig. 9. represents schematically our concept of the process of large vesicle genesis.



Fig. 9. Development of large vesicles (secretory droplets) in cells of Harderian gland (see text)

Harderian glands fixed in formol and stained during dehydration with phosphotungstic acid or uranyl acetate did not show any additive special feature in comparison with those fixed in osmium tetroxide. Phosphotungstic acid increased the contrasts diffusely, whereas in glands stained with uranyl acetate the cytoplasm was seen to contain a few small granules (ribosomes?). It was, however, not possible to decide their exact nature as the formol-fixed tissues showed very poor contrast in spite of staining with uranyl acetate.

Discussion

In a detailed study of the Harderian gland of the rat GRAFFLIN (1941) described two types of acinar cells, a dark type and a clearer one, neither of them showing individual characteristics. SCHNEIDER and HAYES (1951) have

also observed two cell types in both lobes of the Harderian gland of the rabbit. COHN (1955) and KANWAR (1960) noted only one cell type in the mouse gland.

From our observations the conclusion has been drawn that there is a gradual transition between the different cell types, representing the maturation process of the acinar cell. The study of the organization and submicroscopic structure of the gland of infantile rats has been a great help in understanding the process of acinar cell maturation. The Harderian gland of the infantile animal contains only immature cells poor in large vesicles (cell types 1 and 2). Accordingly, infantile gland cells are unable to synthesize and contain very little if any porphyrin (FIGGE *et al.*, 1957, ROHONYI *et al.*, 1962).

In connection with the genesis of large vesicles (secretory droplets), the main difficulty is represented by the very osmiophilic ground cytoplasm of cell type 2, in which the fine ultrastructural details are scarcely observable. This difficulty could be overcome by the use of infantile glands or potassium permanganate as fixative. In accordance with BJÖRKMAN *et al.*, (1960), we think that the vesicles originate from the very dense ground cytoplasm consisting of smooth-surfaced tubules, vesicles and granules. It is not clear, however, whether or not the cytoplasmic membranous system really represents overdeveloped Golgi-apparatuses or an endoplasmic reticulum. It is known that the endoplasmic reticulum and the tubules and vesicles of the Golgi-apparatus may be very similar, although according to KUROSUMI (1961) they differ in thickness. Membranes of the Golgi-apparatus are said to be of 60 to 70, those of the endoplasmatic reticulum, 40 Å thick.

According to our own measurements, membranes of the complexes are about 60-125 Å thick, indicating that they may not correspond to the endoplasmic reticulum.

The mode of development of the large vesicles (secretory droplets) of the Harderian gland bears close resemblance to the secretion of mucous droplets by the rat ileum, as described by FREEMAN (1962). Concentration of the secretory products in the Golgi-apparatus has been demonstrated in many cell types (pancreas, hypophysis, spermatids) (BURGOS *et al.*, 1955, CARO, 1961, HAGUENAU *et al.*, 1955). However, the question as to what an extent the Golgi-apparatuses are used up by the large vesicles in the case of the Harderian gland requires further investigations.

If our view on the maturation of acinar cells and genesis of the large vesicles is correct, there still remains a number of unsolved problems concerning the principal features of the function of the Harderian gland. For example, it is not known where the porphyrins are synthesized. According to our still incomplete observations the porphyrins are secreted by the vesicles, on their surface, which would mean that they are formed in the cytoplasmic Golgiapparatuses.

The means by which the secretory products, the large vesicles, are discharged

by the gland cells is not clear either. We have not emphasized this question, but it seems that none of the five types of secretory mechanisms suggested by KUROSUMI (1961) corresponds closely to that seen in the Harderian gland. KANWAR (1960) speaks of "advancement towards the holocrine mode of secretion" and observed, as we did, partly detrituslike material in the acinar lumina, and partly large detached vesicles visible also under the light microscope. It is thought that a thorough investigation of the Harderian gland in the state of chromodacryorrhoea, i.e. in functional hyperactivity, may offer a better opportunity for clarifying the question of the secretory mechanism.

REFERENCES

1. BJÖRKMAN, N., NICANDER, L., SCHANTZ, B.: (1960) On the Histology and Ultrastructure of the Harderian Gland in Rabbits, Z. Zellforsch, 52, 93-104. - 2, BURGOS, M., FAWCETT, D.: (1955) Studies on the Fine Structure of Mammalian Testis. I. Differentiation of Spermatides in the Cat. J. biophys. biochem. Cytol. 1, 287. - 3. CARO, L.: (1961) Electron Microscopic Radioautography of thin Sections: the Golgi-Zone as a Site of Protein Concentration in Pancreatic Acinar Cells. J. biophys. biochem. Cytol. 10, 37. - 4. CHIQUOINE, A. D.: (1958) The Identification and Electron Microscopy of Myoepithel Cells in the Harderian Gland. Anat. Rec. 132, 569-583. - 5. COHN, S. A.: (1955) Histochemical Observations on the Harderian Gland of the Albino Mouse. J. Histochem. Cytochem. 3, 342. - 6. FIGGE, F. H. J., DAVID-HEISER, R. H.: (1957) Porphyrin synthesis by Mouse Harderian Gland Extracts: Sex, Age and Strain Variations. Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.) 96, 437. - 7. FREEMAN, J. A.: (1962) Fine Structure of the Goblet Cell Mucous Secretory Process. Anat. Rec. 144, 341-357. - 8. GRAFFLIN, A. L.: (1941) The Porphyrin Excreting Harderian Gland of Albino Rats. Anat. Rec. 79, 25. 9. HAGUENAU, F., BERNARD, W.: (1955) L'appareil de Golgi dans les cellules normales et cancereuses des vertébrés. Arch. Anat. micr. Morph. exp. 44, 27. – 10. HAYES, E. R.: (1958) Compar-ative Histochemical Studies of the Harderian Gland. Anat. Rec. 130, 436. – 11. HOLT, S. J., HICKS, R. M.: (1961) Studies on Formalin Fixation for Electromicroscopy and Cytochemical Staining Purposes. J. Biophys. Biochem. Cytol. 11, 31. - 12. KANWAR, K. CH.: (1960) Morphological and Cytochemical Studies on the Harderian Glands of Rats. Cellule 61, 128. - 13. Ku-ROSUMI, K.: (1961) Electron Microscopic Analysis of Secretion Mechanism. Int. Rev. Cytol. 11, 1. - 14. LUFT, J. H.: (1956) Permanganate, a New Fixative for Electron Microscopy. J. Biophys. Biochem. Cytol. 2, 799. - 15. MAZLÓ, M., ROHONYI, B.: (1963) A Study of the Diameter Distribution of the Secretory Lipid Vesicles in the Harderian Gland. Acta biol. Acad. Sci. Hung., 14, 191. – 16. MCELROY, L. W., SALOMON, K., FIGGE, F. H. J., COWGILL, G. R.: (1941) On the Porphyrin Nature of the Fluorescent "Blood-Caked" whiskers of Panthotenic Acid Deficient Rats. Science 94, 467. – 17. ORBÁN, I., KELÉNYI, G.: (1962) Submicroscopic Structure and Histophysiology of the Harderian Gland of the Rat. Acta Biol. Acad. Sci Hung. 12, Suppl. 33. - 18. ROHONYI, B., KELÉNYI, G.: (1962) Porphyrin Content of the Harderian Gland of the Rat. Acta biol. Acad. Sci. Hung. 13, 241. - 19. SCHNEIDER, E. S., HAYES, E. R.: (1951) The Histochemistry of the Harderian Gland of the Rabbit. J. nat. Cancer Inst. 5, 257. -20. TA-SHIRO, S., SMITH, C. C., BADGER, E., KEZUR, E.: (1940) Chromodacryorrhoea, a New Criterion for Biological Assay of Acetylcholine. Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.) 44, 658.

ELEKTRONMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG DER HARDERSCHEN DRÜSE BEI RATTEN: DAS REIFEN DER AZINUSZELLEN UND DIE GENESE DER SEKRETORISCHEN BLÄSCHEN

G. KELÉNYI und S. ORBÁN

Die Harderschen Drüsen von infantilen und erwachsenen Ratten wurden elektronenmikroskopisch untersucht. Das Reifen der Azinuszellen war durch vier Zellentypen repräsentiert, die eine allmähliche Zunahme der Zahl und der Größe ihrer großen sekretorischen Bläschen zeigten. Diese Bläschen entwickeln sich aus den Membranen und den kleinen Bläschen des Golgi-Apparates.

165

G. KELÉNYI and S. ORBÁN

ЭЛЕКТРОННОМИКРОСКОПИЯ ХАРДЕРОВЫХ ЖЕЛЕЗ У КРЫСЫ: НАЗРЕВАНИЕ АЦИНОЗНЫХ КЛЕТОК И ГЕНЕЗ СЕКРЕТОРНЫХ ПУЗЫРЬКОВ

Г. КЕЛЕНЬИ и Ш. ОРБАН

Хардеровы железы инфантильных и взрослых крыс были исследованы под электронным микроскопом. Назревание ацинозных клеток было представлено четырьмя клеточными типами, которые показывают постепенное повышение числа и размера их крупных секреторных пузырьков. Эти пузырьки развиваются из мембран и из мелких пузырьков аппарата Гольджи.

DR. G. KELÉNYI DR. S. ORBÁN Pécs, Kórbonctani Intézet, Hungary

Institut für Gerichtliche Medizin (Direktor: Prof. Dr. med. habil. M. VÁMOSI) der Martin-Luther Universität, Halle-Wittenberg und Abteilung für Medizinische Fachpräparatoren (Leiter: R. MATTHIAS), Medizinische Schule der Karl-Marx-Universität, Leipzig

DIE VERWENDUNG VON »PIACRYL ASM« ZU GEFÄSSMORPHOLOGISCHEN UNTERSUCHUNGEN AN NIEREN UND ZUR DARSTELLUNG DER NIERENSEGMENTE

R. MATTHIAS

(Eingegangen am 2. Februar, 1964)

Es wird über den neuen Injektionsstoff »Piacryl ASM« berichtet. Die Anwendung des Korrosionsverfahrens unter Benutzung dieses Injektionsmittels erlaubt im Endziel einen für den Kliniker wichtigen Vergleich. Das Fabrikat wird mit Polymerisationspulver in den Farben rot, gelb, blau und grün geliefert. Postoperativ gewonnenes Organmaterial läßt sich, wie post mortem gewonnene Organe, präparativ mit dieser Methode vorteilhaft bearbeiten. Freilegung der Gefäße und richtiger Lösungsansatz sind wichtig.

Verglichen mit Produkten ähnlicher Art wird beim »Piacryl ASM« das Polymerisat in der Flüssigkeit in kurzer Zeit zum injizierbaren Stoff angequollen. Das »Piacryl ASM« härtet im Wasserbad bei Zimmertemperatur innerhalb von 6–8 Stunden. Die Korrosion erfolgt in Laugen. Im Endergebnis sind die Nierensegmente mit den Kapillargeflechten und den Glomerula gut ausgefüllt und dargestellt.

Mit der Einführung der Kunststoffe in die Korrosionstechnik haben sich für die gefäßmorphologischen Arbeiten wertvolle Perspektiven ergeben. Die große Anzahl im Angebot befindlicher Kunststoffe zeigt, welche chemischen und technischen Möglichkeiten in diesen verborgen sind. Zur Herstellung schöner, didaktisch demonstrativer Präparate ist die Vielfältigkeit des im Handel befindlichen Materials recht günstig. Wenn aber die Anwendung des Verfahrens im Endziel ein Vergleich ist, um den Kliniker (Urologen, Internisten u. a.) in den Untersuchungen zur Gefäßmorphologie auch ein Normalbild zur Seite zu stellen, muß die Ausarbeitung einer möglichst stabilisierten Methode angestrebt werden. Durch diese müßten dann auch mit Sicherheit die Unterschiede des Alters und der pathologischen Prozesse zur Geltung kommen.

1961 habe ich das Verfahren mit »Piacryl ASM« [1] mitgeteilt. Die Arbeit mit diesem Kunststoff hat sich für die genannten Untersuchungen und für andere Verwendungsbereiche [3] bewährt.

Die derzeit gebräuchlichsten Korrosionsmassen sind das sogenannte »Plastoid« [7], die Polyvenilchlorid-Aceton-Cyklohexanon-Lösung nach Mun-KÁCSI [6] und das Technovit [8]. Harz- und Celluloidmassen wie von HYRTL [5] und STORCH [9] beschrieben, bieten für die heutigen diffizilen Untersuchungsmethoden kaum noch eine Verwendungsmöglichkeit.

Wie alle Piacrylerzeugnisse ist auch das »Piacryl ASM« auf Estern der Methacrylsäure aufgebaut. Es wird in Form einer monomeren Flüssigkeit und

R. MATTHIAS

eines polymeren Pulvers in den Handel gebracht.¹ Die für die Polymerisation notwendigen Kontaktstoffe sind teils im Pulver und teils in der Flüssigkeit enthalten. In der praktischen Anwendung geschieht die Polymerisation unter dem Einfluß von Wärme und Kontakten. Der Pulveranteil im »ASM« wird aus dem zerkleinerten Blockpolymerisat gewonnen; ihm werden auch die Farbstoffe zugesetzt. Die Farbstufen rot, gelb, blau und grün haben wir als ausreichend angesehen. Sie lassen sich auch untereinander mischen. Im Gegensatz zum Perlpolymerisat besteht hier im verwendeten splitterförmigen Polymerisat der Vorteil, daß die Anquellzeit, d. h. also die Zeit vom Mischen des Pulvers mit der Flüssigkeit bis zur Erreichung einer für die Injektion optimalen Viskosität, auf 10—15 Minuten beschränkt bleibt.

Der komplizierte innere Aufbau der Niere wird noch von CLARA [2] bestimmt durch die Verhältnisse der Blutgefäßversorgung. Einzelne Krankheitsbilder der Nieren sind in ihrer Gefäßversorgung wenig erforscht. Es ist deshalb sehr verständlich, daß der Kliniker bei gefäßmorphologischen Untersuchungen auch der Korrosionstechnik erhöhte Aufmerksamkeit widmet. Unter Berücksichtigung von Anamnese und klinischem Befund lassen sich im Vergleich damit befriedigende, wenn nicht gar aufschlußreiche Ergebnisse erzielen. Die Darstellung der Nierensegmente kann so für den Urologen und dem Internisten wertvolle Hinweise geben. In variablen Untersuchungstechniken erweist sich dabei in einzelnen Fällen die Ausgußmethode mit »ASM« der histologischen Technik überlegen. Das makroskopisch gewonnene Bild gibt klare Übersicht über den angioarchitektonischen Gefäßverlauf der Niere und läßt eindeutige Ergebnisse über Variationen der A. renalis in den Untersuchungen festlegen.

Nach GRAVES [4] gibt es 5 Segmentarterien. Ihr Versorgungsbereich ist identisch mit den Nierensegmenten. Dabei teilt sich der ventrale Hauptast der A. renalis gewöhnlich in 4 Zweige (Fig. 1. u. 2.).

Den dorsalen Hauptast bezeichnet er als die 5. Segmentarterie und den dazu gehörenden Versorgungsbereich als »posterior segments«. Die auch von GRAVES beschriebenen Abweichungen im extrarenalen Gefäßverlauf (Fig. 3.) können durch die histologische Technik nicht erfaßt und dargestellt werden. Das Verhalten akzessorischer Gefäßanlagen im jeweiligen Segmentbereich kann als Vergleich zu den klinischen Befunden und zum strukturellen Aufbau am Korrosionspräparat wertvolle Aufschlüsse vermitteln.

Besonders bei postoperativem Material gewinnt die hier angeführte Verwendung von »Piacryl ASM« unter Berücksichtigung der Technik besondere Bedeutung.

Werden postoperativ gewonnene Nieren einer solchen Behandlung zugeführt, kann man mit den üblichen Vorbereitungen zur Injektion nicht manipulieren. Wegweisend für die Behandlung des Organes ist der klinische Befund.

¹ Lieferfirma: VEB Stickstoffwerk Piesteritz-Wittenberg, DDR



Abb. 2. Rechte Niere. Segmentdarstellung. Apikalis (gelb); oberes (grün); mittleres (orange); unteres (rot). Dorsal (blau) »posterior segments«

Abb. 3. Rechte Niere. Untere Segmentarterie (gelb) akzessorisch angelegt *Abb. 4.* Rechte Niere. Berührungszone der beiden Gefäßschalen dorsal. Dorsal: rot, ventral: gelb



Die Arbeiten beginnen mit der Freipräparation der meist sehr kurz vorhandenen »Gefäßstumpfen«. Diese diffizile Präparation kann durch eine Präparierlupe erleichtert werden. Bei Vorhandensein einer mehr oder weniger stark ausgeprägten Capsula adiposa, muß diese zwecks zuverlässiger extrarenaler Gefäßorientierung sehr sorgfältig und mit einem stumpfen Gegenstand hiluswärts bis zum Margo medialis entfernt werden. Die Gefäße dürfen nicht verletzt werden.

Nach ihrer Freilegung kann man mit dem Einbinden der Knopfkanülen beginnen. Die Lumengröße der Kanülen richtet sich stets nach der Größe und Wandbeschaffenheit der Gefäße. Bei zarten und pathologisch veränderten oder in leichter Autolyse befindlichen Gefäßwänden wähle man lieber kleinere



Abb. 1. Schematische Übersicht über¹ den Verlauf der Segmentarterien im Hilus renalis. (Nach Graves)

Kanülen. Ein kompliziertes Einbinden kann das Abreißen der Restgefäße verursachen. Bei der Einmaligkeit mancher Operationsorgane kann das ein nicht wieder gutzumachender Schaden sein, da eine Injektion auch bei der Beherrschung größter Kunstfertigkeit dann nicht mehr möglich wäre.

Lebendfrisches Material (unmittelbar nach der Operation) sollte man wegen der noch vorhandenen intravaskulären Gefäßkontraktionen möglichst erst 8–12 Stunden nach der Operation der Bearbeitung zuführen.

Bei post mortem vorliegenden Organen spielt dieser Faktor keine so gewichtige Rolle.

Manche Autoren empfehlen vor der Gefäßinjektion die Durchspülung der Gefäße mit physiologischer Kochsalzlösung. Ich kann bei Verwendung von »ASM« nicht dazu anraten. Die ASM-Flüssigkeit verbindet sich nicht mit dem Wasser. In den Kapillargebieten kommt es zu einem Flüssigkeitsstau. Das dadurch entstandene »Polster« verhindert die Injektionsmasse am Vordringen, während sonst die große Geschmeidigkeit derselben alle Hindernisse in den Gefäßbahnen umspült. Arteriogramme oder andere röntgenologische Untersuchungen sind kein Hindernis für nachträglich vorzunehmende Injektionen.

Während der Operation (Exstirpation) oder Sektion entstandene Ver-

R. MATTHIAS

letzungen am Organ (Risse, Einschnitte ins Parenchym u. a.), würden für die zu injizierende Masse Auslaufstellen bilden. Man dichtet diese vor der Injektion mit filtrierter Zuckergelatinelösung ab, der man vor Gebrauch einige Tropfen Formalin zusetzt. Später läßt sich diese Gelatineauflage sehr leicht entfernen. Ähnlich verfährt man, wenn aus dem Organ histologisches Untersuchungsmaterial in geringerem Umfang entnommen werden muß.

Nach Abschluß der vorbereitenden Phase (Freilegung der Gefäße, Einbinden der Kanülen, Abdichten etwaiger Verletzungen am Organ) sollte man Menge der Flüssigkeit und Farbe für Injektionen festlegen. Bei der Berechnung der zur Füllung erforderlichen Gesamtmenge ist stets zu berücksichtigen, daß ein Teil der Injektionsmasse durch den Anquellvorgang an Volumen verliert. Zu bedenken wäre ferner, daß durch die erlangte Viskosität der Masse, Reststände im Mischgefäß, in der Kanüle und in der Spritze zurückbleiben. Deshalb sind die Instrumentarien unmittelbar nach jeder Injektion mit Aceton, Benzol zu reinigen.

Zur Herstellung einer injektionsfertigen Masse verfertigt man eine 5-10%ige Lösungsmischung. Immer richtet sich die Quantität der anzusetzenden Lösung nach der Größe des Organes; man soll dabei etwa 20% Schwund einkalkulieren.

Ist die Injektion an größeren Nieren durch guterhaltene Gefäße zügig durchführbar, kann man ohne Bedenken mit einer 10% igen Lösungsmischung arbeiten. Bei Kaninchennieren empfiehlt es sich, mit einer 3-5% igen Mischung die Injektion vorzunehmen. Im letzteren Fall verändern sich allerdings die Anquell- und Polymerisationszeiten.

Das vorher abgewogene Pulver wird der Flüssigkeit unter Schütteln zugesetzt. Als Mischgefäße benutzt man am besten Bechergläser. Die Bewegung des Mischgefäßes wird solange beibehalten, bis sich das Pulver nicht mehr absetzt und eine injektionsfertige, sirup-honigartige Viskosität durch Anquellung erreicht ist. Wird zu früh injiziert, wenn die Anquellung den unerläßlichen Grad noch nicht erreicht hat, polymerisiert der Kunststoff in den Hohlräumen nicht. Es bildet sich vielmehr eine gummöse-klebrige Masse, die das Präparat wertlos macht. Beim Ansetzen der Masse sollte die Raumtemperatur beachtet werden; eine Raumtemperatur von $+18-20^{\circ}$ C begünstigt die physikalisch-chemische Reaktion.

Die anzusetzende Menge (Flüssigkeit plus Pulver) richtet sich auch bei Nieren nach der Größe des Organes. Bei Füllung der einzelnen Segmentabschnitte wird die Menge des Harzes auch nach der Größe der einzelnen aberrierenden Gefäße berechnet. Entsprechend der cranio-caudalen Verlaufsrichtung der A. renalis in den Hilus ist die untere »Segmentarterie« gewöhnlich die längste und das apikale Gefäß das kürzeste. Beim Lösungsansatz ist dies in die Berechnung zur Füllung der Segmentabschnitte oder der Gefäßschalen zur Darstellung der Ventral- und Dorsalseite einzubeziehen. (Fig. 4.).

Acta morph. tomus XIII.

170

Bei Füllung der Segmente ist für jeden Abschnitt die Menge separat anzusetzen; aus Abb. 2. ist das Ergebnis einer solchen Injektion abzulesen. Nach jeder Injektion ist das jeweilige Gefäß durch eine Ligatur zu isolieren, um den Rücklauf in den anderen Abschnitt zu verhindern. Erst nach Abschluß der Injektion können diese Ligaturen gelöst werden, um eine Verbindung mit dem Hauptstamm der A. renalis zu ermöglichen. Zur Injektionsdurchführung haben sich Original-Record-Spritzen gut bewährt. Für Füllung größerer Gefäße haben sich Spritzen mit Veterinärkonus als brauchbarer erwiesen. Es soll nochmals betont werden, daß nach der Injektion Instrumentarium und Gerätschaften sofort mit Lösungsmitteln gereinigt werden müssen. Trotz guter Reinigung könnte am Spritzenkörper ein unsichtbarer Kunststoffilm zurückbleiben, man reibe deshalb den Spritzenkolben mit etwas Vaseline ein. Ein Anhaften des Kolbens an den Glaskörper der Spritze ist so nicht möglich.

Der in das Organ injizierte Kunststoff polymerisiert ohne besondere Wärmezufuhr. Eine solche ist zur Beschleunigung des exothermischen Härtungsvorganges nicht erforderlich. Das Organ wird nur in ein mit Wasser gefülltes Gefäß gelegt und zwar so, daß es durch die Auflage keine Druckstellen bekommt. Die Regulierung der Polymerisation erfolgt dann durch jene Faktoren, die teils schon die vorbereitende Phase bestimmten: Mischungsverhältnisse (Flüssigkeit plus Pulver); Raumtemperatur (Kälte und Wärme) und hinzukommend die Anwesenheit verschiedenartiger Zell- und Körperflüssigkeiten, z. B. im Pyelon, entzündlich-eitrige Prozesse.

Die Anhärtungszeit ist durch die genannten Komponenten variabel und liegt bei 5-10%igen Lösungsansätzen bei ca. 6-8 Stunden; bei 3%igen über diese Zeit hinaus.

Mischung %	Raumtemp. + 0 C	Anquellzeit, Minuten	Anhärtungs- geschwindig- keit, Stunden
5	20—22	12	7—8
10	20	6	4—5
20*	20	4	2,5

* nur in seltenen Fällen anzuraten

Nach erfolgter Härtung ist das Organ von umgebenden Fett- und Bindegewebe zu befreien. Von den extrarenalen Gefäßen ist die Gefäßwand sorgfältig abzupräparieren.

Korrodiert wird in 27% iger Kalilauge. Man legt das Organ in diese. Da es, durch das spezifische Gewicht der Lauge bestimmt, an der Oberfläche schwimmt, wird es, y = mit Glaswolle im Cellophanbeutel, im Glas unter den Flüssigkeitsspiegel gedrückt. Den Wärmeschrank stellt man auf $+37^{\circ}$ C ein und läßt dann das Organ bei dieser Temperatur ca. 8 Stunden und länger korrodieren.

Da das Polymerisat gegen konzentrierte Säuren nicht beständig ist, dürfen diese zur Korrosion nicht benutzt werden. Schwache Säuren dagegen sind verträglich. Laugen haben sich aber für das Korrosionsvorhaben als brauchbarer erwiesen.

Absolut sicher ist die Korrosion nach 20 Stunden abgeschlossen; die Größe des Organes bestimmt auch hier den Zeitfaktor.

Ist die Korrosion abgeschlossen, wird die Lauge vorsichtig vom Präparat abgegossen. Unter einem mäßigscharfen Wasserstrahl, kalt oder warm, wird das am Präparat befindliche Restgewebe abgespült. Dies kann bei Nieren von Erwachsenen bedenkenlos geschehen, bei kleinen und kleinsten Organen jedoch ist allergrößte Vorsicht zu beachten. Beim Vorhandensein akzessorischer Gefäße und bei der Segmentdarstellung an postoperativem Material gilt gleiches, da die einzelnen Segmente untereinander keine Verbindung besitzen und einzeln auseinanderfallen. Nur bei erfolgter Injektion des Venensystems ist ein Zusammenhalt gewährleistet. Die Anastomisierung der Nierenvenen untereinander unterscheidet diese vom arteriellen System, der weitgehende Parallelverlauf zu den Segmentarterien verhindert das Auseinanderfallen derselben [10].

Bei Tumorgewebe kann es nach der Korrosion zu Verklumpungen kommen. Das Präparat im warmen Wasser geschwenkt, erleichtert die Entfernung der bröckligen Massen.

Das naß-feuchte Präparat wird auf Fließpapier oder aufgehängt bei + 20-30° C im Wärmeschrank oder bei Zimmertemperatur zum Trocknen gebracht.

Nach der endgültigen Trocknung treten an den Präparaten zeitweilig weiße Beläge auf. Die Intima der Gefäße ist dann nicht vollständig von der Korrosion erfaßt. Sie legt sich dann als weiße Binde an einzelnen Stellen um den Gefäßausguß. Die Beläge sind keine Kalkniederschläge. Auch kann es an größeren Gefäßstämmen zu leichten Trübungen des an sich transparenten Ausgußes kommen. Die Ursache ist darin zu sehen, daß durch das umgebende Gewebe Feuchtigkeit in die oberflächlichen Schichten des noch nicht völlig polymerisierten Kunststoffes eingedrungen ist. Die schwachen Trübungen beeinflussen die wissenschaftlichen Untersuchungen am Präparat nicht. Die weißen Beläge brauchen zu Besorgnissen keinen Anlaß geben. Diese Nebenerscheinungen können durch geschickte Manipulationen mit einer feinen, spitzen Kanüle und einer 2 ml Spritze beseitigt werden. Man füllt diese Spritze mit verdünntem Zaponlack und sticht vorsichtig durch das Kapillargeflecht hindurch, tastet die stärkeren Gefäße ab und gibt einen kleinen Tropfen des Lackes auf diese. Der Lack breitet sich fulminant über die weißlichen Stellen aus und löscht diese augenblicklich. Sehr feine Restauflagerungen sind mit einem automatischen Sprühgerät anzusprühen. Recht gute Erfahrungen liegen

mit dem Sprühgerät »Air fresh« und dem »Flibol« vor. Es wäre nur vor Sprühversuchen mit acetonlöslichen Lacken zu warnen. Die mikroskopisch feine Struktur des Kapillargeflechtes und die Glomerula würden dem auflösenden Charakter des Acetons nicht standhalten. Die Glomerula werden durch unser Verfahren einwandfrei dargestellt (Fig. 5.).

Die hier beschriebene Methode wurde experimentell erarbeitet. Das »Piacryl ASM« erreicht auch dann einen hohen Polymerisationsgrad, wenn die Mischungsanteile variieren. Die Polymerisation verzögert sich nur bei stark



Abb. 5. Arterielle-ASM-Injektion. Arteriae interlobulares mit den Glomerula bei einer Vergrößerung von 16 : 1

unterkühlten Organen und kann beim Gefrieren zeitweilig aufgehoben werden. Für bestimmte klinische Fragestellungen, die sich nicht nur am Operationsmaterial ausreichend klären lassen, hat sich auch post mortem gewonnenes Organmaterial als brauchbar verwenden lassen. So gewonnene Organe wurden im Hinblick auf verschiedene Krankheitsbilder präparativ bearbeitet. In einer späteren Arbeit wird in Gemeinschaft mit dem Kliniker darüber berichtet.

Herrn Prof. Dr. med. habil. M. VÁMOSI habe ich für das den Arbeiten gegenüber aufgebrachte Verständnis und die sich daraus ergebende Unterstützung sehr herzlich zu danken.

LITERATUR

1. ARTELT, F., R. MATTHIAS: (1961) Darstellung des Hohlraumsystems menschlicher Organe mit »Piacryl ASM«. Z. med. Labortechnik 2, 255-262. – 2. CLARA, M.: (1938) Anatomie und Biologie des Blutkreislaufes in der Niere. Arch. Kreisl.-Forsch. 3, 42-94. – 3. CREUTZ, U.: Die Lagebeziehungen zwischen Bronchialbaum und größeren Lungengefäßstämmen bei Bisamratte (Ondatra zibethica) und Nutria (Myocastor coypus) im Hinblick auf die Anpassung an deren Tauchvermögen. Diplom-Arbeit, Zoologisches Institut der Universität Halle/Saale. – 4. GRAVES, F. T.: (1956) The Aberrant Renal Artery – The Arterial Segments of the Kidney. J. Anat. (Lond.), 90, 553-58. – 5. HYRTL, J.: (1860) Handbuch der praktischen Zergliederungskunst, Corrosions- und Macerationspräparate. Wien, 204. – 6. MUNKÁCSI, ST.: (1957) Über die Verwendung der Kunststoffe Polyvenilchlorid und Piacryl in der Korrosionstechnik. Z. wiss. Mikr. 63, 352. – 7. SCHUMMER, A.: (1935) Ein neues Mittel (Plastoid) und Verfahren korrosionsanatomischer Präparate. Anat. Anz. 81, 177. und (1951) 98, 288. – 8. SCHLÜTER, O.: (1962) Organinjektionen mit Acrylatharz zur Korrosionspräparation. Der Präparator, Z.

R. MATTHIAS

Museumstechn. 8, 83–90. – 9. STORCH, G.: Das Celluloid und seine Anwendung für Injektion von Blutgefäßen. Z. Tiermed. 3, 173. – 10. SIGEL, A., W. THORBAN: (1961) Gefäßanatomie der Niere. Med. Bild-Dienst 3, 19–20.

USE OF "PIACRYL ASM" FOR THE MORPHOLOGICAL STUDY OF RENAL VESSELS AND THE DEMONSTRATION OF RENAL SEGMENTS

R. MATTHIAS

"Piacryl ASM" is a new injectable substance marketed together with the polymerization powders, in different colours (red, yellow, blue, green), for making corrosion preparations from organs obtained at surgery or necropsy. The vessels used for injection must be prepared at surgery or necropsy properly and care should be taken that the concentration be adequate.

In fluids "Piacryl ASM" is converted into an injectable medium much quicker than is the case with other products of a similar nature. "Piacryl ASM" solidifies in the water bath at room temperature in about 6-8 hours. Corrosion is effected by means of alkalis. In the preparations the renal segments — including capillary plexuses and glomeruli — are clearly shown.

ПРИМЕНЕНИЕ ПРЕПАРАТА «ПИАКРИЛ ASM» ПРИ МОРФОЛОГИЧЕСКОМ ИССЛЕДОВАНИИ СОСУДОВ ПОЧЕК И ДЛЯ ИЗОБРАЖЕНИЯ ПОЧЕЧНЫХ СЕГМЕНТОВ

Р. МАТТИАС

Обсуждается новый препарат для инъицирования: Пиакрил ASM. Применене коррозионного метода исследования при помощи этого препарата предоставляет возможность для проведения сравнений, важных с точки зрения клиники. Пиакрил ASM доставляется вместе с полимеризационным порошком красного, синего и зеленого цвета. Материал органов, полученных после операций, так же как и органы, полученные посмертно, можно хорошо обрабатывать при помощи этого метода препарирования. Обнажение сосудов и правильная исходная смесь для растворения являются весьма важными предпосылками.

По сравнению с подобными препаратами в «Пиакриле ASM» полимеризат в короткое время набухает в жидкости и пригоден для инъицирования. Если «Пиакрил ASM» содержать в водяной бане комнатной температуры, он затвердевает в течение 6—8 часов. Коррозия осуществляется в щелочи. В конечном счете почечные сегменты, капиллярные сплетения и гломерулы превосходно заполняются и изображаются.

R. MATTHIAS: Leipzig, Med. Schule d. Karl-Marx-Univ., Abt. f. Medizin. Fachpräparatoren, DDR

174

Abteilung für Morphologie (Direktor: Prof. Dr. med. N. G. Kolossow) des Pawlow-Instituts für Physiologie der Akademie der Wissenschaften der UdSSR, Leningrad

NEUE MORPHOLOGISCHE ANGABEN ÜBER DIE SENSIBLE INNERVATION DER GANGLIEN DES AUERBACHSCHEN GEFLECHTS

A. A. MILOCHIN

(Eingegangen am 8. Februar, 1964)

Eine afferente Innervation der Nervenzellen der vegetativen Ganglien ist seit langer Zeit eine bestrittene Frage.

Autor konnte an den Ganglionzellen des Auerbachschen Plexus zeigen, daß die Endästchen der afferenten Nervenfasern im direkten Kontakt mit den gangliösen Neuronen kommen können, womit eine afferente Innervation dieser Neuronen bewiesen ist.

Diese morphologischen Beobachtungen bestätigen die Annahme, daß die gangliösen Neuronen mit dem Zentralnervensystem nicht nur durch präganglionere (efferente) Fasern verbunden sind, denn es gibt auch eine direkte afferente Leitungsbahn zum Zentralnervensystem von der Nervenzelle der peripheren vegetativen Ganglien.

Das Studium der afferenten (sensiblen) Innervation der vegetativen Ganglien ist für ein tieferes Verständnis der funktionellen Konstruktion des vegetativen Nervensystems von großer Bedeutung.

Den Grundstein zu diesen Forschungen legten die russischen Histologen MICHAILOW (1908, 1909, 1910, 1911) und DOGIEL (1908). Sie waren die ersten, die echte sensible Endigungen im bindegewebigen Stroma der extramuralen und intramuralen vegetativen Ganglien und ebenfalls in den spinalen Ganglien fanden. Diese wichtige Entdeckung der alten russischen Histologen erhielt volle Bestätigung in den Werken so hervorragender Neuromorphologen wie DE CASTRO (1918, 1923), LAWRENTJEW (1943), NONIDEZ (1946), KOLOSSOW (1949, 1952, 1954), ÁBRAHÁM (1951) und STÖHR (1957). Nach der Veröffentlichung dieser Arbeiten blieb kein Zweifel darüber, daß im bindegewebigen Stroma und in der Kapsel des vegetativen Ganglions, an seinen Blutgefäßen und sogar zwischen den Gliaelementen tatsächlich zahlreiche und ihrer Struktur nach verschiedenartige sensible Nervenendigungen vorhanden sind.

Allein die Hauptfrage — kann es eine sensible Innervation der gangliösen Neurone selbst geben? - blieb unentschieden. Diese Frage wurde umstritten, und noch heute hat der wissenschaftliche Meinungsstreit nicht aufgehört. Das ist auch vollkommen begreiflich; diese Frage hat eine prinzipielle Bedeutung, da es sich hier um die sensible Innervation der Nervenelemente selbst handelt.

Viele Forscher halten die afferente Innervation der gangliösen Neurone für unmöglich und sogar für »unnütz«, d. h. sie verneinen sie kategorisch. Der Grund für diese Ablehnung liegt teilweise darin, daß die Histologen keine

A. A. MILOCHIN

überzeugende Nachweise einer afferenten Innervation der Nervenzellen der vegetativen Ganglien erbringen konnten. Erst vor kurzem sind in unserer Abteilung solche Nachweise erzielt worden, und zwar mittels vergleichenden



Abb. 1. Zwei vegetative Nervenzellen im Gebiet typischer Rezeptorenapparate, die aus einer afferenten markhaltigen Nervenfaser gebildet sind. Muskelschicht des Drüsenmagens der Ente (Anas platyrhynchos). Bielschowsky-Gros. Zeiss. Obj. Apochromat HI 90/I. 30; Ok. K 7

histologischen Untersuchungen, die — wie bekannt — oft die kompliziertesten und verwickeltesten Fragen, besonders im Gebiet der Neurobiologie, zu klären imstande sind.

Es stellte sich heraus, daß bei einigen Schwimmvögeln (Anas platyrhynchos, Netta rufina) im Auerbachschen Geflecht der Speiseröhre und des Drüsenmagens außer den großen Ganglien noch kleine Ganglien mit undicht gelegenen

Nervenzellen und sogar einzeln liegende Neurone vorkommen. Dies bot die Möglichkeit, die Beziehungen der Endverzweigungen der sensiblen (afferenten) Nervenfasern zu den Nervenzellen sehr genau zu verfolgen (MILOCHIN 1960, 1961, 1963; KOLOSSOW und MILOCHIN 1963).

Bei der Fortsetzung dieser Untersuchungen gelang es mir unlängst, eine Reihe neuer Beobachtungen zu machen, die noch überzeugender die direkte Verbindung der afferenten Nervenfasern mit den vegetativen Neuronen zeigen. Alle diese Untersuchungen sind mit Hilfe der Bielschowsky-Grosschen Methode an den Ganglien des Auerbachschen Geflechts des Drüsenmagens der Ente (Anas platyrhynchos) durchgeführt worden.

Unter den Präparaten waren diejenige besonders überzeugend, an denen sich die Beziehungen der Endverzweigungen der afferenten Nervenfasern zu den einzeln liegenden gangliösen Zellen des Auerbachschen Geflechts beobachten ließen. Mit der Beschreibung dieser Präparate möchte ich die Darlegung der morphologischen Nachweise zugunsten einer sensiblen Innervation der Nervenzellen beginnen.

In Abb. 1. ist eine markhaltige Nervenfaser, die in einem kleinen Nervenbündel des Auerbachschen Geflechts verläuft, zu sehen. Nachdem die Nervenfaser den Bündel verlassen hat, verliert sie die Myelinhülle und teilt sich in zwei Hauptäste. Jeder von diesen Ästen verzweigt sich stark und bildet im interstitiellen lockeren Bindegewebe der Muskelschicht eigenartige büschelartige Rezeptorenapparate. Ihre morphologische Struktur ist durchaus typisch für die Rezeptoren, die gewöhnlich in der Muskelschicht des Drüsenmagens der Ente vorkommen, und dies demonstriert klar die afferente (sensible) Natur der sie bildenden markhaltigen Nervenfaser.

Im Bereich eines jeden Rezeptors, der bei der Verzweigung des Hauptastes gebildet wird (Abb. 1), liegen einzelne Nervenzellen des Auerbachschen Geflechts, welche ihrem Aussehen nach zu den Zellen des Typs von Dogiel gehören. Die Endäste der Rezeptoren treten in die engste Beziehung mit beiden gangliösen Zellen. Sie sind besser zu sehen, wenn man Abb. 1. mit den unter stärkerer Vergrößerung verfertigten Abbildungen 1a und 1b vergleicht.

In Abb. 1a ist eine Nervenzelle aus dem Rezeptorenfeld, das aus dem rechten Hauptast der afferenten markhaltigen Nervenfaser (siehe Abb. 1) gebildet ist, dargestellt. Zu dieser gangliösen Zelle zieht von oben eines der Endästchen des Rezeptors, und in der unmittelbaren Nähe von dieser Nervenzelle, mitten in den sie umgebenden Gliozyten bildet dieses Endästchen eine plattenartige Lamelle mit einem feinen fibrillären Netzchen. Von dieser Lamelle verläuft in der Richtung des Neurons ein kurzes, an seinem Ende sich etwas verdickendes Ästchen, das direkt an den Körper des Neurons anliegt, wie es deutlich an dem Präparat zu ersehen ist.

Zu derselben Nervenzelle treten noch einige sensible Terminalästchen heran. Ein Teil derselben endigt zwischen den um das Neuron gelegenen Glio-

177



Abb. 1a. Der direkte Kontakt eines Endästchens des Rezeptors ist besonders deutlich zu sehen (Pfeil.). Ausschnitt aus Abb. 1



Abb. 1b. Beziehungen der Endästchen des Rezeptors zu der Nervenzelle. Ausschnitt aus Abb. 1

zyten, die anderen Terminalen liegen mit ihren Endringen und Lamellen unmittelbar dem Dendrit der Nervenzelle an.

In Abb. 1b ist die Nervenzelle aus dem Felde des oberen Rezeptors, der aus dem linken Ast ein und derselben afferenten Nervenfaser (siehe Abb. 1.) gebildet ist, zu sehen.



Abb. 2. Afferente sensible Innervation der Nervenzellen des Ganglions des Auerbachschen Geflechts. Drüsenmagen der Ente (Anas platyrhynchos). Bielschowsky-Gros. Zeiss. Obj. Apochromat HI 90/I. 30; Ok. KIO

Zur Nervenzelle ziehen zwei Terminalästchen des Rezeptors. Sie endigen ebenfalls mit fibrillären Endlamellen oder Ringchen, die entweder zwischen den Gliozyten um das Neuron liegen oder direkt mit den breiten Dendriten des Neurons in Berührung treten.

Somit ist in das dargestellten Präparat deutlich ein direkter Kontakt der Endästchen der Nervenfaser, die ganz zweifellos afferenter Natur ist, mit den Nervenzellen des Auerbachschen Geflechts zu beobachten, und es ist ein klarer Beweis für die sensible Innervation der vegetativen Neuronen.

Ähnliche Wechselbeziehungen der afferenten Nervenfasern und der Nervenzellen habe ich ebenfalls in den größeren Ganglien des Auerbachschen Geflechts beobachtet.

Abb. 2 zeigt einen kleinen Ganglion aus dem Auerbachschen Geflecht des Drüsenmagens der Ente. Er besteht aus nur fünf nicht sehr dicht liegenden Nervenzellen (Zellen des I Typs von Dogiel) und befindet sich gänzlich in der Schlinge des Blutkapillars.

Zum Ganglion tritt eine afferente Nervenfaser, die schon früher ihre Myelinhülle verloren hat, heran. Sich in dem Ganglion verzweigend, bildet sie einen typischen Rezeptorenapparat mit zahlreichen Terminalästchen, welche die für den Rezeptor charakteristischen fibrillären Endlamellen und Ringchen tragen.

Die Mehrzahl der Terminalästchen verbreitet sich in dem bindegewebigen Stroma des Ganglions, einige Terminalästchen verlassen sogar seine Grenzen und verzweigen sich im lockeren umgebenden Bindegewebe.

Zu jeder gangliösen Zelle laufen einzelne Terminalästchen des Rezeptors, die hier auch endigen. Ihre Beziehungen mit den Neuronen sind besonders gut an den zentral gelegenen gangliösen Zellen (siehe Abb. 2a) zu ersehen. Zu dieser Zelle verlaufen einige Ästchen. Sie endigen mit fibrillären plattenartigen Lamellen, mit kleinen Ringchen oder Knöpfchen; die Mehrzahl dieser Endstrukturen liegt zwischen den Gliozyten, sehr nah dem Körper der Nervenzelle und ihrer Dendriten. Ein Ästchen aber dringt in die Nervenzelle selbst ein und berührt sie mit seinem Endknöpfchen (Abb. 2a, Pfeil).

Abb. 3. veranschaulicht das Gebiet eines großen Ganglions des Auerbachschen Geflechts mit vielen gangliösen Zellen und zwischen ihnen verlaufenden Bündeln von Nervenfasern. Eine von diesen Nervenfasern die sich im Gebiet des Ganglions verzweigt, bildet einen typischen Rezeptorenapparat, der reich mit Terminalästchen versehen ist. Diese Ästchen haben Beziehungen zu allen Gewebsstrukturen des Ganglions: sie liegen in seinem Stroma, dringen in die Bündel der Nervenfasern ein und treten schließlich zu den Nervenzellen heran, wo sie entweder zwischen den die gliösen Zellen umgebenden Gliozyten oder an den Körpern und Fortsätzen der Nervenzellen selbst endigen.

Somit zeigen die hier angeführten morphologischen Beobachtungen, daß die Endverzweigungen der afferenten (sensiblen) Nervenfasern in eine enge Beziehung mit den Neuronen der vegetativen Ganglien treten. Dies beweist, daß die gangliösen Neurone ihre eigene Rezeptorenfelder besitzen und folglich eine Veränderung ihres funktionellen Zustandes als Quelle reflektorischer Einflüsse sowohl in dem Nervensystem selbst, als auch im ganzen Organismus dienen kann.

LITERATUR

1. ÁBRAHÁM, A.: (1951) The Comparative Histology of the Stellate Ganglion. Acta biol. Acad. Sci. Hung. 2, 311–354. – 2. DOGIEL, A. S.: (1908) Der Bau der Spinalganglien des Menschen und der Säugetiere. Fischer, Jena. – 3. CASTRO DE, F.: (1918) Nota sobre cietras termina-



Abb. 2a. Beziehungen der Endästchen der sensiblen Nervenfaser zu den gangliösen Neuronen. Die unmittelbare Berührung mit der Nervenzelle eines sensiblen Endästchens ist deutlich zu beobachten (Pfeil). Ausschnitt aus der Abb. 2



Abb. 3. Endverzweigungen der afferenten (sensiblen) Nervenfaser im großen Ganglion des Auerbachschen Geflechts. Drüsenmagen der Ente (Anas platyrhynchos). Bielschowsky-Gros. Zeiss. Obj. Apochromat HI 90/I. 30; Ok. KIO

183

ciones nerviosas en el ganglio cervical superior simpatico humano. Bol. Soc. esp. Biol. 4. -4. CASTRO DE, F.: (1923) Evolucion de los ganglios simpáticos vertebrales y prevertebrales. Conexiones y citoarquitectonia de algunos grupos de ganglios, en el niño y hombre adulto. Trab. Lab. Invest. biol. Univ. Madr. 20, 113–208. — 5. Колосов, Н. Г.: (1949) Некоторые вопросы морфологии автономной нервной системы позвоночных. Тезисы докладов 5 Всесоюзного съезда анатомов, гистологов и эмбриологов, Ленинград, 225. — 6. Колосов, Н. Г.: (1952) Рецепторы ганглиев вегетативной нервной системы. Арх. анат. 29, 16-23. 7. Колосов, Н. Г.: (1954) Иннервация внутренних органов и сердечно-сосудистой системы. Изд. АН СССР, Москва-Ленинград. - 8. Колосов, Н. Г. и Милохин, А. А.: (1963) Афферентная иннервация ганглиев вегетативной нервной системы. Арх. анат. 44, 3-23. 9. Лаврентьев, Б. И.: (1943) Чувствительная иннервация внутренних органов. Журн. общ. биологии 4, 232-249. - 10. Міснаноw, S.: (1908) Die feinere Struktur der sympathischen Ganglien der Harnblase bei den Säugetieren. Arch. mikr. Anat. 72, 554-574. -11. Михайлов, С. Е.: (1909) Микроскопическое строение ганглиев солнечного сплетения и других ганглиев пограничного ствола симпатического нерва. Невролог. вестник 16, Kazahb. - 12. MICHAILOW, S. E.: (1910) Über die sensiblen Nervenendapparate der zentralen sympathischen Ganglien der Säugetiere. J. Psychol. Neurol. 16, 269-278. - 13. MuxaŭAOB, С. Е.: (1911) Гистология Nervi Sympathici. С.-Петербург. — 14. Миссник, А. А.: (1960) Über die afferente Innervation der peripherischen vegetativen Neurone. Z. mikr. - anat. Forsch. **66**, 483—488. — 15. Милохин, А. А.: (1961) Новые данные по афферентной иннервации периферических нейронов вегетативной нервной системы. Доклады АН СССР, 141, 726-729. 16. MILOCHIN, A. A.: (1963) Morphologischer Nachweis der afferenten (sensiblen) Innervation der peripheren Neurone des vegetativen Nervensystems. Z. mikr.-anat. Forsch. 69, 615-629.-— 17. NONIDEZ, J.: (1946) Afferent Nerve Endings in the Ganglia of the Intermuscular Plexus of the Dog's Oesophagus. J. comp. Neurol. **85**,177—189. — 18. STÖHR, PH. JR.: (1957) Mikroskopische Anatomie des vegetativen Nervensystems, in Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. Springer, Berlin, Bd. IV/5

NEW MORPHOLOGICAL DATA CONCERNING THE SENSORY INNERVATION OF AUERBACH'S GANGLIA

A. A. MILOCHIN

The cells of the autonomous nerve fibres were long regarded as devoid of afferent innervation.

The author has succeeded in demonstrating on Auerbach's ganglia that the terminal branches of the afferent nerve fibres may come in direct contact with ganglionic neurons, a phenomenon that would prove the afferent innervation of these neurons.

These morphological observations show that the ganglionic neurons are connected with the central nervous system not solely by way of efferent fibres, but that there exists a direct afferent path from the peripheral autonomous ganglia to the central nervous apparatus.

НОВЫЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ ОБ АФФЕРЕНТНОЙ ИННЕРВАЦИИ ГАНГЛИЕВ АУЭРБАХОВА СПЛЕТЕНИЯ

А. А. Милохин

Афферентная иннервация нервных клеток вегетативных ганглиев долгое время считалась невозможной.

На примере ганглиев ауэрбахова сплетения автору удалось показать, что терминальные веточки афферентных нервных волокон могут вступать в прямое соприкосновение с ганглиозными нейронами, что и доказывает афферентную иннервацию этих нейронов.

И теперь, после этих морфологических наблюдений, следует считать, что ганглиозные нейроны связаны с центральной нервной системой не только преганглионарными (эфферентными) нервными волокнами, но что имеется также и прямой афферентный нервный проводящий путь от ганглиозной клетки периферического вегетативного ганглия в центральную нервную систему.

A. A. MILOCHIN: Leningrad, Abteilung f. Morph. d. Pawlow-Instituts f. Physiologie, USSR
RECENSIONES

FORENSIC MEDICINE

Edited by E. Somogyi

Medicina, Budapest 1964. 523 pages, 155 illustrations

The volume written by 12 prominent representatives of Hungarian forensic medicine, gives an up-to-date review of medico-legal theory and practice.

Hungarian forensic medicine is comparatively poor in textbooks, although numerous Hungarian representatives of this discipline are in good international repute. Thirty-six years have elapsed since the publication of B. KENYERES's book, and significant changes have occurred since that time in medical. legal and social conditions alike. Besides, the rapid technical progress has raised a great number of medico-legal problems which were unknown a few decades ago. A newly published work has, under such conditions, to make good a deficiency of many years, to show the progress made in forensic medicine and impart, in addition, medical knowledge from the angle of changed social and legal conditions. That these requirements are satisfactorily met by the new work will be acknowledged by its readers.

Although serving as a textbook for medical students, the material compiled in the work is considerably richer than that usually contained in such books. Apart from comprising the entire material of classical forensic medicine, the volume presents a careful and critical analysis of all recent achievements in the branch under discussion.

The first chapters contain the history of forensic medicine in Hungary, further a thorough survey of existing legal regulations, and they deal also with the legal and ethical aspects of the medical profession and practice. The activities of the medical officer in his capacity as medico-legal expert are likewise discussed in these chapters which acquaint the reader with the general aspects, the theory and the practice of medico-legal work. All subsequent chapters, dealing with special subjects, contain information on the legal aspects of the subject concerned. Each chapter of the book forms, thus, an integral whole comprising all medical and legal knowledge necessary for the purposes of the subject

discussed therein. Treatises on traffic accidents. on thermal radiation and electric injury include the analysis of earlier unknown medico-legal questions. The chapter on the problems of paternity shows that the recent achievements of genetics, blood-grouping and anthropology are fully utilized in forensic medicine. The chapters treating the problems of sudden and unexpected death, further of vital reactions, prove that useful relationships exist between anatomy-histopathology and forensic medicine. It is evident from the discussion of up-to-date laboratory procedures, biological, biochemical and other methods of investigation that advanced forensic medicine makes full use of them, especially when trying to solve criminological and toxicological problems. The chapter on health insurance will prove useful for the practitioner. The chapters are purposefully proportioned. and a bibliography at the end of each facilitates the acquisition of further knowledge. A detailed index ensures easy and quick orientation.

The presentation of the book and the good quality of the illustrations are a credit to the publishers. Certain chapters are abundantly endowed with figures, while their number is rather limited in others, although a work of this nature and size could have profitably used even twice as many illustrations. Although the work meets a long felt need, and will thus be sought not merely by students but also by medical practitioners and men of law, it has nevertheless been edited with a strictly limited number of copies. While postgradual education in other medical branches may be based on works written in foreign languages, this is impossible in the field of forensic medicine where medical training has to be accompanied by a thorough knowledge of legal regulations many of which vary from country to country. It is thus to be feared that the limited size of the edition will leave many wouldbe purchasers dissatisfied.

J. JUHÁSZ

Printed in Hungary

A kiadásért felel az Akadémiai Kiadó igazgatója

Műszaki szerkesztő: Farkas Sándor

A kézirat nyomdába érkezett: 1964. XI. 24. – Terjedelem: 8,25 (A/5) ív, 45 ábra + 3 melléklet

64.59922 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 "Kultúra" 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 destinés à la redaction à l'adresse suivante:

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

Toute correspondance doit être envoyée à cette même adresse.

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

On peut s'abonner à l'Entreprise du Commerce Extérieur de Livres et Journaux «Kultúra» (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 «Kultúra» (Budapest I., Fő utca 32. Текущий счет № 43-790-057-181) или его заграничные представительства и уполномоченные.

INDEX

MORPHOLOGIA NORMALIS ET EXPERIMENTALIS

Matwejewa, N. A. : Zur Frage der afferenten Innervation der Netzhaut	93
Péczely, P.: Functional-Anatomical Examination of the Interconnexion between the Morphological Features of the Thoracic Vertebrae in Birds of Prey and their Acquisition of Food	101
Németh-Csóka, MKaiser, M. : The Effect of Aging-Induced Changes of Collagen Protein on Fibrillogenesis in vitro	119
Scherebzow, M. A.: Angaben über die Morphologie der Nervenfasern in einigen Nerven von Haustieren	131
Földes, IMódis, LSüveges, I.: Investigation of the Mucopolysaccharides in the Prox- imal Epiphyseal Cartilage of the Rat: A Comparison of the Methods of Histochem- ical Assay	141
Kelényi, GOrbán, S.: Electron Microscopy of the Harderian Gland of the Rat: Matura- tion of the Acinar Cells and Genesis of the Secretory Droplets	155
Matthias, R. : Die Verwendung von »Piacryl ASM« zu gefäßmorphologischen Untersuchun- gen an Nieren und zur Darstellung der Nierensegmente	167
Milochin, A. A. : Neue morphologische Angaben über die sensible Innervation der Gang- lien des Auerbachschen Geflechts	175
Recensiones	185

Index: 26.017

25,- Ft



Morphologica

Academiae Scientiarum Hungaricae

ADIUVANTIBUS

I. BALÓ, P. ENDES, K. FARKAS, L. HARANGHY, B. KELLNER, I. KROMPECHER, GY. ROMHÁNYI, J. SZENTÁGOTHAI

> redigit I. TÖRŐ

TOMUS XIII * FASCICULUS 3



ACTA MORPH. HUNG.

ACTA MORPHOLOGICA A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA ORVOSTUDOMÁNYI KÖZLEMÉNYEI

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

Technikaj szerkesztő:

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 »Kultúra« (Budapest I., Fő utca 32. Bankkonto Nr. 43-790-057-181) oder bei seinen Auslandsvertretungen und Kommissionären. Abteilung für Zytologie und Histogenesis (Abteilungsleiter: Dr. P. M. Mazsuga) des Zoologischen Institutes der Wissenschaftlichen Akademie der USSR

DIE MORPHOGENESE DER GELENKKAPSEL UND IHRER BLUTGEFÄSSE

P. M. Mazsuga

(Eingegangen am 11. März, 1963)

Die Differenzierung der fibrösen und synovialen Schichten in der Gelenkkapselanlage erfolgt gleichzeitig mit der Herausbildung der Gelenkhöhle, was anscheinend mit den biologischen Eigenschaften der Synovialmembran zusammenhängt. Die Blutbahn der Kapselanlage entsteht aus den Kapillargefäßen, die aus der periartikulären vaskulären Zone in die Kapsel hineinwachsen. Im Laufe der pränatalen Ontogenese wird die Histo-und Angioarchitektonik der Gelenkkapsel durch die Wachstumsrichtung der Skelettanlagen der Extremitäten und durch den Charakter der Beweglichkeit im entstehenden Gelenk bestimmt. Der funktionelle Faktor hat in der Morphogenese der Gelenkkapsel und ihrer Blutbahn auch in der postnatalen Entwicklungsperiode eine führende Rolle.

Die Struktur der Blutbahn steht in der Gelenkkapsel mit den mechanischen Besonderheiten des Gelenks in jedem Falle in engem Zusammenhang.

Die Synovialhaut und ihr reiches Blutgefäßsystem bilden gemeinsam die aktive Oberfläche für den intraartikulären Stoffwechsel. Die Synovialfalten und -zotten sind die mit Synovialhaut bedeckten Fortsätze der inneren Zone des Adergeflechts der Kapsel, die in die Kapselhöhle eindringen und auf diese Weise die Oberfläche für den intraartikulären Stoffwechsel vergrößern. Sie entstehen als Reaktion auf einen anhaltenden adäquaten Reiz. Die Synovialfalten und -zotten sind keine konstanten und notwendigen Gebilde des Gelenks. Ihre Zahl, Form und Maße variieren in jedem Gelenk innerhalb weiter Grenzen, in Abhängigkeit von der physischen Aktivität des Individuums. Diese Gesetzmäßigkeit läßt sich sowohl während der Ontogenese, als auch an der vergleichenden anatomischen Serie von Wirbeltierpräparaten nachweisen. Die Zotten und Falten treten vorzugsweise an jenen Stellen auf, wo sich die Synovialflüssigkeit ansammelt oder verlagert, ferner in jenen Teilen der Synovialhaut, die den beweglichen Gelenkteilen anliegen, d. h. an den Stellen, wo das Adergeflecht der Synovialmembran die maximale Dichte zeigt und wo der intensivste intraartikuläre Stoffwechsel vor sich geht.

Der Gefäßreichtum der Synovialhaut zeigt im Laufe der Ontogenese erhebliche Schwankungen. Bei der Erhöhung der dynamischen Belastung des Gelenks nimmt die Vaskularisationsintensität zu, bei Immobilisation des Gelenks hingegen vermindert sie sich. Diese Schwankungen des Gefäßreichtums manifestieren sich vor allem an den Stellen, wo sich die Synovialflüssigkeit verlagert, ferner wo die Synovialmembran einer Reibung ausgesetzt ist.

Einleitung

Die Gelenkkapsel ist ein komplexes Organ. Ihre einzelnen Teile — die fibröse und die synoviale Membran — sind von unterschiedlicher Struktur und üben verschiedene Funktionen aus. Die fibröse Membran erfüllt im Grunde genommen eine mechanische Funktion, und sie bildet in jedem Gelenk eine Art zirkuläres Band. Dieser Funktion der Außenmenbran der Gelenkkapsel entspricht ihre derbfaserige Struktur, deren Entwicklungsgrad mit der me-

1

P. M. MAZSUGA

chanischen Belastung in jedem Gelenkteil in unmittelbarer Korrelation steht. In jenen Teilen, die einer ständigen Spannung ausgesetzt sind, bildet die fibröse Schicht der Kapsel durch die starke Konzentration von parallelen Fasern kompakte Verdickungen. Diese Verdickungen sondern sich an einzelnen Teilen des Gelenks — wie bekannt — in Form von selbständigen Strängen ab, die gewöhnlich Bänder genannt werden. Die Funktion der fibrösen Schicht, die Gelenkenden der sich zusammenfügenden Knochen zu befestigen, ist so augenfällig, daß auf dieser Grundlage der gesamte, in der Gelenkkapsel konzentrierte Gebildekomplex, Gelenkband (ligamentum capsulare) genannt wird.

Einen ganz anderen Bau hat die Innenmembran der Gelenkkapsel, die die Gelenkflüssigkeit ausscheidet, ihren ununterbrochenen Stoffwechsel sichert und dadurch die Voraussetzungen zur normalen Funktion des Gelenks schafft. Die aktive Tätigkeit der Synovialhaut scheint die Differenzierungsrichtung und den Zustand einiger Gelenkgewebe (der Gelenkknorpel) zu bestimmen. Anderseits hat der funktionelle Zustand des Gelenks, die Intensität seiner Arbeit und sogar der Charakter und der Umfang der Beweglichkeit in der Gelenkfuge einen wesentlichen Einfluß auf das morphologische Bild der Synovialhaut. Deshalb haben die einzelnen Teile der Synovialmembran, sogar bei allgemeiner funktioneller und morphologischer Identität, in den verschiedenen Gelenken und sogar innerhalb des gleichen Gelenks wesentliche strukturelle Eigenheiten, die von einer Reihe von Forschern untersucht wurden.

LUBOSCH [27] und PAYR [34] beschrieben die Synovialmembran als ein wenig differenziertes Knorpelgewebe. Diese Anschauung wurde jedoch von den Morphologen nicht bestätigt, denn außer LUBOSCH konnte niemand eine morphologische oder funktionelle Ähnlichkeit zwischen der Knorpel und der Synovialmembran feststellen.

Die histologische Struktur der Synovialmembran wurde in den Arbeiten von TILLMANS [43, 44], HAGEN-THORN [5], HAMMAR [9], STSCHELKUNOW [40], DAVIES [2], LANG [24, 25], IMERLISCHWILI [11, 12] u. a. ausführlich beschrieben. KALLISTOW [13, 14] hat die Synovialmembran des Gelenks allseitig in vergleichenden anatomischen Experimenten und unter Berücksichtigung des Alters und der Funktion erforscht. Ein gebührender Platz wurde diesen Ergebnissen von BARON [1] eingeräumt.

Unter den anderen Strukturen der Synovialmembran erweckten ihre in die Gelenkhöhle eindringenden Fortsätze das besondere Interesse der Forscher. Diese Fortsätze erhielten wegen ihrer Form den Namen Zotten oder Falten. Diese Produkte der Synovialmembran in den Gelenken wurden erstmalig von Kölliker [19] beschrieben, und lange Zeit glaubte man, sie seien gefäßlos. Seit der Zeit formten sich viele Ansichten über die Struktur und den Ursprung der Synovialzotten. Einige Forscher [42, 9] betrachteten sie als rein proliferative Gebilde, die als Reaktion auf einen Reiz oder sogar einen Ent-

Acta morph. tomus XIII.

188

zündungsprozeß aus den Gelenkgeweben entstehen. Andere [5] brachten das Erscheinen der Zotten mit der Größe des intraartikulären Drucks in Zusammenhang. Wieder andere [16] beschrieben die Anzahl der Zotten und den Charakter ihrer Verteilung auf der Oberfläche der Synovialmembran als ein Artenmerkmal, das nach der Geburt in unverändertem Zustand bestehen bleibt.

KEY [15] war der Meinung, daß die Zahl der Zotten in jedem Gelenk im geraden Verhältnis zu dem Umfang des Gelenks selbst steht.

Bereits HAGEN-THORN erwähnt jedoch den direkten Zusammenhang der Blutgefäße und der unter ihnen liegenden Gewebe mit den Synovialzotten, und daß der Großteil der Zotten sich in jenen Teilen der Synovialmembran lokalisiert, die das dichteste Gefäßnetz aufweisen [5]. Im Laufe der Ontogenese setzt HAGEN-THORN das Erscheinen der ersten Zotten in die pränatale Entwicklungsperiode, wenn in den Gelenken der Frucht aktive Bewegungen erscheinen, die — seiner Meinung nach — eine Änderung des intraartikulären Drucks hervorrufen. Auf diese Weise glaubt er in der Größe des intraartikulären Drucks die unmittelbare Ursache der Entstehung von Synovialzotten erblicken zu können.

KALLISTOW [13, 14] betrachtet die Synovialzotten als reaktive Strukturen, die als Antwort auf die dynamische Belastung im Gelenk auftreten. Während der intrauterinen Entwicklungsperiode fällt das Erscheinen der Zotten — nach den Angaben von KALLISTOW und HAGEN-THORN — mit dem Beginn der aktiven Gelenkbeweglichkeit zusammen. Während der postnatalen Ontogenese wurde bei Tieren und Menschen ein direkter Zusammenhang zwischen der Zahl der Synovialzotten und dem dynamischen Zustand des Gelenks festgestellt. Die Steigerung der Gelenkbeweglichkeit führt nicht nur zu einer Vermehrung der Synovialzoten im Gelenk, sondern auch ihre Form wird komplexer. Bei Immobilisation des Gelenks oder bei einer mit der Beschäftigung des Menschen zusammenhängenden Einschränkung der Gelenkbeweglichkeit hingegen können sich die Synovialzotten in einem beliebigen Stadium zurückentwickeln, wobei sie nach der Wiederaufnahme der funktionellen Gelenksaktivität erneut in einer der dynamischen Belastung entsprechenden Zahl in Erscheinung treten.

Die Synovialmembran reagiert auf in die Gelenkhöhle eingeführte mechanische Reizmittel ebenfalls mit einer Vermehrung und Formveränderung der Zotten. Auf dieser Grundlage gelang KALLISTOW zu der Schlußfolgerung, daß die Zotten eine eigenartige Reaktion der Synovialmembran auf den mechanischen Reiz darstellen.

Die Zotten haben ihren eigenen Entwicklungs- und Wachstumszyklus, der mit ihrer Involution in einem beliebigen Entwicklungsstadium endet. Das Erscheinen der Zotten beginnt damit, daß durch die Proliferation der »Epitheloid- und Bindegewebszellen« der Synovialmembran ein »zellulärer Fleck« entsteht. Dieser Zellfleck wandelt sich allmählich in eine geringe Vorwölbung, das »Zellhügelchen« um, woraus sich dann eine einfache papillenförmige Zotte entwickelt. Im Laufe des weiteren Wachstums kann die papillenförmige Zotte auch eine andere Form erhalten, oder sie kann durch die Entstehung von Tochter- bzw. Enkelzotten zu einem komplexen baumförmigen Gebilde werden.

Die Vaskularisation der Zotten erfolgt nach KALLISTOW ganz zu Beginn ihrer Entwicklung. Jede Zotte hat zuführende und abführende Gefäße, ein Anastomosennetz von Blutgefäßen im Zottenkörper und schließlich ein komplexes »Gefäßknäuelchen« an den Enden der sekundären Zotten. Die sekundären Zotten erhalten ihre Gefäße etwas später, während die kleinen Zotten zweiten und dritten Ranges sowie die sich zurückentwickelnden Zotten gefäßlos sind. Die Involution der Zotten beginnt jeweils mit der Verödung und dem Verschwinden ihrer Blutgefäße.

Das sind die wichtigsten Folgerungen KALLISTOWS über die Entstehungsursachen, den Entwicklungsmechanismus und den Bau der Synovialzotten. Wir möchten jedoch die Aufmerksamkeit auf zwei Tatsachen lenken, die unseres Erachtens prinzipielle Bedeutung haben und in einem gewissen Widerspruch zueinander stehen.

1. Die Genese der Zotten bringt KALLISTOW mit der Zellproliferation an einem bestimmten Abschnitt der Synovialmembran in Zusammenhang, die als Antwort auf einen mechanischen Reiz auftritt. Nach der Zellreaktion und der Anlage der werdenden Zotte beginnt ihre Vaskularisation. Seiner Meinung nach ist diese Reihenfolge der Zottengenese die Ursache dessen, daß die sekundären jungen Zotten keine Gefäße aufweisen. Mit anderen Worten hat die Gefäßreaktion bei der Entstehung der Zotten einen sekundären und untergeordneten Charakter.

2. Die Involution der Zotten beginnt mit der Verödung und dem allmählichen Verschwinden der Blutgefäße, und hiernach atrophiert auch die Zotte selbst, bis zu ihrem vollkommenen Verschwinden. Auf diese Weise kommt nach KALLISTOWS Angaben dem Blutgefäßsystem bei dem Involutionsvorgang der Synovialfortsätze eine erstrangige, führende Rolle zu.

Der Rollenwechsel des Blutgefäßsystems in den verschiedenen Lebensetappen der Zotte bleibt in den Untersuchungen KALLISTOWS ungeklärt.

Mitteilungen über die Blutgefäße von verschiedenen Gelenkkapseln finden wir in den Arbeiten einer Reihe von Autoren. Golew [8] lenkte die Aufmerksamkeit auf die topographische Gefäße der Intervertebralgelenkkapseln von der Richtung der Faserstrukturen, die die Kapseln befestigen. Die Mitteilungen von NIKANOROW [31], GLJADKOWSKI [7], LEBEDEWA [26], RJABOKON [35], Kos [18], und FILATOWA [3] enthalten hauptsächlich Angaben über die Blutversorgungsquellen der Gelenkkapsel und berühren kaum die Architektonik der Blutbahn. RJABOKON [35] ist der Meinung, daß sich

die Gefäßverzweigungen und -anastomosen im Beutel zwischen der fibrösen und der synovialen Schicht befinden. Die Schichten selbst sind angeblich gefäßlos.

GITIS [6] demonstrierte am Kniegelenk des Menschen nicht nur die Blutversorgungsquellen der verschiedenen Teile der Kapsel, sondern zum Teil auch die altersbedingten Besonderheiten des Gefäßsystems dieses Organs. Er ist der Ansicht, daß bei Kindern die Arterien des Beutels und der Synovialhaut im Kniegelenk bis zum Alter von vier Jahren nur schwach entwickelt sind. Es scheint, als ob sich die Gefäße der Synovialmembran und der darunterliegenden Schicht erst im fünften Lebensjahr entwickelten. Im Gegensatz dazu ist nach SEREBRJAKOWS Angaben das venöse System der Synovialmembran des Ellbogengelenks bei kleinen Kindern reicher als bei Erwachsenen [41].

Nach IKONNIKOWA [10] entwickelt sich das arterielle System der Gelenkkapsel in der intrauterinen Entwicklungsphase, und der Gefäßreichtum der Kapsel hängt von der Form des Gelenks ab.

Die Arbeiten von PAWLOWA [32, 33], LANG [20, 21, 22, 23], SCHAMA-JEW [36, 37], STSCHEGOLJKOW [38, 39] u. a. sind speziell der Untersuchung der Blutgefäße der Synovialmembran der Gelenke gewidmet. Nach den Ergebnissen dieser Autoren besteht das Gefäßsystem der Synovialmembran aus Kapillarnetzen, deren Dichte auf der Membranfläche ungleichmäßig verteilt ist. In Richtung der Zotten und Falten bilden die Blutgefäße der Synovialschicht Vorwölbungen in Form von Schlingen, Knäueln usw., deren Dynamik bei den verschiedenen funktionellen Zuständen des Gelenks STSCHEGOL-KOW eingehend untersucht hat. Kapillare Gebilde, die den Gebilden in der Synovialmembran ähnlich sind, wurden von LANG auch in den Schleimbeuteln und in den Sehnenscheiden beschrieben. In den Arbeiten von Lang finden wir jedoch auch Angaben die denen der vorerwähnten Autoren widersprechen. Die Zahl und Form der Zotten und Falten betrachtet er z. B. als reine altersbedingte Merkmale, die von den anderen Verhältnissen unabhängig sind. Die Komplexität der Synovialhaut ist nach LANG von der Blutbahn unabhängig und nur durch die Wachstumsprozesse der Gewebsstrukturen bedingt; deshalb fand er unter den unterschiedlich geformten Zotten und Falten auf der Synovialhaut des Kniegelenks auch gefäßlose Fortsätze, die angeblich aus der Synovia ernährt werden. Daher könnten die Synovialzotten selbst bei gleichem Entwicklungsmechanismus nicht nur verschiedenen Bau, sondern auch verschiedene Nährquellen haben. Diese Vorstellungen über Natur und Bau der Synovialzotten steigern die Unklarheit hinsichtlich ihrer funktionellen Aufgabe.

Material und Methodik

Untersucht wurden die Kapseln der Schulter-, der Ellbogen-, der Handwurzel-, der Knie- und der Metatarsophalangeal- sowie der Interphalangealgelenke von Menschen und von Tieren verschiedenen Alters. In Totalpräparaten von Extremitäten injizierten wir schwarze Tusche in die Blutbahn der Gelenkkapseln. Das Gefäßnetz der Kapselwand, der Synovialzotten und -Falten untersuchten wir an Präparaten, die nach der Methode von SPALTEGOLZ aufgehellt und in Kanadabalsam eingebettet wurden.

Die Entstehung der Gewebsstrukturen der Kapsel und ihrer Blutbahn im Laufe der Embryogenese, ferner der Entwicklungsmechanismus der Synovialzotten wurden an den fötalen Gelenken von Menschen und von Tieren verschiedener Altersgruppen an histologischen Schnitten und aufgehellten Präparaten untersucht.

Bei der Untersuchung der Blutgefäße der Kapsel wurde das größte Gewicht auf zwei Fragen, und zwar a) auf die Klärung der Verhältnisse und Faktoren, welche die Architektonik der intraorganischen Blutbahn der fibrösen und synovialen Schicht der Kapsel bestimmend beeinflussen, und b) auf die Klärung der Natur und Funktion der Synovialzotten und -Falten gelegt.

Die in bezug auf diese beiden Fragen erhaltenen Ergebnisse wurden zum Teil mitgeteilt [28, 29, 30].

Ergebnisse

Aus den embryologischen Untersuchungen sehen wir, daß das Blutgefäßnetz im Gelenkgebiet dann erscheint, wenn dort die Differenzierung der einzelnen Organe und Gewebe einsetzt. Dieses Netz ist eines der Teile der vaskulären Zone, die sich in der Umgebung der Skelettanlagen der Extremitäten entwickelt. Einzelne Äste des Kapillarnetzes dringen in die Gelenkkapselanlage ein, noch bevor die Differenzierung der Synovial- und der fibrösen Membran beginnt. Aus dem primären Kapillarnetz differenzieren sich im Laufe des Wachstums allmählich die Arterien und die Venen. Die Kapselanlage besteht in dieser Phase durchweg aus den Zellen des embryonalen Bindegewebes und unterscheidet sich morphologisch in keiner Hinsicht von der peripheren Schicht der Knochenanlagen, aus denen sich später die Knochenhaut entwickelt. Auf den ersten Blick scheint auch die Vaskularisation der Vorstufen der Knochenhaut und des Gelenkbeutels in gleicher Weise zu erfolgen. Die Stelle der zukünftigen Gelenkspalte ist in diesem Zeitpunkt mit Mesenchym gefüllt, das keinerlei Anzeichen einer Differenzierung zeigt.

Im Laufe der späteren Ontogenese beginnen sich — parallel dem Wachstum und der Entwicklung des Skeletts — die Zellen der äußeren Zone der Kapselanlage zu verlängern, sich proximal und distal zu strecken (Abb. 1), was durch das Längenwachstum der mit der Kapsel verbundenen Knochenanlagen gefördert werden dürfte. Für diese Hypothese sprechen vor allem folgende Tatsachen: a) die Zellen der Innenschicht der Kapselanlage, die seitens der wachsenden Knochen keiner Spannung ausgesetzt sind, erhalten keine längliche Form; b) die Zellstreckung der peripheren Schicht und ihre Längsorientierung wird im Laufe des weiteren Skelettwachstums noch intensiver; c) am meisten ausgeprägt sind die Erscheinungen der Zellstreckung und der Bildung

von faserigen Strukturen an jenen Stellen, wo die Kapsel der größten Spannung ausgesetzt ist, d. h. Stellen wo Bänder entstehen.

Gleichzeitig mit der Reorganisation der Gewebsstruktur der Kapsel erfolgt auch die Umorientierung ihrer intraorganischen Gefäße, der Wirkung der Spannkräfte und der Lokalisation der zellulären und fibrösen Elemente entsprechend.

Mit dem Einsetzen der Gewebsmetamorphose in der Außenschicht der Kapselanlage erhalten die Zellen ihrer Innenschicht feste Konturen, wobei sie ihre mehr oder weniger runde Form beibehalten (Abb. 1). Unmittelbar unter diesen Zellen entwickelt sich aus den intraorganischen Gefäßen der Kapselanlage ein dichtes Kapillarnetz, das die sich differenzierende innere Zellplatte entlang der gesamten Oberfläche auskleidet. Auf diese Weise entsteht der vaskulär-zelluläre Komplex der Synovialmembran der Gelenkkapsel, dessen Entstehung und Entwicklung mit der progressiven Resorption des Mesenchyms zwischen den Gelenkenden der Knochenanlagen und der Anhäufung der Synovialflüssigkeit in diesem Raum einhergeht. Die Resorption des Mesenchyms zwischen den Gelenkenden erfolgt so lange, bis die Knorpelfläche vollkommen von den mesenchymalen Zellen frei wird, wobei auf der Knorpelfläche, wie übrigens auch anderwärts, in dieser Periode in den Skelettanlagen intensive Wachstumsprozesse vor sich gehen. Die Oberfläche der Knochenanlage, die während der Embryogenese mit der Synovia in Kontakt steht, bewährt ihren Knorpelzustand während des ganzen Lebens des Individuums. Wie bekannt, erstrecken sich die Ossifikationserscheinungen in der postnatalen Periode nicht auf diese Oberfläche.

Zum Zeitpunkt, wo im Gelenk die Synovialhöhle erscheint, erreicht die Differenzierung der Skelettmuskelteile in diesem Gebiet ein Stadium, in dem die aktive Beweglichkeit der Extremitätenanlage möglich wird. Die aktive Beweglichkeit der Skelettmuskelteile übt bereits in der frühen Phase der Ontogenese eine Wirkung auf die Differenzierung sämtlicher Strukturen der Gelenkkapselwand aus, u. a. auch auf die Architektonik ihrer intraorganischen Blutbahn. Die bestimmende Rolle der Gelenkfunktion auf die Strukturen der Kapsel bleibt auch in allen folgenden Lebensabschnitten unverändert erhalten.

Mit dem Erscheinen der aktiven Beweglichkeit der Extremitätenanlage schließen sich den Spannkräften, die mit dem Skelettwachstum in Zusammenhang stehen und auf die Kapsel in einer (Längs-) Richtung wirken, auch die Kräfte an, die mit dem Charakter der Beweglichkeit in der gegebenen Gelenkfügung zusammenhängen und die in anderen Richtungen wirken. Durch die qualitativen und quantitativen Eigenschaften der aktiven Beweglichkeit wird jenes morphologische Spezifikum bestimmt, das im Zeitpunkt der Geburt für die Kapsel und ihr Gefäßsystem in jedem Gelenk charakteristisch ist. Das dynamische Moment, welches in der gegebenen Artikulation wirkt, erstreckt sich dabei nicht nur auf ihr äußeres Blatt, das die Skeletteile unmittelbar ver-



Abb. 1. Teil der Kniegelenkanlage beim Schaf (Fötus, 3,5 Monate) 1 = Knorpelgewebe; 2 = Gefäßkanal in der Knorpel; 3 = Gelenkkapselanlage; 4 = Gelenkhöhle. Hämatoxylin-Eosinfärbung. Obj. $8 \times$, OK. $12,5 \times$

Abb. 2. Die Blutgefäße der Kapsel des Kubitalgelenks beim Kalb. 1 = Gefäße in der fibrösen Schicht der Kapsel; 2 = Blutgefäßnetz in der Synovialschicht. Aufgehelltes Präparat, Tuschinjektion. 40fache Vergrößerung

Abb. 3. Blutgefäße des Kapselvorderteiles des Schultergelenkes beim Kalb. a = Gefäßnetz in der fibrösen Schicht der Kapsel. b = Gefäßnetz in der Synovialschicht der Kapsel. Aufgehelltes Präparat. Tuschinjektion. 40fache Vergrößerung

bindet. In nicht geringerem Maße ist die Innenmembran der Kapsel sowie ihr Gefäßsystem der Wirkung der dynamischen Kräfte unterworfen. Die Gefäße der Synovialhaut bilden ja einen Teil der allgemeinen Blutbahn der Kapsel, und die Synovialmembran selbst ist mit den Geweben, die unter der Außenmembran liegen, untrennbar verbunden.

Der Zusammenhang zwischen der Architektonik der Blutbahn der Kapsel und den biomechanischen Verhältnissen des Gelenks läßt sich an den aufgehellten Totalpräparaten der Kapsel mit injizierten Blutgefäßen gut verfolgen. Mit Hilfe eines binokulären Stereomikroskops kann man an den aufge-

hellten Präparaten den Charakter der Gefäßverästelung, die Wechselbeziehungen zwischen den Elementen der intraorganischen Blutbahn, die Lokalisationstiefe ihrer einzelnen Teile, die Richtung der Gefäßstämme usw. feststellen. Nach genauer und vollständiger Füllung der Gefäße lassen sich an solchen Präparaten die Gefäße sämtlichen Kalibers bis zu den Kapillaren gut beobachten.

An zahlreichen Präparaten von Schulter-, Ellbogen-, Handwurzel-, Knie-, Mittelfuß- und Fingergliedgelenken von Tieren und von Menschen konnten wir uns davon überzeugen, daß die Blutbahn in jeder Gelenkkapsel durch ein geschlossenes Gefäßsystem vertreten ist, dessen Struktur geflechtartig ist. Die größten Gefäßstämme (Arterien und Venen) nehmen einen oberflächlichen Verlauf. In den tiefen Schichten wird das Geflecht dichter und besteht aus kleineren Gefäßen. In der subsynovialen Schicht erhöht sich die Dichte der kleinen Gefäße noch mehr und in der Synovialmembran selbst ist die Blutbahn durch Kapillarfelder verschiedener Dichte vertreten (Abb. 2). Da die Differenzierung der zuführenden und abführenden Wege in dem primären Kapillarnetz gleichzeitig erfolgt, verlaufen die Arterien und Venen in der Gelenkkapsel auf jedem Niveau nebeneinander. In der Regel wird die Arterie von zwei oder sogar von drei dünnen Venen begleitet. Die Venen verlaufen gewöhnlich an beiden Seiten der Arterie und haben immer ein engeres Lumen, wobei die parallel verlaufenden Stämme untereinander durch zahlreiche kurze Anastomosen verbunden sind.

Bei solchen allgemeinen Baumerkmalen hat das intraorganische Gefäßsystem in den verschiedenen Abschnitten der Kapsel und in den verschiedenen Gelenken strukturelle Besonderheiten, die mit dem Bau und den biomechanischen Verhältnissen des Gelenks selbst zusammenhängen. Das bezieht sich vor allem auf die Dichte der Gefäße in den einzelnen Geflechtabschnitten sowie auf die Architektonik des Geflechts. An jenen Stellen, wo in der Kapsel die Streckkraft in einer Richtung wirkt, erinnert das Gefäßsystem an die Blutbahn von Bändern und Sehnen. Wir sehen in überwiegender Mehrzahl parallel verlaufende Stämme, die in der Richtung der Spannkraft liegen. Die parallelen Stämme sind untereinander durch kurze, querlaufende Anastomosen verbunden. Das Kapillarnetz der Synovialhaut besteht an diesen Stellen aus einseitig gestreckten Maschen (Abb. 3). Der Streckfaktor wirkt in einer derart bestimmenden Weise auf den Verlauf der Gefäße (zweifelsohne auch auf die Lokalisation der anderen Strukturen des Organs), daß an den an die Gelenkbänder anliegenden Stellen der Kapsel die Gefäße einen längs-parallelen Verlauf nehmen, sogar in jenen Fällen, wo die nebeneinander liegenden Teile eine scharf abweichende Architektonik der Blutbahn aufweisen.

In jenen Teilen des Gelenks hingegen, in denen die Kapsel während der Bewegung eine perpendikuläre Streckung aus zwei Richtungen erfährt, verlaufen die intraorganischen Blutgefäße bis zu den Kapillarnetzen quadra-



Abb. 4. Blutgefäße des hinteren-äußeren Kapselabschnittes des Kubitalgelenkes beim Kalb. Aufgehelltes Präparat. Tuschinjektion. 40fache Vergrößerung

Abb. 5. Blutgefäße des Metakarpophalangealgelenkes beim Kalb. a = Vorderteil der Kapsel; b = medialer Teil der Kapsel; Aufgehelltes Präparat, Tuschinjektion. 40- und 60fache Vergrößerung

Abb. 6. Blutgefäße in der fibrösen Schicht des Kapselvorderteiles des Metakarpalgelenkes beim Kalb. Aufgehelltes Präparat, Tuschinjektion. 40fache Vergößerung

tisch, wobei die Größe der Quadrate vom Lumen der sie bildenden Gefäße abhängt (Abb. 4).

In einer Reihe von Gelenken erfahren die Gewebe in den einzelnen Teilen der Kapsel eine wechselnde, aus verschiedenen Richtungen wirkende Strekkung. Gewöhnlich bildet das Gefäßsystem an solchen Stellen der Kapsel



Abb. 7. Blutgefäße in der Synovialvorwölbung der Kapsel: a = des Schultergelenkes, b = des Schultergelenkes beim Kalb. Aufgehelltes Präparat. Tuschinjektion. 40fache Vergrößerung Abb. 8. Blutgefäße der Synovialfalte des Metakarpophalangealgelenkes vom Kalb. Aufgehelltes Präparat. Tuschinjektion. 45fache Vergrößerung

Abb. 9. Blutbahn im Vorderabschnitt der Kapsel des Metakarpalgelenkes beim Kalb. 1 = verschiedene Entwicklungsphasen der Synovialzotten. Aufgehelltes Präparat. Tuschinjektion. 40fache Vergrößerung

sowie auch in der Synovialhaut eine Art mehrschichtiges polygonales Netz, dessen Maschen mit dem Gefäßlumen ebenfalls in direktem Zusammenhang stehen (Abb. 5). In solchen Abschnitten ist der Gefäßverlauf stets dort deutlicher, wo die Hauptkraft wirkt, und auch die Dichte der fibrösen Elemente der Kapsel ist in dieser Richtung ausgeprägter.

An den Stellen, wo die Kapsel eine von außen wirkende Druckkraft seitens der anliegenden Sehnen und Muskeln erfährt, z. B. an der Vorderfläche

des Karpalgelenkes von Huftieren, verlaufen in ihrer Wand die Gefäße in Form von breiten Strängen, die vier oder fünf parallel verlaufende Stämme enthalten (Abb. 6). Unter solchen Verhältnissen bestehen die parallel verlaufenden Venenstränge aus besonders vielen Stämmen. Eine Reihe von kleinen Venen bedeutet ein größeres summares Lumen für den Abfluß, und zugleich sind auch die einzelnen Venen der Wirkung des äußeren mechanischen Faktors weniger als ein einziger großer Venenstamm ausgesetzt.

In den Synovialvorwölbungen deren Umfang und Spannung infolge der Verlagerung der Synovialflüssigkeit durch die Gelenkbewegungen periodisch wechselt, wird das Adergeflecht von gewundenen (wellenförmigen, spiralförmigen) Gefäßen gebildet, die gleichsam über eine Reserve für die Längsstreckung verfügen (Abb. 7). Das Vaskulargeflecht hat im Gebiet der Synovialvorwölbungen die Form eines mehrschichtigen polygonalen Netzes. In den Synovialfalten-zotten und Fettkörpern ist das Blutgefäßsystem durch ein dichteres durchbrochenes Geflecht aus Gefäßen überwiegend gleichen Kalibers vertreten (Abb. 8). Unter diesen Gefäßen sind einzelne Hauptstämme deutlich differenziert, und sie verlaufen von der Wurzel der Zotte oder der Falte zu ihrem freien Rand.

Was sind aber die Synovialzotten und -Falten, ferner die Fettkörper der Gelenke; wie ist ihre Natur und was ist ihre Funktion?

Im Obigen wurde bereits erwähnt, daß im Laufe der Embryogenese die Gewebsdifferenzierung in der Gelenkkapselanlage zur Herausbildung eines vaskulär-zellulären Komplexes führt, der die Innenfläche der Kapsel auskleidet und ihre Synovialmembran bildet. Die Funktion des vaskulär-zellulären Komplexes der Synovialhaut, die Absonderung der Synovialflüssigkeit und die Sicherung ihres ununterbrochenen Stoffwechsels ermöglichen die Herausbildung des Gelenkraumes und des Gelenkes. Das Einsetzen der Funktion der Synovialmembran geht dem Beginn der aktiven Beweglichkeit in der Extremitätenanlage etwas voraus. In diesem Zeitpunkt bildet die Synovialhaut einen gleichmäßigen Belag auf der Innenfläche des entstehenden Gelenkraumes und hat keine Ausstülpungen in Form von Zotten oder Falten.

Das Wachstum und die Entwicklung der Skelettmuskulatur der Extremitäten gehen bei notwendiger Teilnahme der Bewegungen mit einer bestimmten dynamischen Belastung der Gelenke einher und der ansteigenden dynamischen Belastung entsprechend ändert sich natürlich auch die Intensität des intraartikulären Stoffwechsels. Die Biodynamik ist in einem beliebigen Körperteil das Resultat der Umwandlung der Stoffwechselenergie in mechanische Energie. Die Steigerung der Intensität des intraartikulären Stoffwechsels ist jedoch nur bei gleichzeitiger Entwicklung und Ausbreitung der ihn sichernden Strukturgebiete und vor allem der Ausbreitung der wichtigsten funktionellen Struktur der Synovialmembran ihres spezifischen Kapillarnetzes möglich. Dies wird erreicht teils durch die Erhöbung der Gefäßdichte

Acta morph. tomus XIII.

198

in der Synovialhaut an den Stellen der maximalen Beweglichkeit, teils aber durch das Eindringen der Blutbahn in den Gelenkraum, zusammen mit der Synovialmembran, in Form von Zotten und Falten von unterschiedlicher Gestalt. Mit anderen Worten: in diesem Fall tritt die bekannte Erscheinung der quantitativen Adaptation auf, die Vermehrung der Strukturen als Antwort auf die erhöhte Funktion. HAGEN-THORN und KALLISTOW brachten das Auftreten der ersten Synovialzotten gerade mit dem Einsetzen der Gelenkbeweglichkeit in Zusammenhang.

Im weiteren erfolgt, dem dynamischen Belastungsanstieg proportional, die Ausbreitung der aktiven Oberfläche des Gelenks durch das Erscheinen von neuen und die Verästelung der bereits vorhandenen Zotten und Falten. Im Zeitpunkt der Geburt läßt sich deshalb in den sehr beweglichen Gelenken der Extremitäten von Säugern bereits eine gewisse Anzahl von unterschiedlich entwickelten Zotten beobachten. Besonders große Veränderungen des Reliefs der Synovialmembran von Gelenken erfolgen im Laufe der postnatalen Ontogenese, wobei jede mehr oder weniger anhaltende Aktivitätssteigerung der Gelenkfuntion zu einer erheblichen Vermehrung der Synovialzotten führt, und umgekehrt, Inaktivitätszustand oder direkte Immobilisation führen eine massenhafte Involution der bereits vorhandenen Zotten, bis zu ihrem vollkommenen Verschwinden herbei.

Unter allen Gelenkteilen und Organen ist die Synovialhaut am reichsten mit Blutgefäßen versehen. Dabei wird die Synovialmembran von einer geringen Gewebsmasse gebildet, und für ihre Ernährung wäre eine so reiche Vaskularisation nicht notwendig. Die Funktion der Blutbahn der Synovialmembran beschränkt sich aber nicht nur auf diese Aufgabe. Indem sie eine ausgedehnte aktive Oberfläche bildet, steht diese Blutbahn nicht so sehr im Dienste der Ernährung der Synovialhaut, sie sichert vielmehr den Stoffwechsel des ganzen Gelenks.

In den reaktiven Erscheinungen seitens der Synovialmembran kommt die führende Rolle jeweils ihrer Blutbahn zu. Die Synovialmembran bildet in dieser Beziehung übrigens keine Ausnahme. Die Funktionssteigerung oder -verminderung eines beliebigen Organs wird jeweils von der fast simultanen, dem Zustand der Stoffwechselprozesse entsprechenden Veränderung seiner Blutkreislaufintensität begleitet. Anscheinend erfolgen in der Blutbahn der Synovialhaut, als Antwort auf die kurzfristige Veränderung der dynamischen Belastung des Gelenks, nicht selten solche gleichzeitige Veränderungen der Blutkreislaufintensität. Diese gehen jedoch nicht über die Grenzen der üblichen physiologischen Kompensation hinaus und treten morphologisch nicht in Erscheinung. Vielleicht können wir eben deshalb das Erscheinen neuer primärer oder sekundärer Zotten, oder ihre Involution, nur dann erwarten, wenn ein bestimmter Gelenkzustand während einer mehr oder weniger langen Zeit bestehen bleibt.

P. M. MAZSUGA

Unsere Beobachtungen zeigten, daß dem Auftreten der Synovialmembran die Proliferation des Gefäßknäuels oder des schlingenartigen Gebildes auf irgendeinem Abschnitt des Adergeflechts der Synovialmembran vorangeht. An den aufgehellten Totalpräparaten der Gelenkkapseln von Neugeborenen sieht man an den Stellen, wo das vaskuläre Geflecht am stärksten entwickelt ist, und wo gewöhnlich die Zotten erscheinen, unter der Synovialhaut zahlreiche Kapillarknäuelchen verschiedener Größe, mit ihren Spitzen zur Synovialoberfläche gerichtet (Abb. 9). Einige dieser Knäuelchen sind unentwickelt, andere sind bereits mehr oder minder herausgebildet, doch heben sie sich aus der Synovialoberfläche noch nicht im geringsten hervor, wieder andere bilden bereits kleinere Vorwölbungen in den Gelenkraum in Form von kaum merkbaren Knötchen, und schließlich bilden sich einige typische papillenförmige Zotten. Dieses Bild läßt sich an den Präparaten mit Hilfe eines stereoskopischen Mikroskops klar und deutlich beobachten. In den bereits bestehenden Zotten entwickeln sich ähnliche Gefäßschlingen und -Knäuelchen sowie auch Fortsätze des Kapillarsystems. Diese Schlingen bzw. Knäuelchen sind die Vorläufer der zukünftigen Zotten zweiten und dritten Ranges. Die Zellproliferation der Synovialhaut (KALLISTOWS »Zellfleck«) erscheint erst nach einer bestimmten Zeit, wenn das wachsende Kapillarknäuelchen die Deckschicht der Synovialmembran erreicht und deren Spannung hervorruft. Die Zellproliferation ist vermutlich die Reaktion der Synovialhaut auf den Reiz der durch die Wucherung des Kapillarbettes hervorgerufen wird.

Das Eindringen der Kapillargefäße in den Gelenkraum geht mit der Differenzierung der zuführenden und abführenden Gefäßbahnen einher. Deshalb besteht das Gefäßsystem einer jeden Zotte aus dem Kapillarsystem, der Arterie und der Vene (nicht selten aus zwei Venen) (Abb. 10). In den Synovialfalten, die sich ähnlich entwickeln, ist das Adergeflecht reicher und wird von zahlreichen zuführenden und abführenden Gefäßen versorgt (Abb. 11). Die Involution der Zotten und Falten beginnt nach KALLISTOW und STSCHE-GOLKOW mit der Verengerung des Gefäßlumens, mit der allmählichen Verödung und dem Verschwinden der Gefäße. Mit den Gefäßen verschwindet auch die Zotte selbst.

Die Synovialzotten und -Falten sind infolgedessen nichts anderes als die Fortsätze der Innenzone des Adergeflechts der Kapsel, die in den Gelenkraum eindringen. Sie treten als Antwort auf einen anhaltenden adäquaten Reiz auf. Die Behauptung einiger Verfasser, es gäbe gefäßlose Zotten, beruht wahrscheinlich auf der ungenügenden Füllung des Gefäßsystems der Kapsel mit Farbsuspension. Die Blutbahn der Zotten und Falten besteht stets aus einem geschlossenen Gefäßsystem, sie zerfällt nicht in Pinselchen und endet nicht blind, wie das KOSIZYN [17] behauptet.

Die Reaktion des Gefäßsystems der Synovialmembran auf die erhöhte dynamische Belastung des Gelenks beginnt nicht gleich mit der Erzeugung



Abb. 10. Blutgefäße in den Synovialzotten des Metakarpalgelenkes beim Kalb. Aufgehelltes Präparat. Tuschinjektion. 45fache Vergrößerung

Abb. 11. Blutgefäße in der Synovialfalte des Schultergelenkes beim Kalb. Aufgehelltes Präparat. Tuschinjektion. 45fache Vergrößerung

Abb. 12. Blutgefäße in der peripherischen Synovialfalte des Humerus beim Kalb. Aufgehelltes Präparat. Tuschinjektion. 45fache Vergrößerung

von Zotten und Falten. Die ersten Kreislaufveränderungen werden durch die üblichen physiologischen Mechanismen erreicht. Falls die ursächliche Einwirkung fortdauert, setzt später der morphologische Umbau des Adergeflechts

selbst ein (Erhöhung seiner Dichte, Zonenerweiterung usw.), was aber auf der Oberfläche der Synovialhaut nicht wahrnehmbar ist. Die Synovialfalten und – Zotten sind die stärkeren und auch äußerlich wahrnehmbaren Erscheinungsformen der morphologischen Reaktion auf die dynamische Belastung, und deshalb erscheinen sie auch auf der Synovialmembran an jenen Stellen, wo daß Gefäßnetz stark konzentriert und wo eine ausgeprägte Strömung der Synovialflüssigkeit vorhanden ist.

In den Gelenken mit geräumigen Höhlen befinden sich die sogennanten Abkömmlinge der Synovialmembran an jenen Stellen, wo die Synovialhäute sich gegenseitig berühren, oder dort, wo die Synovialhaut unmittelbar an die sich verschiebende Gelenkoberfläche anliegt. In den komplexen und straffen Gelenken mit kleinen Synovialbeuteln sind die bevorzugten Lokalisationsstellen der Falten und Zotten die intraartikulären Kanäle, in denen die Synovialflüssigkeit bei der Bewegung nach beiden Seiten fließt.

Die Synovialfalten sind Gebilde ähnlichen Typs. Sie entstehen an den sich nicht reibenden (Rand-) Flächen der Gelenkknorpel und enthalten eine große Anzahl von schlingenförmigen, knäuelartigen Gefäßen und stellen gleichsam eine ununterbrochene Reihe von Synovialzotten dar (Abb. 12).

In der Literatur wurde mehrfach behauptet, daß die Gefäße der peripheren Synovialfalten in den Gelenkknorpel eindringen. Es wurde sogar versucht, ihren Ernährungsmechanismus mit dem direkten Zusammenhang des Knorpelgewebes und dieser Gefäße zu erklären [6, 17, 4]. In Wirklichkeit erstrecken sich die Gefäße der peripheren Synovialfalten nur auf den freien Teil der Gelenkknorpeloberfläche und dringen niemals in die Tiefe ein. Ja, sie können gar nicht in die Knorpel eindringen, denn diese Gefäße haben kein perivaskuläres Netz, deren aktive Funktion das Eindringen in die Tiefe der hyalinen Knorpel ermöglichen würde.

Das Vorhandensein des Hyalinknorpels unter der gefäßhaltigen Synovialfalte kann als eine charakteristische Eigenschaft der Synovialmembran angesehen werden, sie beschränkt nämlich die Verknöcherung auf die Zone der Knorpelanlagen, die sich unmittelbar neben der Synovialmembran befinden. Deshalb ossifiziert niemals die Randzone der Epiphysenfuge, die infolge ihrer Entwicklung mit der peripheren Synovialfalte in Kontakt steht, obwohl diese Zone niemals eine Gelenkoberfläche im wahren Sinne des Wortes bildet. Die endgültige Klärung der biologischen Wechselbeziehungen zwischen den Knorpel- und den Synovialgeweben hat große praktische Bedeutung.

In den Gelenken mit großer Bewegungsamplitude (Kniegelenk usw.) erfahren die sich am stärksten verschiebenden Teile der Kapsel während den extremen Phasen der Beugung und Streckung eine gewisse Kompression durch die sich nähernden Knochenoberflächen. Die sich in den beweglichen Zonen solcher Gelenke entwickelnden Synovialfalten enthalten gewöhnlich reichlich Fettablagerungen, die sich um die dichten Adergeflechte konzentrieren. Als

Ergebnis einer solchen Kombination von Gefäßen und Fettgewebe entsteht ein elastisches Gebilde, das außer seiner Hauptfunktion zugleich die Rolle eines eigenartigen Puffer-Amortisators spielt.

Bei den vaskulär-synovialen Gebilden ist es durchaus möglich, daß sich zu ihrer Hauptfunktion eine solche sekundäre Funktion gesellt, denn der mechanische Faktor stellt in jedem Falle eine der Hauptursachen ihrer Genese dar.

Die vorherbesprochene Rolle der Blutgefäße im intraartikulären Stoffwechsel, in der Funktion der Synovialmembran und in der Genese ihrer Fortsätze (der Zotten und der Falten) läßt sich durch folgende Tatsachen und Beobachtungen bestätigen:

a) Die Differenzierung der Synovialmembran im Laufe der Embryogenese, das erste Erscheinen der Synovialflüssigkeit und zugleich der Gelenkspaltenanlagen erfolgen erst beim Einsetzen der Proliferation des kapillaren Blutgefäßsystems in der Nähe der Innenschicht der Kapselanlagezellen.

b) Mit dem Erscheinen der Gelenkbeweglichkeit erhöht sich die Dichte des Adergeflechts in der Synovialmembran und es entstehen die ersten in die Gelenkhöhle eindringenden Fortsätze des Adergeflechts — die Synovialzotten.

c) Die Gewebsmasse der Synovialhaut ist im Vergleich zu der Gewebsmasse der übrigen Teile der Gelenkkapsel gering, wobei die Blutbahn der Synovialmembran im Hinblick auf die Konzentration der Gefäße auf die Oberflächeneinheit des Organs den Hauptteil des Gefäßsystems der Kapsel ausmacht. Dieses Verhältnis der Gewebe- und Gefäßstrukturen läßt sich mit der Ernährung der Synovialmembran allein nicht erklären.

d) Die Blutgefäße sind auf dem Gebiet der Synovialmembran ungleichmäßig verteilt. An den Stellen, wo sich die Synovialflüssigkeit anhäuft und verlagert, ferner in jenen Abschnitten der Synovialhaut, die den beweglichen Gelenkoberflächen anliegen, erreicht das Adergeflecht der Synovialhaut eine maximale Dichte. In anderen Gelenkzonen ist der Gefäßreichtum der Synovialhaut weit geringer.

Diese Ungleichmäßigkeit der Vaskularisation ist unverständlich, wenn wir die Blutgefäße nur als die Nährquelle der Synovialmembran betrachten.

e) Der Gefäßreichtum der Synovialhaut ist im Laufe der Ontogenese bedeutenden Schwankungen unterworfen. Bei der Zunahme der dynamischen Belastung des Gelenks erhöht sich die Intensität der Vaskularisation, und sie verhindert sich bei der Immobilisation des Gelenks. Die Schwankungen des Gefäßreichtums treten vor allem an jenen Stellen in Erscheinung, wo sich die Synovialflüssigkeit verlagert und die Synovialmembran verschiebt.

f) In der Differenzierung der Falten und Zotten, die im Gelenk als Antwort auf mechanische (KALLISTOW) und dynamische (KALLISTOW, STSCHE-GOLKOW) Reize eintritt, fällt den Blutgefäßen der Synovialmembran eine führende Rolle zu. g) Die Synovialfalten und -Zotten sind Fortsätze der Innenzone des Adergeflechts der Gelenkkapsel, die in die Gelenkhöhle eindringen und die den Stoffwechsel über eine große Oberfläche sichern.

h) Die Synovialfalten und -Zotten sind keine konstanten und notwendigen Gebilde des Gelenks. Ihre Zahl, Form und Maße variieren innerhalb weiter Grenzen in jedem Gelenk, in Abhängigkeit von der physischen Aktivität des Individuums. Diese Gesetzmäßigkeit läßt sich sowohl im Laufe der Ontogenese, als auch an der vergleichenden anatomischen Serie von Wirbeltierpräparaten feststellen. Bei wenig beweglichen Tieren mit unbeständiger Aktivität (Amphibien, Schildkröten) lassen sich in den Extremitätengelenken keine Synovialzotten nachweisen. In den Gelenken von wenigbeweglichen Säugern sind sie schwach entwickelt und die Zahl der Zotten variiert (nach KALLISTOW und STSCHEGOLKOW) auch in den Gelenken der Vertreter einer und derselben Art, in Abhängigkeit von deren physischen Aktivität, sehr stark.

i) Die Synovialhöhle des Gelenks wird (nach PAWLOWA) von der Blutbahn nur durch die Zellen und durch die Zwischensubstanz der Deckschicht und durch das Endothel der Blutkapillaren getrennt. In den gefäßreichen Zonen finden sich die Blutkapillaren in unmittelbarer Nähe der Synovialhöhle und dringen sogar in den Bereich der Deckschicht der Synovialmembran ein.

j) In Tierexperimenten läßt sich nach PAWLOWA an jenen Stellen, wo die Blutgefäße der Synovialhaut stark konzentriert sind, der schnelle und intensive Austritt des Farbstoffs beobachten.

Die Blutbahn zeigt mit dem zu versorgenden Organ einen engen morphologischen, funktionellen und genetischen Zusammenhang. Deshalb hat der Zustand des Organs, sein Bau und seine Funktion stets einen bestimmenden Einfluß auf die Strukturen seines Blutgefäßsystems, auf Grund deren sich wiederum die funktionellen Verhältnisse des Organs beurteilen lassen.

Die Morphologie der Blutbahn wird jeweils durch die Funktion des zu ernährenden Organs bestimmt, am deutlichsten ausgeprägt ist jedoch diese Abhängigkeit in jenen Organen, die über eine weite Aktivitätsamplitude verfügen. Solche Organe sind die Gelenkkapsel und ihre Synovialmembran.

LITERATUR

1. Барон, М. А.: (1949) Реактивные структуры внутренних оболочек. Ленинград. — 2. DAVIES, D.: (1945—1946) Anatomy and physiology of diarthrodial joints. Ann. rheum. Dis., 5, 29—35.— 3. Филатова, Н. Д.: (1958) Вены тазобедренного сустава человека. Архив анат., гистол. и эмбриол., 35, 5, 102—105.— 4. Фрумина, А. Е.: (1949) Открытое вправление врожденного вывиха у детей и подростков. Дисс. докт. мед. наук, Киев.— 5. Гаген-Торн, В.: (1883) Развитие и строение синовиальных оболочек. Дисс. СПб.— 6. Гитис, М. К.: (1949) Артериальные системы коленного сустава у человека в связи с патогенезом хирургических заболеваний сустава. Хирургия, 2, 46—57.— 7. Глядковский, А. И.: (1951) К анатомии артерий коленного сустава. Автореф. дисс. канд. мед. наук. Ленинград.— 8. Голев, В. П.: (1951) Анатомия и топография кровеносных сосудов в капсулах межпозвоночных суставов человека. Труды Ижевск. мед. ин-та, 13, 206—212.— 9. Наммав, J.: (1894) Über den feineren Bau der Gelenke. Erste Hälfte. Abth. 1: Die Gelenkmembran. Arch. mikr. Anat.

43. - 10. Иконникова, Н.А.: (1951) Характер артериальной сети в слоях капсулы плечевого и локтевого суставов человека. Труды Ижевск. мед. ин-та, 13, 221-225. - 11. Имерлишвили, И. А.: (1960) Особенности строения и развития синовиальной оболочки суставной капсулы и сухожильных влагалищ. Тезисы докл. 1-й научн. конфер. морфологов Средней Азии и Казахстана, 143-144. - 12. Имерлишвили, И. А.: (1961) Развитие и строение синовиальной оболочки. Материалы пятой научн. конф. по вопросам возр. морфол., физиол. и биохимии, Москва, 47. - 13. Каллистов, И. П.: (1946) Волокнистая конструкция и реактивные структуры синовиальной оболочки коленного сустава. Докт. дисс., Москва. — 14. Каллистов, И. П.: (1958) Васкуляризация синовиальной оболочки и ее ворсин. Труды VI Всесоюзн. съезда анат., гистол. и эмбриол., Харьков. - 15. Кеу, J.: (1925) The Reformation of the Synovialmembran in the Knees of Rabbits After Synowectomy. J. Bone J. Surg., 7, 793. 16. KLING, D.: (1936) The Synovial Membrane and the Synovial Fluid. Los Angeles. - 17. Kocuыцн. И. И.: (1949) О кровоснабжении коленного сустава. Хирургия 2, 43-46. - 18. Коз, Ј.: (1957) Cevni zasobeni pouzdra hlezenného kloubu. Čs. Morfol., 5, 80-93.-19. Kölliker, A.: (1867) Handbuch der Gewebelehre des Menschen. 5. Aufl. - 20. LANG, J.: (1954) Beitrag zur Gefäßversorgung der Gelenkinnenhaut. Jb. Morph. mikr. Anat. Abt. II, 60, 503-521. 21. LANG, J.: (1956) Bau und Funktion der Gefäße des Stratum synoviale. Anat. Anz., 103, 13-19. 22. LANG, J.: (1958) Die Gelenkinnenhaut, ihre Aufbau- und Abbauvorgänge. Jb. Morph. mikr. Anat. Abt. I. 98, 387-402. -23. LANG, J .: (1958) Wachstum und Untergang der Synovialiskapillaren. Verhandl. Anat. Ges.; Ergänzungsheft zum 104. (1957) des Anat. Anz. Jena, 323-327. 24. LANG, J .: (1959) Anatomische funktionell wichtige Baumerkmale der Gelenkinnenhaut. Orthop., 91, 323-326. -25. LANG, J.: (1959) Wie verändert sich die Gelenkinnenhaut im Laufe des Lebens? Die Biomorphose der Gelenkinnenhaut. Zbl. med. Wiss. 24.-26. Лебедева, Н. М.: (1951) Васкуляризация коленного сустава лошади в норме и патологии. Сб. работ Ленингр. вст. ин-та, вып. 12, 90-98. - 27. Lubosch, W.: (1910) Bau und Entstehung der Wirbeltiergelenke. Jena. — 28. Мажуга, П. М.: (1954) Внутриорганные кровеносные сосуды коленного сустава. Труды Ин-та зоологии АН УССР, П, Киев, 104-126. 29. Мажуга, П М.: (1961) Динамика формирования сосудистого русла суставной капсулы и производных синовиальной оболочки. Тезисы докл. научн. кон рер. морфологов Вост. Сибири, Иркутск. — 30. Мажуга, П. М.: (1961) Пластичность кровеносного русла синовиальной оболочки в связи с различной функцией суставов. ДАН СССР, 137, 5, 1237-1240.-31. Никаноров, В. А.: (1950) Кровоснабжение капсулы сустава 1-й фаланги у лошади при хроническом гнойном артрите. Сб. работ Ленингр. вет. ин-та, 11, Москва, 87-100. 32. Павлова, В. Н.: (1952) Морфологические особенности кровеносного русла синовиальной оболочки коленного сустава в связи с трансудацией веществ в суставную полость. ДАН СССР, 84, 5, 1057-1060. 33. Павлова, В. Н.: (1954) Некоторые закономерности всасывания крови из полости сустава. Вестн. рентгенол. и радиол. — 34. Раув, Е.: (1918) Über Wiederbildung von Gelenken, ihre Erscheinungsformen und Ursachen, funktionelle Anpassung-Regeneration. Dtsch. med. Wsch., 817 -821.-35. Рябоконь, С. С.: (1956) Источники кровоснабжения синовиальной оболочки коленного сустава. В кн.: Сборник рефератов научн. работ, вып. І, Донецк, 29—31. — 36. Шамаев, М. И.: (1956) Кровеносные сосуды синовиальной оболочки коленного сустава человека. Тезисы докл. П укр. конфер. морфологов, Харьков, 301-302. - 37. Шамаев, М. И.: (1958) Кровеносные сосуды синовиальной оболочки коленного сустава человека. Новый хирург. архив, 73-77. 38. Щегольков, А. Н.: (1959) Об особенностях ворсин синовиальной оболочки коленного сустава у некоторых млекопитающих. Труды XI конфер. Киевск. ин-та физкультуры, Киев. - 39. Щегольков, А. Н.: (1962) Влияние функции на состояние кровеносного русла синовиальной оболочки и ее производных (на примере коленного сустава). Канд. дисс., Киев. — 40. Щелкунов, С. И.: (1940) Строение синовиальной оболочки. Труды Военно-медиц. акад. им. Кирова, 24, 180-181. - 41. Серебряков, А. Н.: (1952) О венозной системе синовиальной оболочки локтевого сустава. Сб. научн. работ Витебск. мед. ин-та, вып. 4, Минск, 153—159.— 42. TILLMANS, H.: (1874) Beiträge zur Histologie der Gelenke. Arch. mikr. Anat., 10. – 43. TILLMANS, H.: (1875) Zur Histologie der Synovialmembranen. Langenbecks Arch. klin. Chir. 2. - 44. TILLMANS, H.: (1876) Untersuchungen über die Unzuverlässigkeit der Versilberungsmethode für die Histologie der Gelenke. Virchows Arch. path. Anat., 67.

MORPHOGENESIS OF THE JOINT CAPSULE AND ITS VASCULAR APPARATUS P. M. MAZSUGA

The fibrous and synovial layers of the joint capsule become differentiated synchronously with the formation of the articular cavity, a phenomenon apparently connected with the biological properties of the synovial membrane. The vascular bed of the capsule arises from the capillaries which invade it from the periarticular vascular zone. The architectural construction of the capsular tissues and vessels is determined in the course of prenatal development by the growth of the skeletal structure of the extremities and the nature of the mobility in the developing joint. Function remains a decisive factor in the morphogenesis of the capsule and its vessels also during postnatal development.

The vascular structure of the joint capsule is in any case closely connected with the mechanical properties of the articulation.

The synovial membrane and its abundant vascular system form the surface for intraarticular metabolism. The synovial folds and villi represent processes emerging from the inner zone of the capsular plexus of vessels which, covered with synovial membrane, invade the joint cavity and, by doing so, enlarge the surface of intra-articular metabolism. They are formed in response to adequate chronic stimulus. Synovial folds and villi are neither permanent nor indispensable structures. Depending on the physical activities of the individual, their number, form and dimensions vary in each joint within wide limits, a phenomenon that can be observed in the course of ontogenesis as also by means of a comparative series of vertebrate preparations. Synovial villi and folds appear chiefly at points where synovial fluid is accumulated, further in those portions of the synovial membrane which adhere to the mobile parts of the joint, *i.e.*, at its vascularly richest points where intra-articular metabolism is most intensive.

The number of vessels fluctuates in the synovial membrane considerably during ontogenesis: it grows if the joint is dynamically active, and diminishes if it remains immobile. Such fluctuations are especially pronounced at points where synovial fluid is accumulated and also at points where the synovial membrane is exposed to friction.

МОРФОГЕНЕЗ КАПСУЛЫ СУСТАВА И ЕЕ КРОВЕНОСНОГО РУСЛА

П. М. МАЖУГА

Дифференциация фиброзной и синовиальной оболочек в закладке капсулы сустава происходит одновременно с формированием суставной полости, что, повидимому, связано с биологическими свойствами синовиальных покровов. Кровеносное русло закладки капсулы образуется за счет потоков капиллярных сосудов, врастающих в нее от периартикулярной васкулярной зоны. В пренатальном онтогенезе гисто- и ангиоархитектоника капсулы сустава определяется направлением роста закладок скелета конечности и характером подвижности в формирующемся суставе. Функциональный фактор является ведущим в морфогенезе капсулы сустава и ее кровеносного русла также в постнатальный период развития.

Структура кровеносного русла капсулы сустава в каждом случае показывает четкую взаимосвязь с особенностями биомеханики сустава.

Синовиальный покров совместно с обильным кровеносным его руслом образуют активную поверхность внутрисуставного обмена. Синовиальные ворсины и складки представляют собой покрытые синовиальной оболочкой выросты в полость сустава внутренней зоны кровеносного сплетения капсулы, увеличивающие поверхность внутрисуставного обмена и появляющиеся в ответ на длительный адекватный раздражитель. Синовиальные складки и ворсины не являются постоянными и обязательными образованиями сустава. Их количество, форма и размеры в каждом суставе колеблются в больших пределах в зависимости от физической активности индивида. Закономерность эта проявляется как в онтогенезе, так и в сравнительно-анатомическом ряду позвоночных. Ворсины и складки появляются преимущественно в местах скопления и перемещения синовии, в участках синовиальной оболочки, прилежащих к подвижным суставным поверхностям, то есть в местах, где сосудистое сплетение синовиального покрова достигает максимальной концентрации и где внутрисуставной обмен происходит наиболее интенсивно.

Интенсивность васкуляризации синовиальной оболочки в онтогенезе подвержена заметным колебаниям. Она возрастает при усилении динамической нагрузки на сустав и, наоборот, уменьшается в ответ на состояние частичной или полной иммобилизации сустава. При этом сдвиги в интенсивности васкуляризации проявляются главным образом в местах переливания синовии и трения синовиального покрова.

Dr. P. M. MAZSUGA, Kiev-30, Wladimirskaja 55, Abt. f. Zytologie und Histogenesis d. Zool. Inst. d. Wissenschaftlichen Akad. USSR

Department of Anatomy, Histology and Embryology (Director: Prof. Dr. I. KROMPECHER), University Medical School, Debrecen

HISTOCHEMICAL IDENTIFICATION OF CARBOHYDRATES BY MEANS OF METAL COLLOIDS

L. MÓDIS, I. SÜVEGES and I. FÖLDES

(Received July 29, 1963)

(1) Different metal colloids have been tested in respect of their suitability for the histochemical differentiation of mucopolysaccharides in human and animal tissues.

(2) Colloidal silver, copper and molybdenum solutions, further a modified gold sol have proved suitable for the purpose.

(3) Having a high stabilization pH, silver, copper and gold were found suitable for the identification of weakly acid mucopolysaccharides, while molybdenum, with its low operative pH, for the demonstration of intensely acid mucopolysaccharides. The mechanism by which bone stains with molybdenum has not been elucidated.

(4) The pH-zones of the mucopolysaccharides were separated according to the pH of the colloids, although the possibility of certain chemical specificities cannot be excluded.

(5) Each applied combination of two colloids revealed the presence of those carbohydrate components which had an affinity for either of the combined solutions.

(6) The black colour of the iron-colloid reaction may be regarded as a useful partial result. The negative result of the application of negatively charged iron colloid illuminates the mechanism of the iron-colloid reaction.

(7) Metal colloids have proved to be a useful aid in the histochemical determination of the pH of mucopolysaccharides.

(8) It has been found that in their histochemical application not only the chemical but also the physico-chemical properties of the colloids are utilizable.

(9) Further experiments with new metal colloids and further combinations of the existing ones may open new possibilities for the histochemical determination of additional tissue components.

Introduction

Colloidal iron and colloidal gold solution are currently employed for the histochemical demonstration of acid mucopolysaccharides. The mode of action of these staining reactions is somewhat unclear and their specificity has given rise to objections. WOLMAN [17] suggests physico-chemical adsorption as the explanation of the mechanism of these staining reactions which depend also on other factors, *e.g.* the properties of the components making up the reactive tissues.

Since the colloidal particles display electro-affinity and are under the effect of the hydrogen ion concentration, the mechanism through which metal colloids act can safely be assumed to be of a physico-chemical nature, from which it follows that the binding of the colloidal particles depends on the pH of the tissues, provided the ion concentration is adequate. As it is known, the

combination of colloidal iron and colloidal gold allows to separate strongly acidic from weakly acidic mucopolysaccharides in tissues (Bi-Col method). This use of combined metal colloids is somewhat similar to HAYNES' pH determination [7].

Since it is not sufficient to separate markedly acid from markedly alkaline carbohydrates, the present experiments were designed with a view to making finer distinctions by means of some further metal colloids. The starting point was GRAUMANN's statement [5] made in connection with the specificity of the known modifications of the iron-colloid reaction, viz. that the reason why different iron colloids give reactions of different specificity is that the particles contained in the colloidal solutions differ in sizes and in charges. Any change in the quality of the particles naturally causes a change in the charge and size of the particles and of the whole histochemical reactions. Attempts to obtain new reactions by means of changing the size and charge of particles in currently used metal colloids have been reported in the literature [2, 6, 17, 18]. There is, on the other hand, but a single experiment, the so-called Bi-Col reaction, in which new reactions were obtained by changing the quality of the particles, *i.e.* by applying hitherto unused metal colloids. It seemed therefore theoretically possible to determine carbohydrates (pathologically important mucopolysaccharides in particular) by combining several new metal colloids within the same sections. It was, of course, problematic whether the new colloids would show affinity to carbohydrates, whether the resulting reactions would be different in specificity and if so, whether two (or possibly more) new colloids could be used in combination, and, finally, whether and how far it would be possible to identify the reactions with the current methods of carbohydrate assay. However, two factors were to be considered, viz. (i) the pH at which the metal particles are bound is not quite the same as the pH of the structure; (ii) only relative pH values can be determined in fixed material.

Material and method

(1) The first step was to prepare the metal colloids shown in Table I. For their preparation see the pertinent textbooks [2, 4]. Some of the sols were pure metal colloids (gold, silver, copper), some were metal hydroxides (iron, chromium, aluminium), some oxide sols (vanadium, molybdenum, manganese), and some sulphide sols (zink). Colloidal iron was prepared according to HALE [6] and MÜLLER [10] The iron hydroxide of negative charge was prepared with a view to studying the mechanism through which iron colloids react. We modified WOLMAN's method for the preparation and the employment of gold sol. Both the colour and the pH of the solutions were registered. Since most of the new colloidal solutions were alkaline, it was necessary to acidify them since most mucopolysaccharides dissociate best in somewhat acid solutions. N/10 HCl and 0.1 M ascorbic acid were used for adjusting the pH to acid. (This pH will be termed "operative pH" in the following.) The choice of the pH was not always arbitrary because most of the solutions underwent precipitation at a certain acidity, so that the operative pH-value had to be chosen in these cases above the point of precipitation. Certain colloids withstood acidification altogether and had to be discarded. It can be seen from Table I that staining was satisfactory only if the initial pH was in the acid zone. Although in the sections the employed colloids usually give reactions corresponding to their colour, it was sometimes

necessary to use so-called developing solutions (i.e. the reagents of the metals involved) in order to intensify or change the colour reaction. We found hydrogen sulphide especially useful; it changes the blue colour of molybdenum into yellowish brown, further ammonium sulphide which converts the normal Prussian-blue reaction of iron colloid to an intensive black, so that it was possible to combine Hale's method with other blue reactions. The lability of the sulphide precipitates presented the only difficult problem.

Table I

Colloids	Colour	Production pH	Employed pH	Staining capacity	Developer
Silver	light grey	4.8	4.8	+++++	
Copper	ochre yellow	8.0	5.6	+ + + +	
Molybdenum	blue	0.5 - 1	0.5 - 1	++++	H_2S
Chrome yellow	lemon yellow	2.4	2.4		
Chrome hydr.	grass green	10.0			
Mercury	light grey	9.5			
Zinc	white	10.6			
Vanadium	orange	5.8	5.8	++	
Aluminium	white	9.4			
Manganese	white	10.8			
Gold	red	5.2	5.2		
Hale	greyish brown	3.4	1.5		$(NH_4)_2S$
Negative iron	reddish brown	9.0	9.0		

Colour, pH, staining	characteristics a	nd developing	agent of t	he employed	<i>t</i> colloids
----------------------	-------------------	---------------	------------	-------------	-------------------

(2) Tissues of the following organs were used: sublingual gland, umbilical cord and epiglottis of man; knee joint and laryngeal cartilage together with the thyroid gland, of white rats. The carbohydrates contained in these tissues comprise the principal groups of mucopolysaccharides [14]. The tissues were fixed in Carnoy's or Susa's fluid or formalin, and embedded in paraffin; after preparing sections $8-10 \mu$ thick, they were treated with the metal colloids and then subjected to the control staining reactions specified below.

(3) The identifying reactions were the combined method of Ritter and Oleson, alcian blue, thionine at pH 3.2; digestion by means of hyaluronidase and amylase. The data presented in the following are the combined results of the colloidal and the control reactions.

Results

Of the colloids with acid operative pH, chrome-yellow and vanadium sol gave no useful reaction so that there remained only silver, copper and molybdenum in this category.

Silver colloid. The colour of the reaction was black which could be turned into brownish yellow by treatment with potassium bichromate. At pH 4.8, the hyaline chondrocytes (Fig. 1) and the cells of elastic cartilage were reacting; the reaction was less marked in the acini (Fig. 2) in the fibres and the interfibrous substance of connective tissues, further in the umbilical vessels (Fig. 3).



Fig. 1. Tibia of 25-day old rat. Cartilage and ossification centre of proximal epiphysis. Note silver reaction in cells. No reaction in ground substance. Silver-colloid, $\times 400$

Fig. 2. Human epiglottis. Note unstained cartilage and intensively staining acini. Silver-colloid, $\times~400$

Fig. 3. Human umbilical vessel. Note strong reaction in the media. Silver-colloid, \times 400 Fig. 4. Rat thyroid with laryngeal cartilage. The reaction is positive in the chondrocytes, nuclei and muscles. Silver-colloid, \times 400

Fig. 15. Tibia of 25-day old rat. Cartilage of proximal epiphysis. Intensive staining of ground substance. Iron-colloid staining after development with ammonium sulphide. Susa, \times 400

The reaction was aspecific in the nuclei and especially in the muscles. The ground substance of the cartilages and bones, as well as the colloid of the thyroid gland failed to stain (Fig. 4). The chondrocytes were PAS- or Hale-positive, the acini PAS- and Hale-positive; the silver-positive areas of the umbilical cord were PAS-positive. Metachromasia was seen in the glands and the walls of the umbilical vessels, especially in the silver-negative areas.

Copper colloid. The colour of the reaction was ochre. The solution had a pH of 5.6 and gave a positive reaction in the ground substance of the bones,



Fig. 5. Tibia of 25-day old rat. Cartilage of proximal epiphysis. Note strong staining of bony ridge. Copper-colloid, pH 5.6. Susa, \times 400

Fig. 6. Cartilage from human epiglottis. Positive reaction in ground substance, negative in chondrocytes. Copper-colloid, pH 5.6. Susa, × 400
Fig. 7. Cartilage from human epiglottis. Beta metachromasia and orthochromasia in the ground substance. Control of Fig. 6. Thionine stain, Susa, × 400





Fig. 8. Tibia of 25-day old rat. Cartilage of proximal epiphysis. Reaction is weaker in ground substance, stronger in bony ridges. Molybdenum-colloid, pH 0.5, Susa, \times 400 Fig. 9. Spongiosa from tibia of 25 day old rat. Strong reaction in bony ridges. Molybdenum-

colloid, pH 0.5, Susa, \times 400

Fig. 10. Cartilage from human epiglottis. Intensive staining in ground substance. Molybdenum-

colloid, pH 0.5, Susa, × 400
Fig. 11. Human sublingual gland. Strong reaction in acini and efferent duct, weak reaction in interstitial connective tissue. Molybdenum-colloid, pH 0.5, Carnoy's, × 400





Fig. 12. Human sublingual gland. Weak staining of acini and efferent duct. Stained with col-Fig. 12. Human sublingual gland. Weak staining of actin and efferent duct. Stained with con-loidal molybdenum at pH 0.5 after pretreatment with hyaluronidase. Carnoy's, × 400
Fig. 13. Cartilage from human epiglottis. The ground substance stains mainly around the chon-drocytes. Control of Fig. 10. Alcian-blue, Susa, × 400
Fig. 14. Human sublingual gland, Hale- and PAS-positivity in the acini and the efferent ducts. Control of Fig. 11. Ritter-Oleson, Carnoy's, × 400




Fig. 16. Rat thyroid with laryngeal cartilage. Molybdenum-positive ground substance and gold-positive connective tissue. Combined gold-molybdenum staining. Carnoy's, \times 400 Fig. 17. Human sublingual gland. The acini are Hale-positive, the interstitial connective tissue stains with gold. Bi-Col method. Carnoy's \times 400

stains with gold. Bi-Col method. Carnoy's \times 400 Fig. 18. Rat thyroid with laryngeal cartilage. Negative reaction in ground substance. Note atypical yellow reaction in thyroid. The connective tissue gives the true reddish brown reaction. Gold-colloid, pH 5.2. Carnoy's, \times 400



and a less marked one in that of the cartilage (Fig. 5). The reaction in the wall of the umbilical vessels was similar to that obtained with silver. Mucin failed to take the stain. The ground substance of the bones were PAS-positive. Combined ortho and beta metachromasia was observed in the copper-positive areas of the ground substance of the elastic cartilage (Figs. 6, 7). The muscles gave an aspecific reaction.

Molybdenum colloid. The colour of the reaction was ultramarine blue. The range of the operative pH was from 0.5 to 1.0. This proved to be the most useful colloid giving a positive reaction in the ground substance of bones, of hyaline and elastic cartilages; acini; secretion of efferent ducts; certain layers of the wall of umbilical vessels; matrix of connective tissue. The reaction was most pronounced in osseous tissue (Figs. 8, 9, 10). Digestion with hyaluronidase inhibited the positive reaction in the acini and the efferent ducts (Figs. 11, 12). Except the ground substance of the bones, the reactive area was Halepositive, showing beta and gamma metachromasia, and a positive reaction with alcian blue (Fig. 13). Substances containing mucin stained violet with the combined Hale-PAS method of Ritter and Oleson (Fig. 14).

Treatment with SH_2 turned the colour of molybdenum into brownish yellow; it is thus possible to combine the method with procedures giving a blue reaction.

Iron colloid. It is not intended here to deal with the various iron colloids in detail. MÜLLER's modification was used at pH 1.5 only in colloid combinations and for the purposes of control. Since MÜLLER's blue reaction cannot be combined with other blue reactions, *e.g.* with molybdenum blue, we used ammonium sulphide instead of potassium ferrocyanide for developing, so that the areas positive to iron colloid gave a black colour (Fig. 15).

Combinations of colloids. The following combinations were tested.

Gold-molybdenum. This combination gave especially satisfactory results in cartilages, glands and bones. Cartilage and bone stained well with molybdenum and connective tissue with gold (Fig. 16).

Iron-molybdenum. This combination can be used only if the colour of one of the colloids is changed. Since the ground substance of cartilage reacts with both colloids, it will be stained by the colloid applied first. The stained substances are the same as those staining according to Ritter and Oleson.

Iron-gold. This is WOLMAN'S Bi-Col reaction with the new modified gold sol. It gives the same result as the original procedure (Fig. 17).

It should be noted that the various fixatives did not seem to weaken the colloid reactions. We modified WOLMAN's method for the preparation of gold sol by using ascorbic acid at pH 5.2 as a reducing agent instead of formalin.

Gold sol, used alone, gave a weak positivity in the ground substance of bones, a somewhat stronger one in the epiphyseal cartilage near the metaphysis, in the chondrocytes, in the wall of the umbilical vessels and in some nuclei

211

(Fig. 18). The reaction was most pronounced in the fibrous substance of connective tissue. It should be noted that, according to WOLMAN's original procedure, gold is used after the iron-colloid reaction. We found that gold sol applied alone or before the iron yielded likewise reliable results. Digestion with hyaluronidase weakened the reaction considerably. In muscles and blood cells the reaction became aspecific. When the reaction was undisturbed, *i.e.* if there was no coagulation, the striation of muscles appeared very distinctly, as a deposit of reddish brown granules had formed on the Q and Z lines of the vellow muscle fibres, while the I and M lines were left free. The gold colloid gave sometimes a yellowish reaction in areas where the colour of the true reaction was never observed. This is, thus, a form of colloid precipitation which serves as a good counterstain for the reddish brown reaction. A blue or violet film appeared sometimes in these areas. Its colour depended on the size of the deposited granules. The gold-positive parts of the bones, connective tissues, chondrocytes and umbilical cord showed PAS-positivity. It was mostly in the metachromatic areas that the appearance of an aspecific yellow or blue film was observed.

Discussion

Silver colloid. A comparison of its reaction with the corresponding control reactions has pointed to a correlation between the PAS- (and, to some extent, the Hale-) positivity on the one hand and that of the silver colloid, on the other, as proved by the silver- and PAS- or Hale- positivity of mucin or the chondrocytoplasm. The silver would thus stain the mucins, the insufficiently polymerized acid mucopolysaccharides (chondrocytes) and hyaluronic acid (connective tissues). Recent experiments with Best's carmine have raised the possibility of the silver colloid's specificity for glycogen. In any case, the weakly acid stabilization-pH of silver does not yet mean its adsorption to all weakly acidic tissue components, a phenomenon which points to the chemical affinity of the particles in addition to their physical affinity.

Copper colloid. Electro-affinity was more pronounced in this reaction. Copper was bound by the ground substance of cartilages and still more by the ground substance of cartilages and still more by that of bones; the reaction was much weaker in hyaline cartilage, a substance which contains strongly acid groups Hale- and alcian blue positivity metachromasia. The copper reaction reveals clearly the PAS-positive, ortho- and beta metachromatic zones of the ground substance of the epiglottal elastic cartilage as also the PAS-positive parts of the umbilical vessel walls. The coincidence of the metachromatic zone with that of the copper colloid is not in contradiction to what has been stated in the foregoing since, as is known, depolymerized (i.e. PAS-positive) carbohydrates, too, may give rise to metachromasia [11, 16].

Gold colloid. WOLMAN'S claim [17, 18] that, of all mucopolysaccharides, it is solely for hyaluronic acid that gold is specific has been corroborated by the gold reaction, the efficacy of hyaluronidase digestion, and also by the control stainings (the gold-positive zones appeared to be PAS-positive and gave an orthochromatic reaction). The pH of the reaction does not mean a perfect electro-affinity in this case either, since it fails to stain the bony tissues. Although the reaction is perceptible in the ground substance of epiphyseal cartilage near the metaphysis, it ceases to be (or is but weakly) positive in the osseous ground substance. Since gold colloid stains the epithelium, connective tissue and part of the nuclei, it cannot be regarded as acting solely by chemical affinity; an interference of the two mechanisms appears to be probable.

Molybdenum colloid. The low operative pH makes it clear why the cartilages and the wall of the umbilical vessels give a positive reaction with this colloid. These areas are metachromatic and basophilic and so it is possible to demonstrate their acid polysaccharide contents. That the reaction was positive in respect of mucin means no contradiction to the silver- and PAS-positivity since mucins are known to display different structures [14, 15]. It is, thus possible to identify certain acid mucopolysaccharides (chondroitin sulphuric acid) and mucins by means of colloidal molybdenum. The strong reaction observed in the osseous ground substance cannot be explained by the theory of electro-affinity. The ground substance of the bones contains weakly acidic components, much hyaluronic acid and polysaccharide-protein complexes [8], whereas the element molybdenum has an affinity to inorganic components, to phosphorus in particular [3]. This would suffice to explain the bone-staining property of molybdenum provided there remains sufficient stainable phosphorus and other inorganic component in the decalcinated sections. The amount of the remaining salts is probably negligible and, moreover, bound by PASpositive mucopolysaccharide-protein complexes. This might be the reason why the area of PAS-positivity and molybdenum-positivity coincide in the ground substance of bones. The effect of hyaluronidase digestion is the proof that the molybdenum-positive substances of the glands belong to the mucopolysaccharides. Since the reaction was weak in the ground substance of cartilages and bones, they must be supposed to contain hyaluronidaseresistant, strongly acid polysaccharides, an assumption borne out by the control stainings.

Combination of gold and molybdenum would be expected to reveal, side by side, hyaluronic acid and chondroitin sulphuric acid. These two compounds carry weakly and intensely acid groups. Considering, however, the bone-staining power of molybdenum, the above statement does not apply to sections which contain bony substances.

Combinations of iron and molybdenum can be used for the simultaneous demonstration (in sections which contain also bony tissue) of the acid polysaccharides of the cartilage (iron reaction) and the molybdenum-positive unidentified substances of the bone.

The combination of gold and iron (Bi-Col reaction) makes it possible to demonstrate the simultaneous presence of hyaluronic acid, chondritin sulphuric acid and mucins. This was the only colloid combination which left a "blank area" in the sections, one which gave no reaction with either colloid. A "blank area" was, for instance, the bone of the knee joint. The fact that the ground substance is PAS-positive allows for a triple combination. Though theoretically feasible, the application of molybdenum sol involved difficulties.

As can be seen, all of these colloid combinations are suitable for the simultaneous identification of intensely and weakly acid groups. However, the respective reactive areas were different on account of differences in the operative pH of the solutions and in the quality of the ions. It was thus possible to identify a different pair of weakly and intensely acidic substances with each combination. The present experiments constitute but a first step, and it is hoped that it will be possible to introduce iron-molybdenum and molybdenum into the Bi-Col reaction, as also to study new colloids in the course of further studies. The present results are assembled in Table II.

рН	PAS	Au 5.2	Cu 5.6	Ag 4.8	0.5	Metac.	Hale	Alc.
Hy. cart. cell	++	+-		+++		++	+++	++
Hy. cart. ground subst.	÷		+	+	+++	++++	+++	
Conn. tissue	+	++++	++	++		+	+	
Bone	+++	++	+++	+	++++			
Mucin a d	++++++			+	++++++	+++++++++++++++++++++++++++++++++++++++	++++++++	+++++++++++++++++++++++++++++++++++++++
Umb. cord. <mark>v</mark> w	++++	+++++++		+	++++++	++	+++++++	++

Table II

Results of the applied colloid and control reactions

a = acinus; d = efferent duct; v = wall of vessels; w = Wharton's jelly

REFERENCES

1. ARMSTRONG, W. D.: (1952) Phosphorus Metabolism in the Skeleton. In: A Symposium on Phosphorus Metabolism. Ed. W. D. McElroy a. B. Glass. The Johns Hopkins Press, Baltimore, pp. 698. — 2. BUZÁGH, A.: (1954) A kolloidkémia praktikuma. Tankönyvkiadó. Budapest. — 3. Cowdry, E. V.: (1952) Laboratory Technique in Biology and Medicine. The Williams & Wilkins Company. Baltimore. — 4. ERDEY GRÚZ, T., PROST, J.: (1951) Fizikai kémiai prak-

tikum. Tankönyvkiadó, Budapest. – 5. GRAUMANN, W.: (1957) Vergleichende Untersuchungen zur Frage der Spezifität verschiedener Modifikationen der Polysaccharid-Eisenreaktion. Acta histochem. (Jena) 5, 49. - 6. HALE, C. W.: (1946) Histochemistry of Acid Polysaccharides in Animal Tissue. Nature (Lond.) 157, 802. - 7. HAYNES, R.: (1928) Investigation of Thiazine Biological Stains. II. Influence of Buffered Solutions on Staining Properties. Stain Technol. 3, 131. - 8. MCLEAN, F. C., URIST, M. R.: (1951) Newer Knowledge of Postfetal Osteogenesis. Bull. Hosp. J. Dis. (N. Y.) 12, 431. - 9. MCLEAN, F. C., BUDY, A. M.: (1959) Connective and Supporting Tissues: Bone. Ann. Rev. Physiol. 21, 69. - 10. MÜLLER, G.: (1955) Über eine Vereinfachung der Reaktion nach Hale (1946). Acta histochem. (Jena) 2, 68. - 11. SCHUBERT, M., HAMERMAN, D.: (1956) Metachromasia: Chemical Theory and Histochemical Use. J. Histochem. Cytochem. 4, 159. - 12. SPICER, S. S.: (1960) A Correlative Study of the Histochemical Properties of Rodent Acid Mucopolysaccharides. J. Histochem. Cytochem. 8, 18. - 13. SPICER, S. S., MEYER, D. B.: (1960) Histochemical Differentiation of Acid Mucopolysaccharides by Means of Combined Aldehyde Fuchsin-Alcian-Blue Staining. Clin. Path. 33, 453. - 14. STARY, Z.: (1959) Mucopolysaccharides and Glycoproteins. Chemistry and Physiopathology. Ergebn. 15. WARREN, L., SPICER, S. S.: (1961) Biochemical and Histochemical Physiol. 50, 174. Identification of Sialic Acid Containing Mucins of Rodent Vagina and Salivary Glands. J. Histochem. Cytochem. 9, 900. - 16. WISLOCKI, G. B., BUNTING, H., DEMPSEY, E. W.: (1947) Metachromasia in Mammalian Tissues and Its Relationship to Mucopolysaccharides. Amer. J. Anat. 81, 1. - 17. WOLMAN, M.: (1956) A Histochemical Method for the Differential Staining of Acidic Tissue Components, Particularly Ground-Substance Polysaccharides. Bull. Res. Coun. Israel E. 27. - 18. WOLMAN, M.: (1961) Differential Staining of Acidic Tissue Components by the Improved Bi-Col Method. Stain Technol. 36, 21. - 19. ZAMBOTTI, V.: (1957) The Biochemistry of Preosseous Cartilage and of Ossification. Sci. med. ital. 5, 614.

DIE VERWENDUNG VON METALL-KOLLOIDEN IN DER HISTOCHEMIE DER KOHLENHYDRATE

L. MÓDIS, I. SÜVEGES und I. FÖLDES

1. Verff. studierten die neue histochemische Verwendbarkeit der verschiedenen Metall-Kolloide zur Bestimmung der pH-Signatur der Gewebe-Mucopolysacchariden.

2. Als verwendbar erwiesen sich die Kupfer-, Silber-, Molybdän- und die modifizierten Gold-Kolloide.

3. Silber, Kupfer und Gold eignen sich – wegen ihrem höheren Stabilisierungs-pH-Punkt – zum Nachweis der verschiedenen schwach saueren Mucopolysacchariden, Molybdän indessen – wegen dem niedrigen pH-Wert der Anwendung – zum Nachweis der stark saueren Polysacchariden. Der Mechanismus der Knochenfärbung durch Molybdän blieb ungeklärt.

4. Die pH-Bereiche der Gewebe-Mucopolysacchariden sind den pH-Differenzen der Kolloide gemäß unterschieden worden, es sind jedoch gewisse chemische Spezifitäten ebenfalls nicht auszuschliessen.

5. Die Kolloid-Paare weisen verschiedene Kohlenhydratkomponenten der Gewebe nach, deren Ladungsverhältnisse dem pH-Wert der Lösung entsprechen.

6. Die Entwicklung der Eisenkolloid-Reaktion bis zur schwarzen Farbe ist als ein brauchbares Teilergebnis zu bewerten. Die erfolglose Anwendung der Eisenkolloide negativer Ladung bestätigt den Adsorptions-Wirkungsmechanismus der Eisenkolloid-Reaktion bei saurem pH-Wert.

7. Die mit Kolloiden durchgeführte Bestimmung der pH-Signatur der Gewebe erscheint als eine gut verwendbare Behelfsreaktion in der histochemischen Anwendung der Mucopolysaccharide.

8. Die Untersuchungen weisen darauf hin, daß in der Histochemie der Mucopolysaccharide auch die physiko-chemischen Eigenschaften dieser Verbindungen, neben den chemischen, entscheidend und verwendbar sind.

9. Die Metall-Kolloid-Reaktionen scheinen zur Bestimmung der reellen pH-Signatur im Gewebe, auf Grund der im Punkt 8 enthaltenen Feststellung – unter entsprechenden auf andere Gewebekomponenten ausgebreitet – geeignet zu sein.

ПРИМЕНЕНИЕ КОЛЛОИДОВ МЕТАЛЛОВ В ГИСТОХИМИИ УГЛЕВОДОВ

Д. МОДИШ, И ШЮВЕГЕШ и И. ФЁЛЬДЕШ

1. Авторы исследовали применяемость различных коллоидов металлов в гистохимии для определения pH тканевых мукополисахаридов.

2. Для этой цели можно применять коллоиды меди, серебра, молибдена и видоизмененное, коллоидное золото.

3. Серебро, медь и золото из-за более высокой точки стабилизации рН выявляют различные мукополисахариды со слабо кислотным характером, в то время как молибден из-за низкого рН применения выявляет сильно кислые полисахариды. Открытым еще остался механизм действия костной окраски молибдена.

4. Соответственно различию pH коллоидов дифференцированы области pH тканевых мукополисахаридов, но определенные химические особенности не могут быть исключены.

5. Коллоидные пары выявляют все другие углеводные компоненты тканей, обладающие различными зарядами, соответствующими рН раствора.

6. Реакция с коллоидным железом может рассматриваться как частичный результат, который может быть применен. Безуспешное применение коллоидного железа с отрицательным зарядом доказывает адсорбционный механизм реакции коллоидного железа при кислом pH.

7. Определение pH тканей, проведенное при помощи коллоидов кажется хорошо применимым в качестве вспомогательной реакции при гистохимическом использовании мукополисахаридов.

8. Исследование авторов указывает на то, что в гистохимии мукополисахаридов наряду с химичскими свойствами этих соединений в решающей степени могут быть использованы и физико-химические средства.

9. Для определения реального pH тканей на основании сказанного в пункте 8 реакции с коллоидными металлами — распространяя их при соответствующих условиях на другие тканевые компоненты — кажутся пригодными.

Dr. L. MÓDIS, Dr. I. SÜVEGES, Dr. I. FÖLDES, Debrecen, Anatómiai Intézet, Hungary

EINIGE GESETZMÄSSIGKEITEN DER AFFERENTEN INNERVATION DER EXTRA- UND INTRAKRANIALEN VENENBILDUNGEN

S. S. MICHAILOW

(Eingegangen am 20. Dezember, 1963)

Mit der Imprägnationsmethode nach BIELSCHOWSKY-GROSS bzw. CAMPOS wurde der Nervenapparat der oberflächlichen und tiefen Gesichtsvenen, der Nebenhöhlenvenen, der oberflächlichen Venen des Schädelgewölbes, der Hirnhautvenen, einiger Venensinus, der oberflächlichen und tiefen Gehirnvenen und der Kleinhirnvenen untersucht.

Aus den Untersuchungsergebnissen geht hervor, daß die angeführten Venengebilde des Kopfes über einen entwickelten Nervenapparat verfügen; er enthält a) in der Außenschicht der Venenwand verlaufende Nervenstämme aus mehr oder weniger großen Fasernbündeln. Diese Bündel bilden perivasale und adventitiale Geflechte; b) einzelne markhaltige und marklose Nervenfasern, die in den verschiedenen Schichten der Venenwand intramurale Nervennetze und Nervengeflechte formen; c) Nervenendigungen von verschiedener Struktur (nicht eingekapselte interstitielle Rezeptoren mit diffuser Verästelung) baumförmige oder knäuelchenförmige Rezeptoren, ferner eingekapselte Rezeptoren vom Typ der Vater-Pacinischen Körperchen; d) Nervenzellen und deren Anhäufungen.

In der Struktur der Nervenapparate bestehen bedeutende Unterschiede, je nach dem welchen Abschnitt des Venensystems sie innervieren.

In den letzten Jahren richtete sich die Aufmerksamkeit der Forscher immer mehr auf die reflektorische und humorale Regulation des Gehirnkreislaufs. Die Morphologie des intra- und extrakranialen Kreislaufs ist aber noch wenig bekannt. Besonders wenig erforscht ist der Nervenapparat der verschiedenen Venenbildungen des Kopfes (Venen, Venengeflechte und Sinus), einer der Entstehungsmechanismen der reflektorischen, hämodynamischen Reaktionen.

Erst in den letzten fünf Jahren erschien eine Reihe von Publikationen, in denen der Versuch unternommen wurde, die Morphologie des Nervenapparates einiger Abschnitte des Venensystems des Kopfes zu klären. Die Forscher untersuchten vor allem die venösen Sinus durae matris (MICHAILOW 1956, 1961, JEGOROWA 1959, 1960, BEKOW 1959, ANISIMOWA-ALEXANDROWA 1960). Es wurde der Nachweis erbracht, daß es in den Wänden der Venensinus einen komplexen Nervenapparat gibt, der aus Geflechten, Zellenhäufungen und verschiedenen Nervenendigungen besteht.

Über die anderen Venenbildungen des Kopfeserschienen nur vereinzelte Arbeiten, und zwar über die Innervation der großen Strukturen: der Gesichtsvenen und ihrer Äste (Iwanow 1956, 1959), ferner der großen Gehirnvene (Galeni) (HORNET und NISSIM 1957). Die vorhandenen äußerst lückenhaften Literaturdaten über die Nervenapparate in einigen Venen bieten jedochkeine Möglichkeit, hinsichtlich der Gesetzmäßigkeiten der Innervationsverhältnisse im Venensystem des Kopfes in ihrer Gesamtheit Schlüsse zu ziehen.

In der vorliegenden Mitteilung werden die Ergebnisse der durch ein wissenschaftliches Kollektiv unter Leitung des Verfassers durchgeführten Untersuchungen zusammengefaßt, die die Innervation der Venenbildungen des Kopfes zu klären suchten. Untersucht wurden sämtliche Hauptabschnitte des Venensystems des Kopfes: die Gesichtsvenen (die oberflächlichen und die tiefen, die Venen der Nebenhöhlenschleimhaut (ZAREW), die Venen des Schädelgewölbes (MARCHASCHEW), die Hirnhautvenen (WOTINZEW), einige unerforschte Venensinus — der Sinus cavernosus (MICHAILOW) und der Sinus occipitalis (JANOWITSCH), der Bulbus venae jugularis (SCHARIKOWA), die oberflächlichen Gehirnvenen (JEREMENKO), die tiefen Gehirnvenen (KAGAN) und die Kleinhirnvenen (MACHANIK) an je 20—40 Leichen und mit der Degenerationsmethode an je 14—25 Hunden. Die Totalpräparate oder 30—50 μ dicken Schnitte der Venenstückchen wurden laut Bielschowsky-Groß bzw. Campos imprägniert.

Allgemeine Charakteristik des Nervenapparates in den Venenbildungen des Kopfes. Die ausgeführten Untersuchungen zeigten, daß alle untersuchten Venenbildungen über einen entwickelten Nervenapparat verfügen, in dem sich folgende Teile abgrenzen lassen: 1. Nervenstämme in der Außenschicht der Venenwand, die aus mehr oder weniger großen Nervenfasernbündeln bestehen; diese Bündel bilden weitmaschige perivasale und adventitiale Geflechte; 2. einzelne markhaltige und marklose Nervenfasern, die in den verschiedenen Schichten der Venenwand intramurale Nervennetze und Nervengeflechte bilden; 3. Nervenendigungen von verschiedener Struktur (Rezeptoren); 4. Nervenzellen oder ihre Anhäufungen.

Perivasale und adventitiale Nervengeflechte. Von den großen Venenbildungen des Kopfes wurden Nervengeflechte nachgewiesen: in den vorderen und hinteren Gesichtsvenen, in der inneren Kiefernvene, in der oberflächlichen Schläfenvene und ihren Hauptzuflüssen, in der Stirnvene, im Bulbus venae jugularis, in den großen Hirnhautvenen, in den Sinus durae matris, in den oberflächlichen Gehirnvenen (in der medialen Gehirnvene, in den Venen des Okzipitallappens, in den basalen Schläfenvenen, in der *Trolard*schen und in der *Labbe*schen Vene), in den tiefen Gehirnvenen (in der großen Gehirnvene und den anliegenden Abschnitten der inneren Gehirnvenen), in einigen der größten Kleinhirnvenen in der Nähe ihrer Einmündung in die Sinus. Die erwähnten Geflechte bestehen aus verhältnismäßig großen Fasernbündeln, die entlang der Venen ziehen. Die perineuralen Membranen der nebeneinander liegenden Fasernbündeln bilden zahlreiche Anastomosen, in denen einige Nervenfasern aus dem einen Bündel in den anderen übertreten und umgekehrt. Als Ergeb-

nis dieser Verbindungen entsteht das weitmaschige Nervengeflecht der erwähnten Stämme. In den zentralen Abschnitten der angeführten Kopfvenen haben die Fasernbündel einen Diameter von $45-120~\mu$, und enthalten 20-80Fasern. Die Geflechte verlaufen in den äußersten Schichten der Adventitia, und man nennt sie deshalb perivasale Geflechte. Je mehr sie sich der Peripherie nähern, um so dünner werden sie ($15-45~\mu$), und auch die Maschen werden enger. An der Peripherie führen die Bündel nur noch 10-40 Nervenfasern, sie verlaufen in den tieferen Schichten der Adventitia und bilden das adventitiale Geflecht (Abb. 1).

Nach der Entsendung einzelner Nervenfasern oder kleiner Faserngruppen werden die Fasernbündel des adventitialen Geflechts allmählich dünner und enthalten nur mehr 5—10 Fasern. Schließlich, noch näher zur Peripherie, geht das adventitiale Geflecht allmählich in das Nervengeflecht der Gefäßwand über. In den Venen des Plexus pterygoideus, den Venen der Nebenhöhlenschleimhaut, den kleinen Venen, aus denen die oberflächliche Schläfenvene entspringt, in den Quellen der Stirnvene und der Vena parietalis, in den Venen der Innenfläche der Hirnhemisphären, den Venen der Gehirnbasis, der Vene des Septum pellucidum und den Kleinhirnvenen läßt sich kein aus Fasernbündeln bestehendes perivaskuläres Nervengeflecht nachweisen.

Die Nervenbündel der perivaskulären und adventitialen Geflechte bestehen aus markhaltigen und marklosen Fasern. Die meisten markhaltigen Axone haben einen Diameter von $3-5 \ \mu$, Myelinfasern von größerem Durchmesser $(5-7 \ \mu)$ finden sich sehr selten. Die marklosen Fasern ziehen in kleinen Gruppen oder bilden »Kabelsysteme« (LAWRENTJEW). In den Nervenbündeln mittlerer Größe (Diameter $15-30 \ \mu$) lassen sich gewöhnlich 2-3 markhaltige Fasern (mit einem Diameter von $3-5 \ \mu$), 3-5 dünne markhaltige Fasern (Diameter unter $3 \ \mu$), und zahlreiche (20-20) marklose Fasern beobachten. Die Fasernbündel sind immer etwas »wellenartig«, vor allem jene, die quer zur Venenachse verlaufen. Vermutlich steht der geschlängelte Fasernverlauf in der Venenwand mit der Veränderung des Gefäßkalibers in den verschiedenen Kreislaufphasen in Zusammenhang.

Es fällt auf, daß in den perivasalen und adventitialen Geflechten sich die größte Nervenkonzentration an den Venengabelungen beobachten läßt, vor allem an jenen Stellen, wo die Gehirn- und Hirnhautvenen in die Venensinus münden, bei der Entstehung der großen Gehirnvene, der Mündung der Kleinhirnvenen in die Sinus usw. Ein stark entwickeltes Nervengeflecht aus Fasernbündeln findet sich in den Wänden der Sinus, besonders im Sinus cavernosus.

Intramurales Nervengeflecht wurde in sämtlichen untersuchten Venen des Kopfes gefunden. An den Totalpräparaten der Venenwand kann man sehen, wie vereinzelte Fasern und kleine Faserngruppen (2-4 Fasern, eine markhaltige und 2-3 marklose) aus dem adventitialen Geflecht austreten, sich



Abb. 1. Adventitiales Nervengeflecht aus Fasernbündeln in der Wand der Gesichtsvene (Präparat von N. I. ZAREWA. Mikrophotogramm. Imprägnation nach Campos. Objektiv 8, Okular 7)
Abb. 2. Intramurales Geflecht aus Nervenfasern in der Wand der großen Gehirnvene. (Präparat von I. I. KAGAN. Mikrophotogramm. Imprägnation nach Campos. Objektiv 8, Okular 10)
Abb. 3. Subepitheliales Faserngeflecht in der Wand der inneren Gehirnvene. (Präparat von I. I. KAGAN. Mikrophotogramm. Impregnation nach Campos. Objektiv 8, Okular 10)

auf einen gewissen Abstand von der Adventitia entfernen und dann in tiefere Schichten eintretend ganz bis zum Endothel vordringen. Die kleinen Bündel (mit einem Diameter von 10-15 μ) teilen sich hierbei auf einzelne Fasern.

Die Zellen des Schwannschen Synzitiums der kleinen Nervenbündel bilden mit den Nachbarbündeln anastomisierende Protoplasmafortsätze, durch die der Fasernaustausch zwischen den Bündeln vor sich geht. Als Ergebnis entsteht in sämtlichen Schichten der Venenwand ein feinmaschiges intramurales Ner-

In den tiefen Schichten der Wand verlaufen einzelne Nervenfasern. In der Wand der Kopfvenen ziehen in der Regel zwei nebeneinander liegende Fasern – eine markhaltige von kleinem $(1-3 \ \mu)$ oder mittlerem $(3-5 \ \mu)$ Diameter und eine (seltener zwei) marklose Faser. Die markhaltigen bilden, durch dichotomische Teilung, eine Reihe von Neuriten-Kollateralen. An der Stelle, wo sich die ursprüngliche Faser in zwei Kollaterale teilt (die in der Regel in verschiedene Richtungen ziehen) sieht man deutlich eine ausgeprägte Verdickung. An manchen Präparaten kann man die Schritt für Schritt vor sich gehende Teilung der Faser ohne Verlust der Myelinscheide auf große Strecken verfolgen. Die Kollateralen dieser Faser können sich anderen Fasern nähern und neben ihnen verlaufen. Bisweilen läßt es sich beobachten, wie 2-3 marklose Fasern, die neben dem markhaltigen, die Kollateralen abgebenden Axon ziehen, dieses nacheinander verlassen und sich seiner Kollateralen entlang ausbreiten. Häufig sehen wir, wie marklose Fasern, die nicht zum »Kabelsystem« gehören, auf ihrem Wege in der Venenwand Kollaterale bilden. In einem der Gesichtsvenenpräparate durchzog eine einzelne marklose Faser eine Strecke von etwa 3000 μ und bildete 7 Kollaterale, deren jedes eine Länge von $800-1200 \ \mu$ erreichte.

In vielen Präparaten (in der Wand der großen Gehirnvene, in der Vena terminalis, der basalen Vena occipitalis, der vorderen Gesichtsvene) ist deutlich zu sehen, wie eine markhaltige oder marklose Faser, sich Schritt für Schritt teilend (wobei die markhaltige Faser die Myelinscheide verliert) unter dem Endothel ein eigenartiges und weitausgedehntes »Nervennetz« bildet (Abb. 3). Die feinen Faserchen dieses »Netzes« teilen sich dichotomisch und bilden Nervenendapparate.

Zuletzt entsteht in der Wand der Kopfvenen ein mehrschichtiges komplexes Geflecht aus Nervenbündeln, die in sämtlichen Schichten des Gefäßes ziehen. Deshalb trägt natürlich die Abgrenzung der obenbeschriebenen perivasalen und intramuralen Geflechte einen künstlichen Charakter, und geschah nur um ihre Beschreibung zu Erleichtern. Es sei jedoch betont, daß die Fasernbündel in den einzelnen Abschnitten dieses einheitlichen Nervenplexus der Kopfvenenwände jeweils einen anderen Diameter haben, die Zahl ihrer Axone ist verschieden, und ihr Geflecht ist von unterschiedlicher Komplexität (in den äußeren Schichten des Gefäßes ist es weitmaschig, in den Innenschichten hingegen feinmaschig). Außerdem ist die Struktur des Nervenplexus in den Venenwänden auch je nach der Lokalisation und dem Kaliber der einzelnen Gefäße verschieden.

vengeflecht (Abb. 2).

Nerven der Vasa-venarum-Wände. Einige Venengebilde des Kopfes, vor allem der Bulbus venae jugularis, die Sinus durae matris, die oberflächliche Vena temporalis und ihre Zuflüsse sowie die große Gehirnvene verfügen über ein reiches intramurales Gefäßnetz. Beispielsweise wurde in der Wand des Bulbus venae jugularis, im Sinus occipitalis und Sinus cavernosus, ein stark entwickeltes intramurales Gefäßnetz mit zahlreichen arteriovenösen Anastomosen und speziellen Gefäßknäuelchen nachgewiesen. Um die Vasa venarum zieht ein Nervenplexus aus Bündeln dünner markhaltiger und zahlreicher markloser Fasern. Ein ähnlicher Plexus aus Bündeln von 2-3 marklosen Fasern umgibt die arteriovenösen Anastomosen.

Fasernbündel aus 1-2 markhaltigen und 3-5 marklosen, entlang der Wandgefäße ziehenden Axonen lassen sich auch in anderen Venenbildungen des Kopfes nachweisen (Gesichtsvenen, oberflächliche und tiefe Gehirnvenen).

Der obenbeschriebene Nervenapparat der Vasa venarum gehört zum Bestand des allgemeinen Nervenplexus der Venenwände. An den Präparaten läßt sich der Fasernaustausch zwischen den verschiedenen Axonenbündeln gut beobachten. Aus den Fasernbündeln oder Gruppen treten einzelne Axone aus, die sich in der Gefäßwand ausbreiten und verzweigen, nicht selten »polyvalente« (LAWRENTJEW) oder vielfach geteilte (DOLGO-SABUROW) Nervenendigungen bildend. In diesen Fällen endet einer der terminalen Fasern an den Vasa venorum.

Nervenendigungen. In sämtlichen untersuchten Venengebilden des Kopfes wurden in den Wänden Nervenendigungen beobachtet, einschließlich der feinsten Venen (z. B. die Venen der Stirnhöhlenschleimhaut, die Vv. meningeae, der Ursprung der Gehirnvenen).

Auf Grund der morphologischen Merkmale gehören die in den Kopfvenen nachgewiesenen sensiblen Nervenendigungen der Klassifikation von DOLGO-SABUROW gemäß größtenteils zu den nicht eingekapselten, *a*) diffus verästelten, *b*) baumförmig verzweigten, *c*) knäuelchenförmigen interstitiellen Rezeptoren. In einigen Präparaten finden sich auch eingekapselte Rezeptoren vom Typ der Vater-Pacinischen Körperchen. Schließlich lassen sich in einer Reihe von Venen sog. »schnurrbartförmige« Endigungen nachweisen.

Es wird angenommen (LAWRENTJEW, DOLGO-SABUROW u. a.), daß die baumförmig verzweigten und knäuelchenförmigen Rezeptoren, die nach DE CASTRO zu den Rezeptoren des Typs 2 gehören, mit den Axonen der sensiblen Zellen des Gangl. nodosum und des Gangl. jugulare in Zusammenhang stehen. Im Gegensatz hierzu gehören die Rezeptoren mit diffuser Verästelung (nach DE CASTRO: Rezeptore vom Typ 2) zu den Neuriten der sensiblen Zellen der Spinalganglien. Interessant in diesem Zusammenhang sind die morphologischen Daten der in den verschiedenen extra- und intrakranialen Venenbildungen nachweisbaren Rezeptoren.

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß in den Venenbildungen des Kopfes hinsichtlich der Verteilung der verschiedenen Rezeptorentypen gewisse Gesetzmäßigkeiten bestehen. In den einen Venen finden sich nur diffus verästelte und »schnurrbartförmige« Rezeptoren, in den anderen dagegen bäumchen- und knäuelchenförmige Endigungen sowie auch diffuse Verästelungen. Beispielsweise finden sich in den oberflächlichen Gesichtsvenen (im Hauptstamm der Vena facialis communis, in der Vena facialis anterior und Vena facialis posterior und ihren Ursprüngen in der Vena temporalis superficialis und ihren Hauptbahnen) Rezeptoren mit diffuser Verästelung sowie auch »schnurrbartförmige« Rezeptoren. Beide Rezeptorentypen gehören zu den markhaltigen Fasern mittleren Kalibers, die - aus den Bündeln des intramuralen Plexus austretend — sich auf bedeutende Flächen ausbreiten (2-4)Blickfelder im Objektiv 8), lange marklose Terminale aussenden und durch deren dichotomische Teilung unkomplizierte Arborisationen bilden. In anderen Fällen zieht die markhaltige Faser noch weiter, vor ihrer Teilung in Endigungen verschwindet die Markscheide, und die marklosen Endfaserchen bilden nach dichotomischer Teilung lange feine Äste, die in den Geweben enden (Abb 4).

Die Rezeptoren der aufgezählten extrakranialen Venen sind infolgedessen verhältnismäßig wenig verästelt, und sie durchziehen in den durch sie innervierten Geweben weite Strecken. Es sei erwähnt, daß die Rezeptoren der Vv. faciales superficiales und die Venen des Schädelgewölbes von einer großen Anzahl von Synergisten umgeben sind und mit diesen in intimen Kontakt treten.

In der Vena frontalis, den tiefen Gesichtsvenen und im Plexus pterygoideus, in den Vv. meningeae und den Sinus finden sich Nervenendigungen beider Typen. Neben Rezeptoren mit sehr einfacher und ziemlich spärlicher Verästelung finden wir auch baumförmig verzweigte Typen, ferner Arborisationen verschiedener Komplexität und sogar knäuelchenförmige Nervenendigungen. Interessanterweise lassen sich »schnurbartförmige« Rezeptoren im intrakranialen Venensystem nur in der Wand der Hirnhaut- und Kleinhirnvenen nachweisen. Die Rezeptoren der aufgezählten Venenbildungen hatten eine große Anzahl von Satellitzellen.

In den oberflächlichen zerebralen Venen wurden drei Typen von Rezeptorenapparaten gefunden. Einige dieser Apparate bestehen aus markhaltigen Fasern mittleren Diameters und stellen Rezeptore vom diffusen Typ dar. Nachdem die Nervenfasern die Markscheide verlieren, teilen sie sich nach und nach dichotomisch auf Terminale, die frei in dem innervierten Gewebe enden; manche Terminale tragen Endverdickungen. Andere Endigungen sind weniger verzweigt und bilden kleine, spärlich verästelte Bäumchen oder nicht eingekapselte Knäuelchen (Abb. 5). Häufig treten die Rezeptorenäste mit den Synergisten in Kontakt. In der Wand der Labbe- und Trolardschen Venen wur-



Abb. 4. Nicht eingekapselte interstitielle Rezeptoren mit diffuser Verästelung in den Gesichtsvenen. (Zeichnungen nach den Präparaten von N. I. ZAREW. Imprägnation nach Bielschowsky-Groß. Objektiv 40, Okular 15) a – Diffus verzweigter Rezeptor in der Wand der vorderen Gesichtsvene; b – diffus verzweigter Rezeptor in der Wand des Plexus pterygoideus

den eingekapselte Rezeptoren vom Typ der Vater-Pacinischen Körperchen gefunden (Abb. 6).

In den tiefen Gehirnvenen finden sich gleichfalls Rezeptoren mit diffus verzweigten Endigungen sowie kompakte baumförmige Terminale, die sich weit ausbreiten und schließlich nicht eingekapselte Knäuelchen. In den tiefen Venen können die Endigungen Endapparate in Form von Verdickungen tragen (Abb. 7). Nervenendigungen gibt es auch in den sehr feinen tiefen Gehirnvenen. Beispielsweise wurden in den feinen Venen der lateralen Abschnitte der Tela chorioidea der III. Ventrikel, die in die Vena cerebralis interna einmünden, Rezeptoren nachgewiesen.



Abb. 5. Nicht eingekapselte interstitielle Rezeptoren in der Wand der oberflächlichen Gehirnvenen (Zeichnungen nach den Präparaten von W. I. JEREMENKO. Imprägnation nach Bielschowsky-Groß. Objektiv 40, Okular 10). a — diffus verzweigte Nervenendigung in der Wand der Stirnvene; b — Nervenendigung in Form eines nicht eingekapselten Knäuelchens in der Okzipitalvene

Sehr interessant sind die bei der Untersuchung der Rezeptoren der Kleinhirnvenen erhaltenen Ergebnisse. Es hat sich erwiesen, daß die Kleinhirnvenen vornehmlich sich weit ausbreitende und nur wenig verästelte Nervenendigungen oder »schnurrbartförmige« Rezeptoren enthalten, wodurch sich der Rezeptorenapparat der Kleinhirnvenen von dem der Großhirnhemisphären-Venen scharf unterscheidet. Die feinen Kleinhirnvenen werden von axovasalen und dendrivasalen Synapsen innerviert. Die Erörterung solcher neurovaskulärer Beziehungen geht jedoch über den Rahmen unserer gegenwärtigen Arbeit hinaus.

Besonders betont sei, daß die intrakranialen Venenbildungen bedeutend reicher mit Nervenapparaten versorgt sind. In den Vv. meningeae, den Sinus durae matris, den Gehirnvenen finden sich nicht nur vereinzelte Rezeptoren, sondern auch eigenartige »Rezeptorenfelder«, in denen eine große Anzahl von Nervenfasern gleichzeitig sich verzweigt und endigt.

Nervenzellen. Nervenzellen wurden nur in einigen intrakranialen Venenbildungen festgestellt: in der Wand des Sinus cavernosus, den Venen der Ge-



Abb. 6. Eingekapselte Nervenendigung vom Typ der Vater-Pacinischen Körperchen in der Wand der Labbeschen Vene (Zeichnung nach einem Präparat von W. I. JEREMENKO. Imprägnation nach Campos. Objektiv 40, Okular 7)

hirnbasis sowie in der Vena terminalis. Sie liegen einzeln oder in kleinen Gruppen von 2-3 Zellen, und sie können auch Mikroganglien bilden. In diesen Venengebilden waren die Nervenzellen rund, birnenförmig oder dreieckig, zeigten eine Argyrophilie verschiedenen Grades, hatten einen intensiv gefärbten Kern und waren pseudounipolar. In Zellnähe teilte sich der kurze Neurit in zwei Nervenfortsätze, deren jede in der Venenwand verlief und sich bisweilen dichotomisch teilte (Abb. 8).

Morphologische Besonderheiten des Nervenapparates von verschiedenen Venenbildungen.

Die Gegenüberstellung der zur Verfügung stehenden Daten ermöglicht die Beurteilung der morphologischen Besonderheiten der Nervenapparate von verschiedenen extra- und intrakranialen sowie fazialen Kopfabschnitten. Den Untersuchungsergebnissen gemäß verfügen die tiefen Gehirnvenen und zwar der gemeinsame Stamm der großen Gehirnvene sowie die Vv. terminales

über den kompliziertesten und ausgeprägtesten Nervenapparat, in dem sämtliche Bestandteile vertreten sind. In ihrer Wand formen sich die dichtesten Nervengeflechte, ihre Nervenendigungen sind besonders kompliziert, und es finden sich in ihnen auch Nervenzellen.



Abb. 7. Nicht eingekapselte interstitielle Rezeptoren in der Wand der tiefen Gehirnvenen.
(Zeichnungen nach den Präparaten von I. I. KAGAN. Imprägnation nach Campos. Objektiv
40, Okular 15). a – Diffus verzweigte Nervenendigung in der Wand der großen Gehirnvene;
b – weitverzweigte baumförmige Nervenendigung in der Wand der Vena terminalis

Die oberflächlichen Gehirnvenen sind ebenfalls reich innerviert. Durch den kompliziertesten Aufbau ihrer Innervationsapparate zeichnen sich die *Trolard-* und *Labbeschen* anastomotischen Venen aus. Die intramuralen Plexus sind in ihnen dichter, in den Fasernbündeln finden sich häufiger markhaltige

Achsenzylinderfortsätze, die Rezeptoren sind ausgedehnter und dichter verästelt, es lassen sich in ihnen eingekapselte Endigungen vom Typ der Vater-Pacinischen Körperchen nachweisen.

Einen zusammengesetzten und reichen Nervenapparat enthalten die Sinus durae matris, vor allem der Sinus cavernosus und der Sinus occipitalis, die im venösen Kommunikationssystem der Schädelbasis einen Knotenpunkt



Abb. 7. e – Nervenendigung in Form eines Knäulchens in der Tela chorioidea des 3. Ventrikels

darstellen. Die übrigen Abschnitte des Venensystems des Kopfes verfügen über einen relativ ärmeren Nervenapparat.

Interessant sind die Angaben über die Lokalisationsverhältnisse der Rezeptoren verschiedener Typen in den verschiedenen Venenbildungen des Kopfes. Die extrakranialen Venen haben einen Rezeptorenapparat von einfacherer Struktur, und zwar »schnurrbartförmige« und diffuse Rezeptoren. Der Rezeptorenapparat der intrakranialen Venen ist von komplizierterem Aufbau, mit diffus verzweigten, baumförmigen Rezeptoren, Knäuelchen und eingekapselten Körperchen.

Der Ursprung der Veneninnervation wurde in Tierexperimenten mittels Durchtrennung oder Exstirpation der verschiedenem Nervengebilde untersucht. Besonders in der letzten Zeit wurden durch Exstirpation des Ganglion semilunare des Nervus trigeminus, des Ganglion jugulare des Nervus vagus, nicht selten mittels Durchtrennung der Halsnerven in den Segmenten C_{I} — C_{VIII} ferner durch Markierung der Arteria carotis communis und der Vena jugularis interna mit den sie umgebenden perivasalen Nervengeflechten Untersuchungen vorgenommen.

Acta morph. tomus XIII.

228



Abb. 8. Nervenzellen in den Wänden der intrakranialen Venengebilde. (Mikrophotogramme, Objektiv 40, Okular 10). a — in der Wand des Sinus cavernosus (Präparat von S. S. MICHAILOW. Imprägnation nach Bielschowsky-Groß); b — in der Wand der Vena terminalis (Präparat von I. I. KAGAN. İmpregnation pach Campos)

Aus den Ergebnissen der durchgeführten Experimente geht hervor, daß bei der Exstirpation des Ganglion semilunare des Nervus trigeminus die markhaltigen Fasern mittleren Diameters der tiefen Gehirnvenen, im Sinus cavernosus und in den oberflächlichen Venen des Schädelgewölbes degenerieren. Die Exstirpation des Ganglion jugulare des Nervus trigeminus ging mit De-

generationserscheinungen in den oberflächlichen Gehirnvenen und im Sinus occipitalis einher.

Unsere Untersuchungen zeigten demnach, daß die Kopfvenen über einen entwickelten Nervenapparat verfügen. Die Neurorezeptorenapparate der intrakranialen Venen sind indessen von zusammengesetzterer Struktur als die extrakranialen Venen.

Die bisherigen Vorstellungen über die »spärliche« Innervation oder sogar über das vollkommene Fehlen einer Innervation in den Gehirnvenen (Stöhr, HASSIN) entsprechen daher nicht den Tatsachen.

Das Vorhandensein von afferenten Nervenapparaten in den intrakranialen Venen berechtigt uns zur Annahme einer neuralen Regulation des Gehirnkreislaufs. Vermutlich gehen von den Rezeptoren der intrakranialen Venen reflektorische Reize zum Tonus der Gehirnarterien (MICHAILOW 1959), ferner »Begleitreflexe« an andere Kreislaufsysteme aus (TSCHERNIGOWSKI 1949).

LITERATUR

Анисимова-Александрова, В. В.: (1960) Морфология ангиорецепторов твердой мозговой оболочки. Арх. анат., гист. и эмбр., № 11. - Беков, Д. Б.: (1959) Материалы по иннервации синусов твердой мозговой оболочки. Вопр. нейрохир., № 4. — Долго-Сабуров, Б. А.: (1958) Иннервация вен. Л. — Егорова, В. В.: (1959) Нервы сосудов стенок венозных пазух твердой мозговой оболочки. Арх. анат., гист. и эмбр., № 9. — Она же: (1960) Рецепторы венозных пазух твердой мозговой оболочки. Арх. анат., гист. и эмбр., № 11. — Иванов, А. И.: (1956) Иннервация передней, задней и общей лицевых вен. Проблемы морфологии нервной системы, Л. — Он же: (1959) К иннервации наружной яремной, затылочной и задней ушной вен. Арх. анат., гист. и эмбр., № 6. — Лаврентьев, Б. И.: (1948) Морфология чувствительной иннервации внутренних органов. М. — Михайлов, С. С.: (1956) Особенности строения пещеристого синуса. В кн. Нарушения кровообращения при пора-жениях головного мозга. М. — Он же: (1959) К патогенезу расстройств общего и мозго-вого кровообращения при сонно-пещеристых аневризмах. Вестн. хир., № 5. — Он же: (1961) Нервный аппарат пещеристого синуса. Арх. анат., гист. и эмбр., № 10. — Черниговский, В. Н.: (1949) К физиологии интерорецепторов. Пробл. кортико-висцеральн. патологии. М. – Hassin, G. B: (1939) The Nerve Supply of the Cerebral Blood Vessels in the Vegetative Nervous System. Baltimore. - HORNET, TH. et NISSIM, F.: (1957) Innervatia vasclor cerebrale. Nota II. Innervatia sistemuli venos al lui Galeni. Studii cerce. neurol. t. II, NI. – STÖHR, PH.: (1933) Mikroskopische Beobachtungen über die Nerven der Blutgefässe. Forsch. Med., 51. - Stöhr, Ph.: (1938) Die mikroskopische Innervation der Blutgefässe. Erg. Anat. u. Entwickl., 32.

SOME RULES GOVERNING THE AFFERENT INNERVATION OF EXTRACRANIAL AND INTRACRANIAL VEINS

S. S. MICHAILOW

The present work summarizes results obtained by a team which, under the leadership of the author, has studied the nervous apparatus of the extracranial and intracranial veins.

Innervation has been examined with the impregnation technique of BIELSCHOWSKI-GROSS and CAMPOS in the superficial and the deeper facial veins, in the veins of the paranasal sinuses, in some other sinal veins, in the superficial calvarial veins, in the meningeal veins, in the superficial and deeper cerebral veins, and in the cerebellar veins.

It has been found that the examined venous structures of the head possess a well developed nervous apparatus. The outer layer of the vessel walls contains afferent nerves composed of several bundles of fibres. These bundles form perivascular and adventitious plexuses. Single medullated and non-medullated nerve fibres form intramural nerve plexuses. The vessel walls contain also variously structured nerve-endings — uncapsulated interstitial receptors of the Vater-Pacini-corpuscle type and, finally, nerve cells and their accumulations.

The structure of the nerves under consideration varies from one venous apparatus to the other.

НЕКОТОРЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ АФФЕРЕНТНОЙ ИННЕРВАЦИИ ЭКСТРА- И ИНТРАКРАНИАЛЬНЫХ ВЕНОЗНЫХ ОБРАЗОВАНИЙ

с. с. михайлов

В статье представлено обобщение материалов исследований нервного аппарата венозных образований интра- и экстракраниального отделов головы, выполненных коллективом сотрудников под руководством автора.

Методом импрегнации по Бильшовскому—Гросс и Кампосу изучен нервный аппарат поверхностных и глубоких вен лица, вен придаточных пазух, поверхностных вен свода черепа, оболочечных вен, некоторых венозных синусов, поверхностных и глубоких вен головного мозга и вен мозжечка.

Исследования выявили, что изученные венозные образования головы обладают развитым нервным аппаратом, включающим: А) нервные проводники в наружном слое стенки вены, представленные более или менее крупными пучками нервных волокон; указанные пучки образуют перивазальное и адвентициальное сплетения; б) отдельные мякотные и безмякотные нервные волокна, формирующие в разных слоях вены интрамуральные нервные сети и нервные сплетения; в) различного строения нервные окончания (неинкапсулированные интерстициальные рецепторы с диффузным ветвлением, в виде кустиков и клубочков, инкапсулированные типа телец Фатер—Пачини); г) нервные клетки или их скопления.

Имеются существенные различия в строении нервного аппарата в зависимости от его принадлежности к отделу венозной системы.

Prof. S. S MICHAILOW, Moskau B-61. B. Tscherkizovskaja Str. 3, Korp. 1, App. 93. UdSSR



Institut für Allgemeine Tierkunde (Direktor: Prof. Dr. G. MÖDLINGER), Eötvös Loránd Universität der Wissenschaften, Budapest

DIE WIRKUNG VON ACTH UND PREDNISOLON AUF DIE FUNKTIONALE ZONATION DER NEBENNIERE BEI DER TAUBE (COLUMBA DOMESTICA)

L. KONDICS

(Eingegangen am 4. März, 1964)

1. Prednisolonbehandlung verursacht bei der Taube keinerlei Veränderungen der peripheren interrenalen Zellen, während die tiefer gelegenen Zellen atrophisieren. 2. Auf Einwirkung von 5 × 1 I. E. ACTH sind Hypertrophie und die parallel auftretende Lipoidabnahme nur in den tiefer gelegenen interrenalen Zellen zu beobachten. Bei zunehmenden ACTH-Mengen hypertrophisieren auch die peripheren interrenalen Zellen, wobei die Sudanophilie gleichzeitig abnimmt und dann aufhört.

3. Auf Grund obiger Feststellungen ist Verfasser der Meinung, daß bei Vögeln in erster Reihe die tiefer gelegene, wahrscheinlich Glucocorticoide produzierende Zone durch ACTH gesteuert wird, während die periphere, wahrscheinlich Mineralocorticoide produzierende Zone – ähnlich der Zona glomerulosa der Nebenniere bei Säugern – auch von anderen Faktoren beeinflußt wird.

In der Nebenniere der Vögel - bis auf den braunen Pelikan (Pelicanus occidentalis) - bilden die interrenalen Zellstränge, welche der Rindensubstanz der Säugernebenniere entsprechen, keine histologisch sicher unterscheidbaren Zonen [6]. Da jedoch die Nebenniere bei Vögeln ähnliche Hormone produziert wie bei den Säugern [12, 13], schienen Untersuchungen über eine mögliche funktionale Zonation der interrenalen Zellen als wünschenswert. Wir konnten nachweisen, daß eine kochsalzreiche Diät zur Atrophie der peripheren, und Hypertrophie der tiefer gelegenen interrenalen Zellen führt [8], welche also in funktionaler Hinsicht unterschiedlich sind. Die durch Kochsalzbelastung bedingten Veränderungen in der Nebenniere der Haustaube stimmen mit denselben der Ratte überein; deshalb glauben wir, daß der periphere Teil der Vogelnebenniere — ähnlich der Zona glomerulosa der Säuger -Mineralocorticoide, während die tiefer gelegenen interrenalen Zellen Glucocorticoide produzieren. Die durch Dehydration hervorgerufene Hypertrophie betrifft in erster Reihe die tiefer gelegenen Zellen (9): wieder ein Beweis, daß die interrenalen Zellen der Vogelnebenniere in funktionaler Hinsicht von vornherein differenziert sind. Auch die Untersuchungen von SINHA und GHOSH [14] unterstüzten diese Annahme, da sie deutliche histochemische Unterschiede zwischen den peripheren bzw. den tiefer gelegenen interrenalen Zellen der Taube nachweisen konnten.

Auf Grund des Gesagten schien es interessant zu untersuchen, welche Wirkungen das ACTH und ein die ACTH-Produktion stark unterdrückendes Glucocorticoid, z.B. Prednisolon, auf die interrenalen Zellen der Vogelnebenniere ausüben.

L. KONDICS

Material und Methode

6 keimreife Taubenweibchen erhielten täglich 2,5 mg Prednisolon peroral während 30 Tagen. Einer zweiten Gruppe von ebenfalls 6 Taubenweibchen spritzten wir in den Pectoralis täglich 5 I. E. ACTH (»Exacthin«, Richter, Budapest), insgesamt 8mal. Die Zahl der Kontrolltauben betrug 6. Die Versuche wurden im August 1963 durchgeführt. Die Tiere wurden durch Dekapitation getötet und die eine Nebenniere in Bouin-, die andere in 6% iger Formalinlösung fixiert. Färbung mit Hämatoxylin-Eosin bzw. Lipoidnachweis mit Sudanrot-7 B an Gefrierschnitten. Die Bestimmung des Kernvolumens in den peripheren und tiefer gelegenen interre-

nalen Zellen erfolgte durch das Nomogramm von FISCHER-INKE, auf Grund der Formel 🙃

LB², unter 3000facher Projektionsvergrößerung. Nach Auswertung des Versuches, im Januar 1964, wurden dann 1, 2, 5 bzw. 5 I. E. ACTH je fünfmal in den Pectoralis von 3×4 Taubenweibchen gespritzt; die Zahl der Kontrolltiere betrug ebenfalls 4. Das Material wurde auf die geschilderte Weise aufgearbeitet.

Ergebnisse

Sudanophilie. Bei den Kontrolltieren gibt es keinen wesentlichen Unterschied zwischen dem Lipoidgehalt der peripheren bzw. der tiefer gelegenen interrenalen Zellen (Abb. 1). Nach Prednisolonbehandlung konnten wir keine Änderung des Lipoidgehaltes in den Zellen feststellen. Auf die Einwirkung von ACTH nimmt der Lipoidgehalt der tiefer gelegenen interrenalen Zellen beträchtlich ab, während diese Abnahme in den peripheren Zellen nur geringfügig ist (Abb. 2.). Nach Gaben von $5 \times 2,5$ I. E. ACTH sind nur Spuren von Lipoiden in den tiefer gelegenen interrenalen Zellen nachzuweisen, die Sudanophilie der peripheren Zone ist dabei noch immer deutlich (Abb. 3). Durch die Einwirkung von 8×5 bzw. 5×5 I. E. ACTH werden die lipoidhaltigen Stoffe auch aus den peripheren Zellen entfernt (Abb. 4).

Kernvolumen. Prednisolonbehandlung bedingt keine Änderung des Kernvolumens in den peripheren Zellen, in den tiefer gelegenen interrenalen Zellen kommt hingegen eine beträchtliche Verminderung des Kernvolumens zustande (Abb. 5.). Nach 1 I. E. ACTH kann in den peripheren interrenalen Zellen praktisch keine Kernvolumenzunahme beobachtet werden, demgegenüber ist die Hypertrophie in den tieferen Zonen recht ausgeprägt (Abb. 6). Auf Wirkung von 2,5 und noch eher von 5 I.E. ACTH hypertrophisirt auch die periphere Zone. Die Änderungen des Kernvolumens gehen im wesentlichen mit dem Lipoidbild parallel einher.

Besprechung

Laut KNOUFF und HARTMANN [6] bilden die interrenalen Zellen in der Nebenniere des braunen Pelikans drei Zonen, ähnlich der Nebenniere der Säuger. Später haben dieselben Verfasser festgestellt, daß der am meisten aktivierbare Teil der Pelikannebenniere der periphere ist [5], und somit die in der



Abb. 1. Columba domestica. Kontrolle; Nebenniere. Gefrierschnitt, Sudanrot 7B-Färbung. Vergr. 150 \times Abb. 2. Columba domestica. 5 \times 1 I. E. ACTH; Nebenniere. Gefrierschnitt, Sudanrot 7B-Färbung. Vergr. 150 \times

Vogelnebenniere nachweisbaren Zonen in funktionaler Hinsicht nicht den 3 Zonen der Mammaliennebenniere entsprechen. Wir fanden, daß ausnahmsweise auch in den Nebennieren von unbehandelten Tauben wenigstens zwei

4

Acta morph. tomus X111.



Abb. 3. Columba domestica. 5 × 2,5 I. E. ACTH; Nebenniere. Gefrierschnitt, Sudanrot 7B-Färbung. Vergr. 150 ×
 Abb. 4. Columba domestica. 5 × 5 I. E. ACTH; Nebenniere. Gefrierschnitt, Sudanrot 7B-Färbung. Vergr. 150 ×

Zonen nachweisbar sind [7,8]. Zur Erklärung nahmen wir an, daß die interrenalen Zellen auch bei Vögeln eine funktionale Gliederung aufweisen, die aber nur dann morphologisch zum Ausdruck kommt, wenn extreme Abweichungen in der Funktion der einzelnen Zonen auftreten. So ist es bei kochsalzreicher



Abb. 5. Wirkung von ACTH und Prednisolon auf die peripheren und die tiefer gelegenen interrenalen Zellen, auf Grund der Bestimmung des Kernvolumens an je 100 Zellen pro Nebenniere und Zone. Erster Versuch

Diät in den peripheren interrenalen Zellen Atrophie, in den tiefer gelegenen Hypertrophie zu beobachten [7, 8]. Auf Grund dieser Beobachtung sind wir der Meinung, daß die peripheren interrenalen Zellen wahrscheinlich Mineralocorticoide und die tiefer gelegenen Glucocorticoide produzieren.

Bei Prednisolonbehandlung ist in den peripheren interrenalen Zellen keine Veränderung zu beobachten, während die tiefer gelegenen atrophisieren. Wir dürfen annehmen, daß das Prednisolon durch Rückdrängung des ACTH seine Wirkung auf die tiefer gelegenen Zellstränge ausübt; andererseits führen kleinere Dosen von ACTH zunächst in den tiefer gelegenen Zellen zur Hypertrophie bzw. Lipoidmobilisation. Es geht aus diesen Untersuchungen klar hervor, daß in der Vogelnebenniere vor allem die tiefer liegende Zone unter Steuerung des ACTH steht, auf die periphere Zone jedoch, ähnlich der zona glomerulosa der Säugernebenniere, auch andere Faktoren einwirken.

4*

237



Abb. 6. Wirkung von ACTH in verschiedenen Dosen auf die peripheren und die tiefer gelegenen interrenalen Zellen auf Grund der Bestimmung des Kernvolumens an je 100 Zellen pro Nebenniere und Zone, Zweiter Versuch

Die hypophysäre Steuerung der Vogelnebenniere ist übrigens ziemlich problematisch. Laut Untersuchungen mehrerer Autoren sind nämlich keine wesentlichen Veränderungen in der Vogelnebenniere nach Hypophysektomie zu beobachten [1, 3, 11]. Einige Verfasser sind daher der Meinung, daß die Funktion der Vogelnebenniere von der Hypophyse unabhängig sei. Die

jüngsten Versuche von NAGRA u. Mitarb. [10] konnten diese Annahme nicht bestätigen, da bei Hühnern und Fasanen der Corticosteroidspiegel des aus der Nebennierenvene abfließenden Blutes nach Hypophysektomie um 40% niedriger ist, als bei den Kontrolltieren, und die Nebennieren auch an Gewicht abnehmen.

Obwohl laut unserer bisherigen Untersuchungen die Entstehung von Mineralocorticoiden in den peripheren interrenalen Zellen anzunehmen ist, kann diese Zone nicht ohne weiteres mit der zona glomerulosa der Nebenniere der Säuger gleichgestellt werden. Unsere soeben abgeschlossenen Untersuchungen zeigen nämlich, daß durch chronische Kaliumbelastung keine solche Hypertrophie der peripheren Zone der Taubennebenniere wie bei Säugern hervorgerufen wird, ja es kommt sogar zu einer leichten Linksverschiebung der Kernvolumenkurve. Daraus folgt aber daß die durch die peripheren interrenalen Zellen synthetisierten Hormone, neben ihrem intensiven Einfluß auf die Na-Retention, auch eine geringfügige K-Retention bewirken. Da die Mineralocorticoide, laut unserer bisherigen Untersuchungen, sich bei Vögeln wahrscheinlich in der peripheren Zone bilden, dürfte es angenommen werden, daß das Aldosteron bei Vögeln, im Gegensatz zu den Säugern, eine gerinfügige K Retention zustande bringt, und dies würde dann die mäßige Linksverschiebung der Kernvolumenkurve nach K-Belastung erklären. Diese Annahme erfährt eine Unterstützung durch die Versuche von BROWN u. Mitarb., die bei Vögeln eine geringe K-Retention durch DOCA fanden [2]; eine ähnliche Wirkung des Aldosterons scheint ebenfalls möglich zu sein.

LITERATUR

1. BAUM, G. J., MEYER, R. K.: (1956) Influence of Diethylstilbestrol on Lipids in Intact and Hypophysectomized Cockerels. Endocrinology 58, 338. - 2. BROWN, K. I., BROWN, D. J., MEYER, R. K.: (1958) Effect of Surgical Trauma, ACTH and Adrenal Cortical Hormones on Electrolytes, Water Balance and Gluconeogenesis in Male Chickens. Amer. J. Physiol. 192, 43. - 3. ELTON, R. L., ZARROW, I. G., ZARROW, M. X.: (1959) Depletion of Adrenal Ascorbic Acid and Cholesterol: A Comparative Study. Endocrinology 65, 152. - 4. FISCHER, J., INKE, G.: (1956) Nomogramme zur Berechnung des Kernvolumens. Acta morph. Acad. Sci. hung. 7, 141. – 5. HARTMAN, R. A., KNOUFF, R. A., HOWARD, G. A.: (1954) Response of the Pelican Adrenal to Various Stimuli, Anat. Rec. 120, 469. - 6. KNOUFF, R. A., HARTMAN, F. A.: (1951) A Microscopic Study of the Adrenal of the Brown Pelican. Anat. Rec. 109, 161. - 7. KONDICS, L.: (1963) Adrenal Zone Controlling Mineral Metabolism in the Pigeon. Acta biol. Acad. Sci. Suppl. 5, 48. - 8. KONDICS, L.: (1963) Über die Wirkung des Kochsalzes auf die interrenalen Zellen der Nebenniere bei Haustauben. Ann. Univ. Sci. Rolando Eötvös nom. Sect. Biol. 6, 101. 9. KONDICS, L.: (Im Druck) Über die Wirkung von Dehydration auf die funktionelle Zonation der Nebenniere bei Haustauben. Ann. Univ. Sci. Rolando Eötvös nom. Sect. Biol. 7. 10. NAGRA, C. L., BIRNIE, J. G., BAUM, G. J., MEYER, R. K.: (1963) The Role of the Pituitary in Regulating Steroid Secretion by the Avian Adrenal. Gen. comp. Endocr. 3, 274. - 11. NEWCOMER, W. S.: (1959) Effects of Hypophysectomy on Some Functional Aspects of the Domestic Pigeon. Endocrinology 65, 133. - 12. Roos, R.: (1960) In Vitro Production of Corticosteroids by Chicken Adrenals. Endocrinology 67, 719. - 13. Roos, R.: (1961) The Corticoids of the Avian Adrenal Gland. Gen. comp. Endocr. 1, 494. - 14. SINHA, D., GHOSH, A.: (1961) Some Aspects of Adrenocortical Cytochemistry in the Domestic Pigeon. Endokrinologie, 40, 270.

L. KONDICS

EFFECT OF ACTH AND PREDNISOLONE ON THE FUNCTIONAL ZONATION OF THE ADRENAL GLAND IN THE PIGEON (COLUMBA DOMESTICA)

L. KONDICS

(1) Prednisolone, administered to pigeons, leaves the peripheral interrenal cells unchanged, but induces atrophy in the deeper cells.

(2) Hypertrophy and a synchronous diminution of lipids occur only in the interrenal cells of the deeper layers after the administration of 5×1 units of ACTH. Increasing doses of ACTH cause hypertrophy also in the peripheral interrenat cells; sudanophilia gradually diminishes and then disappears.

(3) It is suggested that, in birds, chiefly the deeper layer is governed by ACTH, *i.e.* the layer in which the synthesis of glucocorticoids is supposed to take place, whereas — as is the case in the zona glomerulosa of the mammalian adrenal — also other factors affect the peripheral zone where mineralocorticoids are supposedly produced.

ДЕЙСТВИЕ АКТГ И ПРЕДНИЗОЛОНА НА ФУНКЦИЮ ЗОН НАДПОЧЕЧНИКОВ ГОЛУБЯ (COLUMBA DOMESTICA)

л. қондич

1. Под влиянием воздействия преднизолона у голубя периферические интерренальные клетки остаются неизмененными, а более глубоко расположенные атрофируют.

2. Под влиянием 5×1 межд. ед. АКТГ гипертрофия и параллельно с этим уменьшение содержания липоидов наблюдается только в глубже расположенных интерренальных клетках. Увеличивая количество АКТГ наступает гипертрофия также и периферических интерренальных клеток и параллельно с этим суданофилия уменьшается и затем прекращается.

3. На основании вышесказанного автор считает что у птиц под контролем АКТГ находится в первую очередь более глубоко расположенная, вероятно производящая гликокортикоиды зона, в то время как на периферическую зону, вероятно производящую минералокортикоиды действуют — наподобие клубочковой зоны надпочечников млекопитающих — и другие факторы.

L. KONDICS, Budapest VIII. Puskin u. 3. Ungarn

Institute of Pathology (Director: Prof. Dr. Gy. ROMHÁNYI), University Medical School, Pécs

ANISOTROPIC STAINING OF MAST CELL GRANULES

ESZTER GYENGE, I. ORBÁN and JUDIT NAGY

(Received March 10, 1964)

Polarization optical and histochemical as well as quantitative tests have been carried out to study the liberation of heparin present in mast cell granules, presumably bound to protein. The findings seemed to indicate that in the granules the heparin is arranged in a submicroscopically ordered pattern. Once the heparin-protein binding has been broken up by digestion with trypsin or by drying, the anisotropic staining of the granules becomes more pronounced.

The granules of rat mast cells and mast cell tumours (mastocytomas) contain a variety of important biologic substances (heparin, histamine, 5-hydroxy-tryptamine [7,9,1] which occur either in bound form (heparin) or in a preformed state (histamine, serotonin) [2, 4, 12].

It has been suggested by several observations that the heparin stored in mast cell granules is bound to protein. Studies carried out at this institute and confirmed by submicroscopic morphological and polarization optical tests [5, 6] have established the presence of a component anisotropic with toluidine blue and appearing histochemically as heparin or a heparin-like substance.

The purpose of the present investigations was to establish whether certain unmasking procedures (proteolytic enzyme treatment, drying, lyophilization) influence the anisotropic staining of mast cells, the bound state of heparin. The studies were made partly with histochemical and polarization optical, partly with quantitative methods. The various unmasking treatments, while causing changes in the heparin binding, were found to increase the anisotropic staining of the granules. The results of quantitative heparin tests seemed to confirm the microscopic findings.

Methods

Unfixed native preparations from rat tongue, mesentery and subcutaneous connective tissue as well as frozen or paraffin sections of formalin-fixed tongue were examined.

Anisotropic staining was done with the precipitation method [10], using 0.1-0.001 per cent solutions of toluidine blue (HOYER), methylene blue (GRÜBLER), neutral red (GRÜBLER), acridine orange and pyronin, in citrate-hydrochloric acid buffer at pH 1.5 to 3.6. For precipitation potassium ferricyanide, potassium bichromate, potassium rhodanide and potassium iodide were used. Of these we always selected the one which in previous experiments was found to be the most effective connection with the particular dye (e.g. potassium ferricyanide with toluidine blue and neutral red; potassium rhodanide with methylene blue [13]).

The unfixed film preparations and frozen sections were stained immediately or after drying at 20° C or 50° C. Formalin-fixed paraffin sections were subjected to digestion for 1 to 3 hours at 37° C by a 0.2 per cent trypsin solution in pH 7.6 phosphate buffer.

To determine the amount of heparin liberated in response to various influences, quantitative tests were performed on mast cell tumour tissues (Furth mastocytoma) [3]. The tumour which has been transplanted serially in this institute since 1961 by intramuscular injection of the tumour cell suspension [8], grows intramuscularly, shows a minimum of necrosis and measures 10 to 20 mm in diameter. Fractions of the tumour were ground in a Potter homogenizer and suspended in distilled water at a concentration of 100 mg per ml. Some of the homogenates were subjected to digestion with 0.5 ml of a 0.2 per cent trypsin solution in a pH 7.6 phosphate buffer, for 3 hours at 37° C. As a control, homogenates from the same tumour were used, kept under identical conditions (3 hours, 37° C), except that trypsin was absent from the buffer.

In another series of experiments, aimed at testing the effect of drying, the tumours were removed, weighed, cut into sections, and dried at $+50^{\circ}$ C under an infrared lamp, at $+20^{\circ}$ C with a fan, or at -30° C by lyophilization. Following treatment, the material was homogenized in distilled water. Tumour slices kept in distilled water at $+50^{\circ}$ C or $+20^{\circ}$ C without previous drying or at -30° C without lyophilization were used for control purposes.

The heparin content of the homogenates was determined on the basis of the coagulation period 38° C of recalcified rabbit plasma [3], adjusting the system with the "Liquemin" (Roche) heparin preparation as a standard.

Results

1. Anisotropic staining of mast cells

The mast cells did not present anisotropy in native, unfixed cryostat sections, fresh film preparations or formalin-fixed unstained sections. When staining the same sections with a basic dye (toluidine blue, methylene blue, neutral red, etc.), the mast cell granules, depending on whether they were subjected to precipitation or examined under the polarization microscope, show metachromasia and anisotropy, respectively. The intensity of anisotropy depended on the particular kind of dye and the precipitating substance employed. They showed the most intensive anisotropy on dyeing with methylene blue at low concentration (0.001 per cent) and precipitation with potassium rhodanide (Fig. 1).

As regards the intensity of anisotropic staining under the influence of (a) drying and (b) trypsin digestion the following have been found.

(a) in native film preparations the mast cell granules stained weakly; they showed no reaction to treatment with dilute dyes (toluidine blue, methylene blue); more concentrated solutions revealed a minimum degree of double refraction. An intensive anisotropic effect was obtained in film preparations exposed to rapid drying at 20° C or under an infrared radiator at 50° C (Fig. 2). The same kind of response was noted in unfixed frozen sections following fast drying.

(b) Trypsin treatment of formalin-fixed and of unfixed frozen sections induced considerable changes in the structure of the mast cells which became wrotten, disrupted and dispersed granules were seen around them. The disrupted cells and the granules showed more intensive anisotropy than sections stained the same way without subsequent trypsin treatment (Fig. 3).



Fig. I. Rat tongue, embedded in paraffin, fixed in formalin. Methylene blue (0.001 per cent, pH 1.5). Appr. $\times~130$

a) Seen under the light microscope. Mast cells stain selectively. b) The same under the polarization microscope with crossed polaroids. Intensively anisotropic mast cells located amidst double refractive striated muscle fibres

Fig. 2. Rat mesentery. Film preparation. Toluidine blue (0.01 per cent, pH 1.5). Polarization picture. Appr. $\times 250$ a) Fresh native specimen; mast cells (marked by arrows) hardly visible. b) Specimen dried

a) Fresh native specimen; mast cells (marked by arrows) hardly visible. b) Specimen dried prior to staining. Compared with control specimen (a), the mast cell granules present intensive double refraction

243



Fig. 3. Rat tongue, fixed in formalin, embedded in paraffin. Trypsin treatment, toluidine blue (0.01 per cent, pH 1.5) seen under polarization microscope with crossed polaroids. Intensively anisotropic mast cell granules amidst collagen fibres showing moderate double refraction. Swollen, disrupted cells. Muscle fibres digested, invisible. Appr. \times 250

Fig. 4. Rat marrow fixed in formalin, embedded in Araldite, non-contrasted picture a) Part of mast cell. Compact granule structure. b) Peripheral part of the same specimen. Compared to the former normal picture, some granules are enlarged, with loose structure

2. Quantitative tests

In mastocytomas homogenized with distilled water or a pH 7.6 buffer or isotonic sucrose solution, heparin was found to occur in negligible quantities
(5-20 IU/g wet tissue) while heparin was abundantly liberated from the mast cells on trypsin digestion (see Table I). Drying at various temperatures released less heparin (Table I).

Table I

Heparin quantity obtainable by extraction from mastocytomas, after trypsin treatment, drying at different temperatures and after lyophilization

In the first horizontal line the number of tumorous animals is shown. Heparin values are given in terms of international units, as referred to 1 g of wet tissue

No.		841	858	860	878	898	926
In dist. water	(+37 C°)	17	28	9	7	20	23
Treated with trypsin		447	1729	1387	1231		1298
In dist. water	$(+20 \text{ C}^{\circ})$		15	16		40	
Dried	$(+20 \ \mathrm{C}^\circ)$	-	29	91		83	
In dist. water	$(+50 \text{ C}^{\circ})$	238	454	333		735	
Dried	$(+50 \text{ C}^{\circ})$	166	232	850		507	
Freeze-dried	(-30 C°)				30		19
Frozen	(—30 C°)	-			8		22

Discussion

Polarization optical tests have revealed that mast cells show anisotropy when stained with certain basic dyes. The phenomenon has been attributed to an oriented process of dye adsorption, caused by a substance of oriented submicroscopic structure [10], namely the heparin present in the granules. This seems also to be borne out by the experience that certain basic dyes, *e.g.* toluidine blue, cause the heparin to precipitate from solution in the form of doubly refractive filaments [11].

According to some authors [2], heparin is bound to protein in the mast cell granules. This has been confirmed by our observation that anisotropy became more intense on trypsin digestion. In this case namely certain protein components are lysed which in the mast cell granules had bound the heparin and unmasked its oriented submicroscopic structure. A further proof has been obtained from the quantitative tests which showed a considerable increase of the heparin yield upon preliminary treatment with trypsin.

In contradiction to previous observations [5, 6] which indicated that the anisotropic staining was due to a lipoprotein material in the intergranular substance, our own studies, especially those performed on degranulated cells, showed the effect to be confined to the granules themselves. The same conclusion has been drawn from the finding that in mastocytomas the heparin was found to be present in the granules isolated from the tumour [4].

In dried film preparations and frozen sections, the increase of anisotropy was probably due to the destruction of cells or the disintegration of their structure under physical influences to which they are most susceptible although in quantitative tests much less heparin was found to have been liberated on drying than on trypsin treatment.

Electron microscopic test have also pointed to the sensitivity of mast cell granules to various physical influences. In sections from one and the same material there were well preserved granules side by side with enlarged ones displaying a loose structure (Fig. 4.) This also shows that the cells may be damaged in the course of fixation and embedding.

Acknowledgement

We are indebted to Dr. I. Kétyi of the Institute of Microbiology, University Medical School, Pécs, for the lyophilizations.

REFERENCES

1. ВЕНДІТТ, Е. Р., WONG, R. L., ARASE, M., ROEPER, E.: (1955) Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 90, 303. – 2. ВЕНДІТТ, Е. Р., ARASE, M.: (1959) J. exp. Med. 110, 451. – 3. FURTH, J., HAGEN, P., HIRSCH, E. I.: (1957) Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 95, 824. – 4. HAGEN, P.: (1961) Canad. J. Biochem. 39, 639. – 5. HORVÁTH, L.: (1959) Acta morph. Acad. Sci. hung. 9, 35. – 6. HORVÁTH, L.: (1959) Acta Morph. Acad. Sci. hung. 9, 79. – 7. JORPES, J. E.: (1946) Heparin in the Treatment of Thrombosis. 2nd ed. Oxford Univ. Press, New York, P. 60. – 8. KELÉNYI G., GógL A.: (1963) Morph. és Ig. Orv. Szemle 3, 270. – 9. RILEY, J. F., West, G. B.: (1953) J. Physiol. (Lond) 120, 528. – 10. ROMHÁNYI, GY.: (1963) Acta histochem. (Jena) 15, 201.–11. ROMHÁNYI, GY.: Personal Communication. – 12. SCHAYER, R. W.: (1959) Fed. Proc. 18, 544. – 13. ROMHÁNYI, GY.: Personal Communication.

ÜBER DIE ANISOTROPE FÄRBBARKEIT DER MASTZELLGRANULA

ESZTER GYENGE, I. ORBÁN und JUDIT NAGY

Verff. untersuchten die Möglichkeit der Freimachung des Heparins, das in den Granula der Mastzellen wahrscheinlich an Eiweiß gebunden vorhanden ist. Die Untersuchungen wurden durch qualitative — polarisationsoptische, histochemische — sowie quantitative Methoden ausgeführt. Die Beobachtungen verweisen auf ein Vorhandensein des Heparins in den Granula in einer submikroskopisch geordneten Form. Die Auflösung der Bindung zwischen Heparin und Eiweiß durch Trypsineinwirkung sowie durch verschiedene Eintrocknenverfahren bringt die anisotrope Färbung der Granula deutlicher hervor.

ОБ АНИЗОТРОПНОЙ ОКРАШИВАЕМОСТИ ЗЕРНЫШЕК ТУЧНЫХ КЛЕТОК

Э. ДЬЕНГЕ, И. ОРВАН и Ю. НАДЬ

Авторы исследовали вопрос освобождаемости гепарина, вероятно имеющегося в связанном виде в зернышках тучных клеток. Исследование проводилось количественно поляризационными оптическими, гистохимическими, а также количественными методами. Их наблюдения указывают на то, что гепарин присутствует в зернышках в субмикроскопической форме и при разрушении комплекса белок-гепарин трипсиновым геревариванием, а также различными видами высушивания анизотропная окраска зернышек становится более выраженной.

Eszter Gyenge Dr. I. Orbán Judit Nagy

METAPHOSPHORIC ACID REACTION OF NUCLEOPROTEINS

K. Jobst

(Received April 22, 1964)

The metaphosphoric acid reaction has been used for the blocking of the reactive groups of basic nucleoproteins. The conditions of the reaction were determined on the basis of cytophotometric observation. Reversibility and specificity of the reaction are discussed.

In the cell nuclei, DNA and histone are usually demonstrated by means of the Feulgen reaction, and by staining with fast green (pH = 8.1), respectively [4]. It is still an open question whether in histological material these methods satisfy stoichiometric requirements. The results of cytophotometric determinations are, therefore, not suitable for comparison, and the amounts of DNA and of histone in the nucleus are expressed by the ratio of the respective values yielded by the Feulgen and the fast green reactions [1]. An attempt has, therefore, been made to demonstrate both the nucleic acid and the histone contents by means of the same positively-charged stain. Such a method cannot be suitable for quantitative purposes unless (1) the molecules of the dye are stoichiometrically bound by the phosphate groups of DNA; (2) the reagent satisfies certain other requirements specified below.

ad (1). Recent investigations have shown [8] that gallocyanin-chromalum meets the said requirement.

ad (2). Besides blocking the positive radicals of the histone-proteins, the reagent to be found had to impart a predetermined negative charge to the same basic groups of the proteins, thus also making the histones stainable by basic dyes. A procedure of this nature could be expected to allow the original amount of proteins to be computed by comparing the amount of dye before and after the process of blockage.

The present paper reports on our attempt to attain the above objective by means of metaphosphoric acid (MPA).

SCHÖNFIELD [9] was the first to suggest that a strong bond might be formed between the protein-precipitating MPA and the basic groups of the proteins. Quantitative data on this reaction were obtained by PERLMANN and HERRMANN [6], who found that MPA combined stoichiometrically and formed a complex with the amino-guanidino group of proteins [3, 5]. This property has been made use of in the present experiments.

It has been found that in histological preparations MPA reacts with the basic groups of the nucleoproteins, thus allowing the proteins to be demonstrated with positive stains.

Smears of calf thymus, fixed for 60 min. in 96 per cent ethanol, were used. Three series of experiments were carried out in order to study the following problems.

(1) Experimental conditions of the MPA reaction. The smears were treated with 0.1 N and with 1.0 N solution of MPA (acidum metaphosphoricum

pss. in bacillis, Light, England) at room temperature (22° C) for 10 and 60 min., respectively. The preparations were then washed in distilled water three times for one minute each, in other experiments with tapwater for 30 min., and, after rinsing, stained with gallocyanin-chromalum, together with the untreated controls [8].

(2) Reversibility of the reaction. Smears treated with an 0.1 N solution of MPA for 60 min. and washed with distilled water three times for one minute, were kept in 1 M saline for 30 min., washed once more with distilled water and stained with gallocyanin-chromalum.

(3) Specificity of the reaction. After extraction with trichloroacetic acid (TCA) according to ALFERT and GESCHWIND [1], the smears were treated with 0.1 N MPA for 60 min., washed three times for 1 min., and stained with fast green (pH 8.1).

Colour intensity was determined by means of a modified Lison cytophotometer (at 500 m μ for gallocyanin-chromalum, and 600 m μ for fast green) [2]. The results were expressed in arbitrary units (AU = mean value of extinction multiplied by μ^2 of cell surface).

It is evident from Table 1 that the increase in basophilia of the nuclei pretreated with concentrated MPA for 10 min. was approximately equal to

trary uni	ts (AU)	
	0.1 N MPA + + gallocyanin- chromalum	N/1 MPA + + gallocyanin- chromalum
	arbitrar	y units
10 min. MPA + 3×1 min. H ₂ O	14.3	15.5
$10 \operatorname{min.} \operatorname{MPA} + 30 \operatorname{min.} \operatorname{H_2O}$	13.8	15.2
$\begin{array}{l} 60 \hspace{0.1 cm} \text{min. MPA} + 3 \times 1 \\ \text{min. H}_{2} 0 \end{array}$	15.4	15.2
60 min. MPA + 30 min. min. H_2O	15.1	15.0
Untreated controls		7.9

Thymocytes treated with different concentrations of metaphosphoric acid (MPA) Uptake of gallocyanin-chromalum as determined cytophotometrically and expressed in arbitrary units (AU)

Table 1

that of preparations treated with a 0.1 N solution of MPA for 60 min. Since the result did not seem to depend on MPA concentration, and because MPA shows poor solubility and, in solution, partly turns into orthophosphoric acid, it seemed advisable to use 0.1 N MPA in the rest of the experiments, in which the following procedure was adopted: alcoholic fixation for 60 min.; treatment with MPA for 60 min.; rising with distilled water, three times for 1 min.; stain-

Acta morph. tomus XIII.

248

ing. It should be noted that no reaction was obtained when 0.1 N orthophosphoric acid or polymetaphosphate was used instead of MPA.

The reversibility of the reaction was proved by the fact that the initial values (i.e. values equal to those of the untreated controls) were almost fully recovered in the course of after-treatment with molar NaCl:

Untreated controls	7.9 AU
0.1 N MPA	15.4 AU
1.0 N MPA $+$ 1.0 M NaCl	8.3 AU

Specificity was studied in the third group of experiments. Considering that the nuclei extracted with TCA and treated with MPA were left practically unstained by fast green, it is safe to assume that MPA reacted primarily with the basic amino-guanidino groups.

The present investigations do not justify more than the statement that the reactive positive radicals of the basic nucleoproteins can successfully be blocked by means of MPA. Only further experiments can show whether and how far the observed increase in basophilia can be utilized for a quantitative determination of nucleoproteins. Investigations to ascertain the effect of different fixatives and enzymes on the reaction and also on the behaviour of pathologic nuclei are in progress.

REFERENCES

1. ALFERT, M., GESCHWIND, I. I.: (1953) Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **39**, 991. – 2. JOBST, K.: (In press). Acta morph. Acad. Sci. hung. – 3. HERRMANN, H., PERLMANN, G.: (1937) Nature (Lond.) **140**, 807. – 4. PEARSE, A. G.: (1960) Histochemistry. Churchill, London. – 5. PERLMANN, G.: (1938) Biochem. J. **32**, 931. – 6. PERLMANN, G., HERRMANN, H.: (1938) **32**, 926. – 7. REMY, H.: (1960) Lehrbuch der anorganischen Chemie. Vol. I. Akademie Verlag, Leipzig. – 8. SANDRITTER, W., KIEFER, G., RICK, W.: (1963) Histochemie. **3**, 315. – 9. SCHÖNFIELD cit. by PERLMANN and HERRMANN (6).

DIE REAKTION DER NUKLEOPROTEIDE MIT METAPHOSPHORSÄURE

K. JOBST

Zur Blockierung der reaktiven Gruppen von basischen Nukleoproteiden wurde die Metaphosphorsäurereaktion angewandt. Die optimalen Versuchsbedingungen wurden anhand zytophotometrischer Angaben bestimmt. Reversibilität und Spezifität der Reaktion werden erörtert.

РЕАКЦИЯ НУКЛЕОПРОТЕИДОВ С МЕТАФОСФОРНОЙ КИСЛОТОЙ

К. ЙОБСТ

Автор применял для блокпрования реактивных групп основных нуклеопротендов реакцию с метафосфорной кислотой. Оптимальные экспериментальные условия реакции определялись цитофотометрическим способом. Сообщаются данные относительно обратимости и специфичности реакции.

Dr. K. JOBST, Pécs, Kórbonctani Intézet, Hungary



Institute of Physiology (Director: Prof. Dr. K. LISSÁK), University Medical School, Pécs

COMBINED STAINING OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM TISSUE WITH LUXOL FAST BLUE AND BASIC FUCHSIN

I. Szabó

(Received April 26, 1964)

A simplified form of Klüver and Barrera's staining method for paraffin sections is described.

0.0125 per cent luxol fast blue, 0.01 per cent sodium hydroxide and basic fuchsin are recommended for staining and differentiating myelin sheaths and as a counterstain for cells, respectively. Both dyes can be selectively removed, and restaining is possible.

Luxol fast blue stains myelin sheaths and the internal elastic membrane of the vessels blue, red blood cells in the vessels green. Nissl material stains a brilliant red with basic fuchsin, the nuclei and some cytoplasm of the neuroglia, the media and endothelium of blood vessels stain pink.

The technique is well suited for the histological verification of placement of intracerebral electrodes and lesions.

Histological verification of placement of intracerebral electrodes and lesions is an important requirement in research of the central nervous system. Cell staining (Nissl), the most frequently used method, often necessitates a complementary staining (WEIGERT, SPIELMEYER, etc.) for nervous pathways. Therefore, the requirements of neurophysiological work would most satisfactorily be fulfilled by a combined staining of both cells and fibres.

In the present paper a simplified version of the extensively used technique introduced by KLÜVER and BARRERA [1] is described.

Materials and method

The animal's brain is fixed in 10 per cent neutral saline formalin. After one to three weeks fixation the tissue is washed with distilled water, dehydrated, cleared, embedded in paraffin, then sections 15-20 microns thick are cut.

Stock solutions

I. Luxol fast blue solution (LOCKARD and REERS [2])	
Luxol fast blue MBSN*	$0.25~\mathrm{g}$
10 per cent acetic acid	20 ml
95 per cent ethylalcohol	380 ml
Dissolve the luxol fast blue in acetic acid, add alcohol, stir and	filter.

II. 1 per cent sodium hydroxide solution in distilled water.

* Obtained from Organic Chemicals Dept., Dyes & Chemicals Division, E. L. Du Pont de Nemours & Co. Inc., Wilmington, Delaware, U. S. A.

I. SZABÓ

III.	Ziehl's fuchsin		
	basic fuchsin	1	g
	phenol	5	g
	95 per cent alcohol	10	m
	distilled water	100	m
IV.	Formalin solution for differentiation		
	40 per cent formalin	1	n
	glacial acetic acid	1	n
	distilled water	100	n

Staining procedure

1. Deparaffinize sections in the usual manner

2. Stain 2 hrs at 56 °C then 30 mins at room temperature in diluted luxol fast blue (Stock solution I diluted 1:4 with 95 per cent alcohol)

3. Rinse in 95 per cent alcohol to wash off excess dye

4. Differentiate in diluted sodium hydroxide solution No. II (1 ml of 1 per cent sodium hydroxide is added to 100 ml distilled water) until myelin picture is well developed (5 to 10 minutes)

5. Wash in distilled water for 1 min or longer

6. Stain 3-4 minutes with diluted Ziehl's fuchsin (2.5 ml of the stock solution is added to a solution of a 0.5 ml glacial acetic acid in 100 ml of distilled water)

7. Rinse in distilled water

8. Differentiate in formalin solution No. IV for 2 to 4 minutes

9. Rinse in distilled water

10. Finish the differentiation and dehydrate rapidly in increasing concentrations of alcohol: 70 per cent, 95 per cent, absolute (1 sec in each)

11. Xylene, and mounting as usual.

To get a clear cell picture, a shortening of the luxol fast blue staining period is advisable. This procedure results in a pale blue colour of the myelin sheaths. If the blue colour is too dark, application of a more concentrated solution of sodium hydroxide (2 to 3 ml of 1 per cent NaOH are added to 100 ml distilled water) is suggested. If the perfect differentiation of the fuchsin staining of cells is not perfect, repeated differentiation dehydration) in absolute alcohol is helpful. Returning to an earlier step from every step of the taining procedure is possible. Luxol fast blue and basic fuchsin may be removed selectively by 5 per cent sodium hydroxide and absolute alcohol, respectively; restaining is always possible.

Results

Luxol fast blue stains myelin sheaths and the internal elastic membrane of blood vessels blue; red blood cells in the vessels are stained green. In addition to staining Nissl material a brilliant red, basic fuchsin also stains the media and endothelium of blood vessels, the nuclei and the cytoplasm of neuroglia and ependyma pink. Meninges and the adventitia of vessels are stained by both luxol fast blue and basic fuchsin a pale blue and a deep red, respectively.

The reactive tissue bordering the tract of the chronically implanted electrodes as well as the glial proliferation surrounding the region of electrolytically placed lesions are stained a brilliant red by basic fuchsin. Beyond the capsule of the electrode tract the irregular area of demyelinization extending a few tenths millimeter (lack of staining of myelin with luxol fast blue) is also well visible.

Discussion

Combined staining of cells and fibres of the central nervous system was introduced by KLÜVER and BARRERA [1]. Luxol fast blue and cresyl violet was suggested as stain for myelin sheaths and a counterstain for nerve cells, respectively. This original technique was modified by LOCKARD and REERS [2] who observed that more diluted solutions of luxol fast blue require a shorter staining period (2.5 hrs instead of 16 to 24 hrs) and counterstaining of nerve cells with buffered neutral red offers a greater contrast to myelin sheaths.

In the above described staining procedure only the differentiation of luxol fast blue staining is divergent from that of the LOCKARD-REERS technique. Instead of differentiation in Li_2CO_3 -LiOH.H₂O at 0-1 °C and in 70 per cent alcohol, we have used 0.01 per cent sodium hydroxide as a differentiating solution at room temperature. In this way the staining of myelin-sheaths is simplified, having fewer critical steps. For counterstaining of nerve cells, we recommend the simple basic fuchsin [3] staining.

REFERENCES

1. KLÜVER, H., BARRERA, E.: (1953) A Method for the Combined Staining of Cells and Fibers in the Nervous System. J. Neuropath. exp. Neur., 12, 400. - 2. LOCKARD, I., REERS, B. I.: (1962) Staining Tissue of the Central Nervous System with Luxol Fast Blue and Neutral Red. Stain Technol., 37, 13. - 3. DEI POLI, G., POMERRI, G.: (1938) Un metodo semplice e sicuro di colorazione della sostanza cromofila (zolle di Nissl) della cellule nervose. Monit. Zool. Ital., 49, 123.

KOMBINATIONSFÄRBUNG DES ZNS-GEWEBES MIT »LUXOL FAST BLUE« UND BASISCHEM FUCHSIN

I. SZABÓ

Eine vereinfachte Form der Klüver-Barreraschen Färbung für Paraffinschnitte wird beschrieben.

0,0125% Luxol Fast Blue, 0,01% Natronlauge und basisches Fuchsin werden empfohlen zur Färbung, Gegenfärbung und Differenzierung von Myelinscheiden bzw. Zellen. Beide Farbstoffe können selektiv entfernt werden; eine Nachfärbung ist ebenfalls möglich.

Mit Luxol Fast Blue färben sich die Myelinscheiden und die innere elastische Membran der Gefäße blau, die roten Blutkörperchen in den Adern grün. Die *Nissl*sche Substanz zeigt mit basischem Fuchsin eine glänzend rote, die Kerne und etwas Zytoplasma der Neuroglia, sowie die Media und das Endothel der Blutgefässe eine rosarote Färbung.

Diese Technik eignet sich gut zum histologischen Nachweis der Lagerung von intrazerebralen Elektroden und Läsionen.

КОМБИНИРОВАННАЯ ОКРАСКА ТКАНИ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ПОМОЩИ КРАСКИ ЛЮКСОЛ-ФАСТ-БЛЮ И ОСНОВНОГО ФУКСИНА

И. САБО

Описана упрощенная форма метода окраски парафиновых срезов Клювера и Баррера.

Для окраски предлагается 0,0125% люксол-фаст-блю, 0,01% гидрокиси натрия и основного фуксина для окраски и для дифференцирования миелинового влагалища и

для контрастного окрашивания клеток. Оба красителя могут быть избирательно удалены и возможна повторная окраска.

Люксол-фаст-блю окрашивает миелиновые влагалища и внутреннюю эластическую перепонку сосудов в синий цвет. Эритроциты в сосудах становятся зелеными. Зернышки Ниссля окрашиваются основным фуксином в яркокрасный цвет, ядра, определенная цитоплазма невроглии, а также средняя оболочка и эндотелий сосудов окрашиваются в розовый цвет. Эта техника хорошо применима для гистологической локализации внутричереп-

Эта техника хорошо применима для гистологической локализации внутричерепных электродов и изменений.

Dr. Imre Szabó, Pécs, Élettani Intézet, Hungary

First Institute of Pathology and Experimental Cancer Research (Director: Prof. Dr. J. BALÓ), University Medical School, Budapest

EXAMINATION OF COLLAGEN FIBRES FOLLOWING TREATMENT WITH LYOTROPIC AGENTS

ILONA BANGA and D. SZABÓ

(Received May 12, 1964)

Twelve compounds listed by GUSTAVSON among the lyotropic agents have been examined for their influence on contraction-relaxation and conversion to metacollagen. The morphological changes of the fibres have been studied by polarization optical methods.

Of the 12 compounds examined 6 were found to induce contraction and relaxation, but it was only with 4 compounds that the conversion to metacollagen could be demonstrated morphologically. Of the haloids of alkali metals the bromides and chlorides were all inactive and only the iodides were active. Intensive contraction-relaxation was brought about besides KI and NaI by KSCN and NaClO₄.

 $\rm CaCl_2$ and urea gave rise to polarization optical phenomena different from those found by us earlier to be caused by KI.

Collagen has been found to be greatly affected by lyotropic substances. The process was believed to be hydrolysis but according to GUSTAVSON [1] it is not hydrolysis in the true sense of the word as no primary valence bonds are split, only weaker bonds, presumably hydrogen bonds, or electrostatic cross linkages and the van der Waals forces. The term "peptization", used by colloid chemists to characterize the process, is not satisfactory either, but it is acceptable etymologically and is at present extensively employed in connexion with the destruction of collagen.

As in the case of collagen fibres, it is a lyotropic agent, KI, which induces the process of chemical contraction-relaxation extensively studied by us, it seemed interesting to examine whether the substances accepted to be lyotropic by GUSTAVSON would exert a KI-like effect on collagen. GUSTAVSON [1] has included compounds of different type in the group of lyotropic agents, for example concentrated solutions of neutral salts, concentrated urea solution, weak organic acids, phenols and aromatic sulphonic acids.

The process of contraction-relaxation is accompanied by interesting polarization optical phenomena, analysed in detail by us in connexion with KI [2]. The question has arisen whether all the lyotropic agents produce the same changes in the polarization optical pattern of the collagen fibre and is it justified to speak about a morphologically homogeneous lyotropic effect?

Of the lyotropic agents we used in the present experiments iodides, bromides and chlorides of the earth metals; potassium rhodanide, finally urea, entirely different from the former chemically. CHVAPIL and ZAHRADNIK [3] have found sodium perchlorate (NaClO₄) to be one of the most active agents in evoking contraction-relaxation. Therefore this compound, too, was included in the experiments.

BASU, RAMANATHAN and NAYUDAMMA [4] have investigated the effects of certain lyotropic agents on collagen and elastoidin and the changes in optical birefringence.

NEUMARK [5] by means of polarization optical methods observed structural changes in the collagen fibres of the epiphyseal cartilage following treatment with urea.

Methods and results

Temperature of contraction and contraction-relaxation

Tail tendon collagen fibres from 4 to 6 months old Wistar rats were incubated in aqueous solutions of KI, KSCN, KBr, KCl, NaI, NaBr, NaCl, NaClO₄, CaCl₂, BaCl₂, MgCl₂, as well as urea. In most of the highly concentrated solutions of these compounds, depending on the temperature of incubation, collagen fibres undergo contraction. The fibres placed on grooved slides could be observed microscopically and the temperature of contraction could be determined by means of a stage the temperature of which could be adjusted to from 20 to 70° C by electrical heating. According to our observations native collagen fibres will contract within that temperature range.

Neutral salts influence differently the contraction temperature of unloaded collagen fibres (Table I). In the presence of KCl and MgCl₂ the fibres did not contract even at higher temperatures. In the NaCl solution slow contraction started at 70 °C. If those lowering contraction temperature are called substances of positive action, then those producing the opposite effect, KCl, NaCl and MgCl₂, must be termed substances of negative action.

Solutions tested	Response of collagen fibres			
40 per cent KI	Contraction at 22°C			
40 per cent KSCN	Contraction at 22°C			
40 per cent KBr	Contraction at 51°C			
30 per cent KCl	No contraction at 70°C			
40 per cent NaI	Contraction at 22°C			
40 per cent NaBr	Contraction at 51°C			
30 per cent NaCl	Slow contraction at 70°C.			
40 per cent NaClO ₁	Contraction at 22°C			
40 per cent CaCl ₂	Contraction at 22°C			
40 per cent BaCl ₂	Contraction at 45°C			
40 per cent $MgCl_2$	No contraction at 70°C			
40 per cent urea	Contraction at 32°C			
H ₂ O control	Contraction at 63°C			

Table I

Contraction temperature of collagen fibres in different lyotropic salt solutions

In the next series we studied the process of contraction-relaxation at 22° C in highly concentrated solutions of the former neutral salts. Four months old rat tail tendon was used in these experiments, to be able to follow up relaxation also in time. We found namely earlier [6] that contraction-relaxation was age-dependent and in the case of rats it is the age of from 3 to 4 months when relaxation can still be followed in time. Like in our previous studies [2] the fibres were loaded with 80 mg lead shot. The results indicate that the 40 per cent solutions of KI and KSCN were the most active among the alkali metal salts. They caused strong contraction and rapid relaxation. NaI was much less potent. NaClO₄ was also active whereas the chlorides and bromides of K and Na did not cause the fibres to contract. Correspondingly, no contraction-relaxation resulted, either. From among the chlorides of the earth metals it was only CaCl₂ which caused strong contraction, but relaxation was slow, in contrast with the active salt solutions, which may be considered to be the typical reagents of chemical contractionrelaxation (Table II).

Т	a	b	l	e]	I	I

		Collagen fibre					
Solution tested	Initial length	Contrac	tion	Relaxation			
	em	time min.	length em	time min.	length cm		
0 per cent KI	6	1.5	3.5	10	6		
0 per cent KSCN	6	1.5	3.5	10	6		
0 per cent KBr	6	120	6.0				
0 per cent KCl*	6	120	6.0				
0 per cent NaI	6	30	3.7	90	5.5		
0 per cent NaBr	6	120	6.2				
0 per cent NaCl*	6	120	6.2				
0 per cent $NaCl_4$	6	4.5	2.8	60	6		
0 per cent CaCl ₂	6	5	2.3	90	5.8		
0 per cent BaCl ₂	6	120	6.2				
0 per cent $MgCl_2$	6	120	6.2				
0 per cent urea	6	120	3.3	960	4.5 (ruptured		
$H_{2}O$ control	6		and south				

Contraction-relaxation	in	different	lvotropic	salt	solutions	at	22°	C
south detroit i coused ton		ary for cree	1,00100000	0	00000000000		_	

* At 22°C the saturated solutions of KCl and NaCl contain 30 per cent of the salt.

Polarization optical studies

In the next step it was investigated whether the lyotropic solutions, which according to the data in Table II cause the collagen fibres to contract and relax, would produce the same polarization optical pattern as that found with the use of KI. At identical concentrations, KSCN and NaClO₄ induced a chemical contraction and relaxation similar to that brought about by KI. Correspondingly, the polarization optical findings were also similar. Although with the use of NaI contraction and relaxation were slower, the polarization optical patterns were similar, the properties of metacollagen gained preponderance, which means that in distilled water the fibre lost its positive birefringence and its ability to react with phenol. In the dried state the metacollagen still showed a weak birefringence. In contract to this, in the solutions of KBr, KCl, NaBr, NaCl, BaCl₂, MgCl₂, in which the fibre did not contract at low temperatures (Table II), the positive birefringence did not disappear, and there was no conversion to metacollagen, either.

Acta morph. tomus X111.

Following treatment with CaCl₂ and urea, as lyotropic agents, polarization optical phenomena significantly different from those outlined above were observed. We have therefore studied the effect of these compounds plotted against time and concentration.

Collagen fibres were incubated in solutions of $CaCl_2$ and urea for the lengths of time and temperatures specified below. Treatment was followed by rising in 3 changes of 50 ml distilled water for 5 minutes each, and by drying in air at 20°C. The fibres thus pretreated were placed into Canada balsam diluted with xylol to the consistency of honey. The preparations were examined under the polarization microscope and the qualitative and quantitative changes of birefringence were recorded by means of a compensator.

Studies with $CaCl_2$. Fibres incubated for 20 minutes at 22°C in a 12 per cent solution of CaCl₂ showed a pattern similar to that of native fibres. The fibres so pretreated showed an intensive positive birefringence in Canada balsam (Fig. 1), and an intensive negative one in phenol (Fig. 2).

Two minutes after the onset of treatment with 24 per cent $CaCl_2$ solution of 22°C, the fibres contracted weakly and their positive birefringence diminished slightly (Fig. 3), but they still reacted with phenol (Fig. 4).

Two minutes after treatment with 36 to 40 per cent solutions of CaCl₂ at 22°C, the fibres displayed spike-like structures at regular distances (Fig. 5). In the areas of these spikes the continuity of the dark axial band was interrupted. These fibres reacted also with phenol (Fig. 6).

When incubation under the above conditions was continued for 10 minutes, the fibres underwent swelling and the spikes became flat (Fig. 7). No phenol reaction was observable in this case (Fig. 8).

Fibres incubated for 2 hours showed no birefringence in Canada balsam (Fig. 9) and no phenol reaction (Fig. 10). Only the fibre-bound CaCl₂ crystals showed birefringence, which could be studied well with the polarization filters in the crossed position and recordings without the use of the compensator (Fig. 11).

Studies with urea. After 1 to 10 minutes of incubation in 40 per cent urea solution of 22° C the positive birefringence of the fibres slightly decreased (Fig. 12) but the phenol reaction was feasible (Fig. 13). After 16 hours incubation at 22° C, the positive birefringence of the fibres significantly diminished (Fig. 14), the phenol reaction was still feasible (Fig. 15). Incubation for 24 to 48 hours at 22° C caused contraction and a marked decrease of the positive birefringence and the phenol reaction. With the increase of temperature the urea effect increased in intensity. Following treatment with urea at 37° C for periods longer than 5 to 10 minutes, the positive birefringence decreased and together with that the fibres contracted (Fig. 16); the phenol reaction was still feasible (Fig. 17).

Pretreatment for 10 to 25 minutes at 37°C resulted in a significant decrease of the positive birefringence of the contracted fibres, and at the same time a transversal rearrangement was visible (Fig. 18). Fibres so pre-treated did not give the phenol reaction (Fig. 19).

Incubation at 37° C for 30 minutes caused the fibres to swell and reduced the positive birefringence by 90 per cent (Fig. 20). Meanwhile, the phenol reaction is unfeasible.

The changes in birefringence under the effect of concentrated urea solution are clearly visible in the graph (Fig. 21).

The results indicate that $CaCl_2$ and urea produce different polarization optical patterns, which are different from the morphological structure observed under the effect of KI experiments.

Discussion

We have examined 12 lyotropic agents in these experiments. All of them, with the exception of urea, belong to the group of neutral salts. In his book GUSTAVSON [1] devoted a separate chapter to the effect of neutral salts, most of which (the bromides, iodides and chlorides of the alkali metals and earth metals in particular) exert a lytic, peptizing effect on powdered animal hides. According to GUSTAVSON this so-called lyotropic effect manifests itself with the conversion of the dermal collagen protein into a soluble form. The above salts act on the non-ionic components of collagen, as proved by the fact that



Figs. 1 to 11. Changes in the morphology and birefringence of CaCl₂-pretreated rat tail tendon fibres, as examined by polarization microscopy, following imbibition with Canada balsam (Figs. 1, 3, 5, 7 and 9), and with phenol (Figs. 2, 4, 6, 8, 10 and 11)

Fig. 1. Collagen fibre incubated at 22°C in a 12 per cent solution of $CaCl_2$ showing marked positive birefringence

Fig. 2. Following pretreatment as in Fig. 1, intense negative birefringence is observable in phenol

Fig. 3. The collagen fibre incubated for 2 minutes in a 24 per cent solution of CaCl₂ at 22° C contracts slightly; the positive birefringence is slightly diminished

Fig. 4. Following pretreatment as in Fig. 3, the fibre still reacts with phenol

Fig. 5. The fibre incubated for 2 minutes in a 36 per cent CaCl₂ solution of 22° C shows spikelike protrusions

Fig. 6. Following pretreatment as in Fig. 5, the phenol reaction is feasible

Fig. 7. The fibre incubated for 10 minutes in a 36 per cent $CaCl_2$ solution of 22°C swells, the spikes visible in Fig. 6 are flattened Fig. 8. Following pretreatment as in Fig. 7, the phenol reaction is not feasible Fig. 9. Incubation for 2 hours at 22°C in a 36 per cent $CaCl_2$ solution causes marked swelling

of the fibre and disappearance of its birefringence

Fig. 10. Following pretreatment as in Fig. 9 no birefringence is visible in phenol

Fig. 11. Crystals of CaCl, are bound to the fibre shown in Fig. 10. To illustrate their birefringence, the picture was made without a compensator





Figs. 12 to 20. Polarization microscopic appearance of urea-pretreated rat tail tendon fibres, showing the changes in morphology and birefringence after imbibition with Canada balsam (Figs. 12, 14, 16 and 18) and with phenol (Figs. 13, 15, 17, 19 and 20)

Fig. 12. Positive birefringence following incubation for 10 minutes in a 40 per cent urea solution of 22° C

Fig. 13. After pretreatment as in Fig. 12, intense negative birefringence is visible in phenol Fig. 14. Incubation for 16 hours in a 40 per cent urea solution of 22° C significantly diminishes the positive birefringence of the fibre

Fig. 15. Following pretreatment as in Fig. 14, the phenol reaction is feasible

Fig. 16. After 10 minutes incubation in a 40 per cent urea solution of 37° C the fibre undergoes contraction and swelling. Diminished positive birefringence

Fig. 17. Following pretreatment as in Fig. 16, the phenol reaction is feasible

Fig. 18. Following pretreatment for 25 minutes in a 40 per cent urea solution of 37° C, the positive birefringence is significantly diminished

Fig. 19. Following pretreatment as in Fig. 18, the phenol reaction is unfeasible Fig. 20. Pretreatment for 30 minutes in a 40 per cent urea solution of 37° C causes the fibre to swell and almost completely abolishes the positive birefringence. Technical data: Except in Fig. 11. the polarization micrographs were made with crossed filters, interposing a first order red plate. Magnification, 35:1





Fig. 21. Changes in birefringence measured in Canada balsam and in the phenol reaction of rat tail tendon fibres following incubation at 37° C in a 40 per cent solution of urea

following treatment with neutral lyotropic solutions there is no change in the uptake of the cationic chromium sulphate and chromium chloride tanning substances, while that of the non-ionic sulphito-chromium sulphate increases in proportion to the lyotropic effect of the neutral salts.

Our experiments were carried out on isolated collagen fibres and this may be responsible for the fact that our results did not quite agree with the statements made by GUSTAVSON [1]. The peptizing effect may be brought into correlation with the conversion to metacollagen. We have namely found (unpublished observations) that in the course of conversion to metacollagen 60 to 75 per cent of the fibrous collagen becomes soluble. As indicated by the graph in GUSTAVSON's book [1] (Fig. 30 page 174) the peptizing effect of salt solutions decreases in the order NaBr > CaCl₂ > NaI > MgCl₂ > LiCl >> KCl > (NaCl) > MgSO₄ > Na₂SO₄. In contrast, according to our data (Table I, Table II) conversion to metacollagen takes place only in those solutions, which cause contraction and then relaxation. At 22° C these are KI, KSCN, NaI, NaClO₄ and CaCl₂. In the other salt solutions the process of chemical contraction and relaxation does not take place and correspondingly

there is no conversion to metacollagen, either. GUSTAVSON'S graph shows NaBr to be the most active lyotropic agent. In our experiments this salt did not cause the fibres to contract at 22° C; in a 40 per cent solution they even stretched (*Table I, Table II*). According to GUSTAVSON, NaI and MgCl₂ bring about an identical degree of peptization, whereas we found NaI to have a positive effect causing a chemical contraction, while MgCl₂ was inactive. Our results agree with GUSTAVSON's in the case of KI, KSCN and CaCl₂. Yet, the polarization optical patterns were different in the cases of KI and CaCl₂, and with CaCl₂ no conversion to real metacollagen occurred, just as it did not occur on incubation in concentrated urea solutions. All these prove that the peptization and tanning reactions carried out with animal hide powders are not identical with the effect inducing chemical contraction and relaxation.

As regards the effect of concentrated urea solution, our results agree with those of GUSTAVSON [1] in that the urea solution causes peptization at 35° to 37° C. At 37° C a quick contraction, and slow relaxation take place. As judged from the polarization optical pattern, the metacollegen-like structure begins to develop above 32° C. However, the kind of collagen thus obtained is not identical with the usual metacollagen.

Our results indicate that in response to $CaCl_2$ the conversion of collagen fibres to a "metacollagen-like" substance takes place in different phases than under the effect of KI. This is even more true for urea, as the conversion caused by it never leads to metacollagen formation. It might split the hydrogen bridges, the so-called secondary bonds playing a role in the longitudinal arrangement of the fibres. It is also conceiveable that, especially in the early phase of the reaction, the diminution of birefringence caused by urea is an inhibitory effect.

As a final conclusion we believe that the compounds belonging to the group of lyotropic agents often exert similar effects on collagen fibres; $CaCl_2$ and urea, however, show individual differences.

REFERENCES

1. GUSTAVSON, K. H.: (1956) The Chemistry and Reactivity of Collagen. Academic Press, New York Pp. 171–201. – 2. BANGA, I., BALÓ, J., SZABÓ, D.: (1954) Contraction and Relaxation of Collagen Fibres. Nature (Lond.) **174**, 788. – **3**. CHVAPIL, M., ZAHRADNIK, R.: (1960) A Study of the Chemical Shrinkage and Relaxation of Collagen Fibres. Biochim. biophys. Acta **40**, 329. – 4. BASU, B. C., RAMANATHAN, N., NAYUDAMMA, Y.: (1962) The Optical Birefringence of Tanned and Modified Collagen. In: Collagen, ed. N. Ramanathan. Interscience Publishers, New York. – 5. NEUMARK, T.: (1964) Submicroscopic Changes in the Collagen Fibres of Epiphyseal Cartilage Caused by Concentrated Urea. Acta morph. Acad. Sci. hung. **12**, 367. – 6. BANGA, I., BALÓ, J., SZABÓ, D.: (1956) The Structure, Ageing and Rejuvenation of Collagen Fibres. Experientia (Basel) Suppl. **4**, 28 (1956).

EXAMINATION OF COLLAGEN FIBRES

UNTERSUCHUNG VON KOLLAGENFASERN BEI VERWENDUNG LYOTROPER SUBSTANZEN

I. BANGA und D. SZABÓ

Von den Verbindungen, die in GUSTAVSON'S Buch unter den lyotropen Substanzen aufgezählt sind, haben wir 12 Substanzen hinsichtlich der Kontraktion-Relaxation und der Umwandlung in Metakollagen untersucht. Zur Untersuchung der morphologischen Veränderungen der Fasern verwendeten wir ein polarisationsoptisches Verfahren.

6 von den untersuchten 12 lyotropen Substanzen lösten das Phänomen der Kontraktion-Relaxation aus, die Umwandlung in Metakollagen war morphologisch jedoch nur in Anwesenheit von 4 Substanzen nachweisbar. Von den Alkali-Haloiden waren alle Bromide und Chloride inaktiv, nur die Jodide wiesen eine Wirkung auf. Eine sehr starke Kontraktions-Relaxations-Wirkung lösten KSCN und NaClO₄ aus.

Durch Einwirkung von CaCl, und von Karbamid sind polarisationsoptische Effekte zu vermerken, die sich von den im Laufe unserer früher beobachteten, mit KJ durchgeführten Experimente unterscheiden.

ИССЛЕДОВАНИЕ КОЛЛАГЕНОВЫХ ВОЛОКОН ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ЛИОТРОПНЫХ ВЕЩЕСТВ

И. БАНГА и Д. САБО

Авторы исследовали 12 из веществ, причисленных в книге Густавсона к числу лиотропных соединений. С точки зрения сокращения и расслабления и при преобразовании в метаколлаген. Для исследования морфологических изменений волокон авторы использовали поляризационный оптический метод.

Из исследованных 12 лиотропных веществ 6 вызвали явление сокращения-расслабления, но превращение в метаколлаген могло быть выявлено только в присутствии 4 веществ. Из галоидов щелочных металлов все бромиды и хлориды были неактивными и только иодиды оказывали действие. Очень сильное действие в отношении сокращениярасслабления вызывали KSCN и NaClO₄.

Под влиянием хлористого калыция и мочевины авторы отметили отличающиеся от прежних наблюдений с иодистым калием поляризационные оптические явления.

Dr. Ilona BANGA, Budapest VIII. Üllői út 26. Hungary Dr. D. SZABÓ, Budapest VIII. Szigony u. 43. Hungary



Department of Anatomy (Director: Prof. Dr. J. SZENTÁGOTHAI), University Medical School, Pécs

ON SUPPOSED DIRECT REFLEX COLLATERALS OF PRIMARY TRIGEMINUS AFFERENTS TO MOTOR CRANIAL NERVE NUCLEI

M. RÉTHELYI and M. VILÁGHY

(Received May 18, 1964)

Electrolytic lesions have been placed in adult albino rats into the 5th nerve ganglion (Gasserian) with the aid of a stereotaxic apparatus. Secondary degeneration of primary afferents in the brain stem was traced by aid of the Nauta-Gygax impregnation technique. No evidence of direct primary sensory neuron collaterals, reaching any of the motor cranial nerve nuclei, could be obtained. Recent reports on the existence of monosynaptic reflexes established by neurons situated in the Gasserian ganglion are, therefore, refuted.

There still seems to be some uncertainty concerning the existence of monosynaptic reflex connexions in cranial nerves. The question is confused by the strange separation of the cell bodies of primary muscle afferents and other primary sensory neurons, the former ones being situated mainly in the mesencephalic tract of the trigeminus, and perhaps also in the trunks of motor cranial nerves (3rd, 4th, 6th, 7th and 12th), whereas the latter are localized in the cranial sensory ganglia. The course and monosynaptic connexions of mesencephalic tract primary muscle afferent neurons have been traced by SZENTÁGOTHAI [8], and physiological findings are in complete accordance with the anatomical fact of a monosynaptic pathway established between Ia muscle spindle afferents and motor trigeminal neurons. Unfortunately, there is no clear anatomical evidence of similar monosynaptic connexions between muscle afferents of eye, facial, and tongue muscles and their respective motoneurons. Muscle spindles are known to occur in these muscles, although not regularly and not in every species. The cell bodies of the primary Ia afferents could either be situated (1) in the motor nerves, where scattered nerve cells of sensory type have been met with, or (2) in the mesencephalic nucleus of the trigeminus, and (3) in the sensory cranial nerve ganglia. Possibility (1) could be tested by cutting motor cranial nerves at the site of their exit from the brain and looking for degenerated synapses in the motor nuclei of the same nerves. Possibility (2) has been investigated by SZENTÁGOTHAI (unpublished), so far with a negative result, but it might be worth while to subject the matter to another test. Concerning the third possibility the observations are controversial. Direct collaterals of primary 5th nerve neurons have been described in Golgi material by KÖLLIKER [7] and ASTRÖM [1], their existence has, how-

Acta morph. tomus X111.

ever, been denied by CAJAL [2]. Using degeneration methods, SZENTÁGOTHAI [8] and KERR [6] in the cat, and TORVIK [10] in the rat, did not find monosynaptic connexions between the 5th nerve (Gasserian) ganglian and the 5th, 7th as well as the 12th motor nuclei. It was therefore most surprising that quite recently CLARKE and BOWSHER [3] were able to trace degeneration fragments from the degenerated sensory root of the trigeminus to the motor nuclei of the 5th and 7th nerves. Physiological evidence also seems to be controversial, as CRUE and SUTIN [4] claim to have found evidence of monosynaptic connexions between trigeminus and facial nerve, whereas the findings of GREEN et al. [5] are against such an assumption.

As previous experiments made in our department (SZENTÁGOTHAI [8]) had been made on the cat and in the "pre-Nauta" period of experimental axonal degeneration technique, it might well be possible that such connexions do exist in the rat or, being extremely few in the cat, had been overlooked in Bielschowsky preparations. The question has therefore been reinvestigated in the rat using the Nauta-Gygax impregnation technique. An account of these results is given in the present paper.

Material and methods

Electrolytic lesions were placed by a stereotaxic apparatus into the Gasserian ganglion of 8 adult albino rats. The animals were sacrificed five days after the operation under ether anaesthesia by perfusion through the aorta of a 10 per cent neutralized formalin solution. The brain was immediately removed from the skull and fixed for two weeks in the same fluid. 20 micron frozen sections were cut in the frontal plane and impregnated according to the Nauta-Gygax procedure.

Results

Degenerated primary sensory fibres of the trigeminal nerve could easily be traced into the principal sensory nucleus, where they participate in a dense meshwork of preterminal and terminal axons (Fig. 1). More caudally degenerated fibres are seen to enter from the spinal tract of the 5th nerve into its nucleus, where they terminate. The degeneration picture might be somewhat confused, in consequence of damage to corticobulbar fibres caused by the electrode tract; this did not, however, interfere with our main purpose, as cortical fibres do not have direct access to motor nuclei in subprimate animals (SZENTÁGOTHAI and RAJKOVITS [9]). No degenerated preterminal fibres could be traced into the 5th, 7th and 12th motor nuclei, although the degeneration was clear enough in the sensory nuclear regions of the same preparations (Figs. 2, 3 and 4). The motor nucleus of the 9th, 10th and 11th nerves is not sufficiently separated from the surrounding neuropil of the reticular formation so that the anatomical situation is not suited for the decision whether or not



Figs. 1-4. Rat 5 days after local lesion in trigeminal ganglion. Nauta-Gygax procedure. Magnification, \times 500. – Fig. 1. Principal sensory nucleus of the trigeminus, numerous degeneration fragments. Fig. 2. Motor trigeminal nucleus, Fig. 3. facial nucleus, Fig. 4. hypoglossal nucleus. Note complete lack of degeneration fragments in motor nuclei

primary trigeminal collaterals establish direct synaptic contact with these motoneurons. However, it seems a priori improbable that such connexions exist if they do not occur with the motoneurons of the 5th, 7th and 12th nuclei.

Discussion

Our observations do not support the claim of CLARKE and BOWSHER [3] concerning the existence of monosynaptic connexions between primary sensory neurons of the Gasserian ganglion and motor cranial nerve nuclei. The seemingly positive results of these authors must have been caused by erroneous interpretation of so-called "pseudodegeneration" fragments, which may occur in some materials in spite of otherwise adequate technique. In order to avoid such errors it is advisable to investigate very carefully under oil immersion when the pseudodegeneration fragments that are caused mostly by neurokeratin staining in the neighbourhood of the Schmidt-Lantermann incisures, can be distinguished with certainty from true axonal fragments. It is also advisable to make parallel stainings with a Bielschowsky modification (Schultze-Gros or Glees), and to control sites where there are many fragments in the Nauta slides. From microphotos it is often difficult to tell whether the fragments are true or pseudo-degeneration. Some of the figures of CLARKE and BOWSHER [3] give the impression that the fragments had been due to the latter.

There are, of course monosynaptic reflex connexions in the cranial nerves, but they are exclusively reserved to Ia muscle afferents and the perikarya of the sensory neurons are not localized in the sensory ganglia, but somewhere else. The only known nucleus of such neurons is in the mesencephalic tract of the 5th nerve. The localization of the cell bodies of other Ia afferents is still doubtful, but it is certain that they are not localized in the Gasserian ganglion. On the basis of a large degeneration material obtained from transection of sensory cranial nerves, SZENTÁGOTHAI [8] pointed out emphatically that there is no anatomical evidence of any other type of sensory neurons having — in the CNS — monosynaptic connexions. This agrees well with physiological observations and our findings concerning the 5th nerve also support this view.

REFERENCES

1. ASTRÖM, K. E.: (1953) On the Central Course of Afferent Fibres in the Trigeminal, Facial, Glossopharyngeal and Vagal Nerves and their Nuclei in the Mouse. Acta physiol. scand. 29, (Suppl. 106) 209-320. — 2. CAJAL, S., RAMON, Y.: (1909) Histologie du système nerveux de l'homme et des vertèbres. Maloine, Paris. — 3. CLARKE, W. B., BOWSHER, D.: (1962) Terminal Distribution of Primary Afferent Trigeminal Fibres in the Rat. Exp. Neurol. 6, 372-383. — 4. CRUE, B. L., SUTIN, J.: (1959) Delayed Action Potentials in the Trigeminal System of Cats. Discussion of Their Possible Relationship to Tic Douloureux. J. Neurosurg. 16, 477-502. — 5. GREEN, J. D., DE GROOT, J., SUTIN, J.: (1957) Trigeminobulbar Reflex Pathways. Amer. J. Physiol. 189, 384-388. — 6. KERR, F. W. L.: (1961) Structural Relation of the Trigeminal Spinal Tract to Upper Cervical Roots and the Solitary Nucleus in the Cat. Exp. Neurol. 4, 134-148. — 7. KÖLLIKER, A.: (1891) Der feinere Bau des verlängerten Markes. Anat. Anz. 6, 427-431. — 8. SZENTÁGOTHAI, J.: (1948) Anatomical Considerations of Monosynaptic Reflex Arcs. J. Neurophysiol. 11, 445-454. — 9. SZENTÁGOTHAI, J., RAJKOVITS, K.: (1958) Der Hirnnervenanteil der Pyramidenbahn und der prämotorische Apparat motorischer

Acta morph. tomus X111.

Hirnnervenkerne. Arch. Psychiat. Nervenkr. 197, 335-354. – 10. TORVIK, A.: (1956) Afferent Connexions to the Sensory Trigeminal Nucleus of the Solitary Tract and Adjacent Structures. An Experimental Study in the Rat. J. comp. Neurol. 106, 51-141.

DIE HYPOTHETISCHEN REFLEXKOLLATERALEN DER PRIMÄREN TRIGEMINUS-AFFERENTEN ZU DEN MOTORISCHEN KERNEN VON HIRNNERVEN

M. RÉTHELYI und M. VILÁGHY

Mit Hilfe eines stereotaktischen Zielgerätes haben wir das sensible Ganglion des Trigeminus (Ggl. Gasseri) an weissen Ratten durch elektrolytische Läsion zerstört, und die degenerierten primären sensiblen Fasern im Hirnstamm unter Verwendung der Nauta-Gygaxschen Imprägnationstechnik verfolgt. Wir fanden keinen Beweis, laut dessen die Kollateralen der primären sensiblen Fasern zum motorischen Kern irgendeines Hirnnerves verlaufen würden. Deshalb nehmen wir eine entschlossen verneinende Stellung in jener Frage ein, ob die im Ganglion Gasseri befindlichen Neuronen unmittelbare Reflexkollaterale zu den motorischen Kernen der Hirnnerven hätten.

ПРЕДПОЛАГАЕМЫЕ РЕФЛЕКТОРНЫЕ КОЛЛАТЕРАЛИ ПЕРВИЧНЫХ АФФЕРЕНТНЫХ ВЕТВЕЙ ТРОЙНИЧНОГО НЕРВА К ДВИГАТЕЛЬНЫМ ЯДРАМ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВЫХ НЕРВОВ

М. РЕТХЕИ и М. ВИЛАГИ

При помощи стереотаксического прицельного прибора электролитическим путем на белых крысах был поврежден чувствительный узел тройничного нерва (Гассеров узел). Переродившиеся первичные чувствительные волокна мы проследовали в стволе мозга импрегнационной техникой Наута-Гигакса. Авторы не нашли доказательства того, что коллатерали первичных чувствительных волокон идут к двигательному ядру какого-нибудь из черепно-мозговых нервов. Поэтом они занимают отрицательную позицию по тому вопросу, имеют ли расположенные в Гассеровом узле невроны непосредственные рефлекторные коллатерали к двигательным ядрам черепно-мозговых нервов.

Dr. M. RÉTHELYI, Budapest Anatómiai Intézet, Hungary Dr. M. VILÁGHY, Pécs Anatómiai Intézet, Hungary

6



National Institute of Rheumatology and Balneology, Department of Pathology, Budapest

SUBMICROSCOPIC CHANGES OF THE AORTIC STRUCTURE IN LATHYRUS-FED RATS

T. NEUMARK and K. FARKAS

(Received May 20, 1964)

White rats of 100 g body weight were fed a lathyric diet and their aorta was studied under the polarization microscope for alterations of the submicroscopic structure. The gravest changes were found to occur in the abdominal aorta. The earliest changes presented themselves in the fibrillar structure of elastic fibres, accompanied by a transitory increase and a subsequent marked decrease in the oriented acid mucopolysaccharides of the ground substance, together with a rise in the number of collagen fibres. There were marked differences in the submicroscopic structure of newly developed collagen fibres and a conspicuous increase of perivascular connective tissue along the gravely damaged vessel portions. It is assumed that in experimental lathyrism the localization and degree of aortic lesions is related with the basic structure of the vessel wall.

Different explanations have been suggested for the mesenchymal lesions induced by diets containing sweet pea or its extract [1, 2, 14]. The connective tissue lesions induced by lathyrus show several features in common with certain unclarified degenerative changes of the human connective tissue [13]. Well known is the fact that lathyrus fed to the rat gives rise to a severe aortic lesion [16, 20, 21, 30, 31] which resembles certain vessel injuries observed in human atherosclerosis [27]. The present paper deals with the polarization microscopical examination of submicroscopic vessel changes brought about by experimental lathyrism.

Methods

Albino rats of both sexes, weighing about 100 g were fed a diet containing 50 per cent Lathyrus odoratus grist. The animals were killed in groups of three under ether anaesthesia, 3, 6, 9, 12 and 16 weeks after beginning the diet. An equal number of animals of the same age, fed a normal diet, were killed each time for control purposes. The aorta was removed *in toto*, divided into an abdominal and a thoracic portion and these were fixed for 24 hours in 8 per cent neutral formalin solution, and embedded in paraffin. Five micron thick sections were cut and a part of these was subjected to the periodic acid Schiff (PAS) reaction and orcein staining for the purpose of normal microscopical study. For submicroscopic examinations the following topochemical reactions were used.

Anilin reaction [25]. The sections were treated with anilin xylol solution at increasing concentrations and in pure anilin. Those to be preserved were covered with an equal mixture of anilin and Canada balsam.

Phenol reaction [3]. Deparaffinized sections were covered with a 50 per cent and increasing phenol concentrations dissolved in Canada balsam [8].

Precipitation metachromatic staining [26]. Sections were stained at various pH values with 0.02 per cent toluidine blue, stabilized with potassium ferricyanide and studied in monochromatic red light; Romhányi's metachromatic index was determined following toluidine blue staining at pH 4. *Rivanol reaction* [25a]. Deparaffinized sections were stained with a 0.2 per cent aqueous Rivanol solution; following clarification with terpineol, they were covered with Canada balsam.

Imbibition test [27]. In the deparaffinized sections collagen fibres were studied for double refraction in solutions of growing refraction indexes.

General findings

As the experimental lathyrism progressed, pronounced vascular changes, articular deformities, scoliosis and loss of weight presented themselves towards the end of the third month. The two aortic parts (thoracic and abdominal) showed essential differences. The gravest vascular lesions were found in the abdominal part; those in the thoracic section were slighter. The light microscopical findings were in conformity with those reported in the literature [10, 11, 15, 21, 29]. It was especially in the abdominal portion that the perivascular connective tissue and the adventitia were thickened, and the elastic fibres were broken up. Early symptoms were the increased waviness of elastic fibres and the accumulation along them of a granular, mostly PAS-positive metachromatic substance. Among disoriented collagen fibres injured elastic fibres and numerous connective tissue cells were seen. A dilated lumen and a thin wall with necrotic cystic areas characterized the abdominal arta (Figs. 1-5). Less severe were the changes in the thoracic arta. In the paraaortic lymph nodes there was much haemosiderin.

Polarization microscopical findings

Elastic fibres. The earliest symptom was a decrease of the double refraction (increasing anilin concentrations), noticeable in the abdominal sooner than in the thoracic portion (see Graph 1). Orcein-stained sections from the early phase revealed hardly any alteration, later the double refraction became gradually less distinct, in severely injured areas almost fully extinguished (Figs. 6, 7), at the same time the elastic lamina expanded and the collagen fibres proliferated (Fig. 9). Irregularly shaped elastic fibres staining readily with orcein were to be seen even in gravely injured areas. The lesions in the abdominal part were always more severe than in the thoracic portion. The interna elastica membrane was well preserved throughout.

Collagen fibres. These multiplied continously during the experimental period. The phenol reaction revealed an expansion of the collagen integuments of the elastic membrane in the early stage, later in the abdominal part the collagen fibres became irregular and coarse, with numerous deformed connective tissue cells (Figs. 8, 9). Mounting the slices with increasing phenol concentrations dissolved in Canada balsam a marked shift occurred in the phenol reaction, especially in the areas displaying grave changes (Graph 2). At sites the metachromatic effect was considerably decreased, at others the phenol reaction failed to reveal collagen fibres. In some parts of the abdominal aorta the vascular structure was abnormal past recognition. The imbibition curves referring to disoriented collagen fibres in heavily affected areas differed from the controls (Graph 3). The same was the case with the collagen fibres of proliferated perivascular connective tissue. Staining with Rivanol revealed a markedly negative double refraction of unaffected collagen fibres, showed an intense reaction along the elastic fibres of the thoracic portion, while the abdominal part failed to react. Here the lively double refraction was confined to radially arranged structures (Figs. 10 to 13).

Acid mucopolysaccharides in the ground substance. In the early experimental phase there was an increase of acid mucopolysaccharides in the entire aorta. Later on the gravely affected focal necrotic areas of the abdominal portion presented a gradual decline, in some places a complete absence, of the metachromatic effect. In conformity with other authors [32], we observed that some vessel portions, though failing to metachromasia under the polarization microscope, showed under the light microscope accumulations of a coarse-grained, oriented substance, staining metachromatically with toluidine blue. This metachromasia did not increase in proportion to the quantity of PAS-positive substance. There was a distinct difference in response between the abdominal portion where the metachromatic index rose markedly, and the thoracic portion where it rose scarcely during the initial phase, although here the increase of PAS-positive substance was much more pronounced along the elastic fibres. In the later phases, the abdominal portion, abounding in fibrocytes but mostly deficient in oriented structural elements, showed only traces or a complete lack of metachromasia, despite the marked PAS reaction. The phenol reaction grew weaker or ceased especially in this area. On staining with pH 4 toluidine blue the collagen fibres of the increased perivascular connective tissue were revealed to be of a steno-collagenous nature [26].



Fig. 1. Abdominal aorta of control animal. Normal elastic fibres. Orcein, \times 150 Fig. 2. Abdominal aorta of lathyrus fed rat. Gravely damaged elastic fibres, thick adventitia. Orcein, \times 150

271



Fig. 3. Abdominal aorta of control animal. PAS, \times 159 Fig. 4. Abdominal aorta of lathyrus-fed animal. Vessel wall markedly damaged, wide lumen. PAS, \times 150



Fig. 5. Thoracic aorta of lathyrus-fed rat. Accumulation of PAS-positive substance along the elastic fibres. PAS, \times 150 Fig. 6. Abdominal aorta of normal rat. Anilin reaction, under polarization microscope. \times 210



Graph 1. Double refraction of elastic fibres at increasing anilin concentrations. "A" = control; "B" = three weeks, "C" = three months, after beginning of diet



Graph 2. Tests with increasing concentrations of phenol in Canada balsam. The lathyrus fed animals' phenol concentration curve is shifted in comparison to that of the controls. Collagen fibres have a lower phenol value. In the controls the double refraction passes turn from positive into negativ at a higher phenol concentration



Graph 3. Imbibition curves of collagen fibres, somewhat flattened and shifted for lathyrus-fed animals as compared to the controls



Fig. 7. Abdominal aorta of rat after 3 months of lathyrus diet. Weak anilin reaction of the diminished and heavily injured elastic fibres. Polarization microscope, × 210
Fig. 8. Abdominal aorta of normal rat. Phenol reaction under polarization microscope, × 150



Fig. 9. Abdominal aorta of lathyrus-fed rat. Thickened disoriented collagen fibres, with a marked decrease of double refraction. Increased perivascular connective tissue, with brightly negative double refraction. Phenol reaction, under polarization microscope, × 150
Fig. 10. Abdominal aorta of control rat. Rivanol reaction, under polarization microscope,

imes 150


Fig. 11. Abdominal aorta of lathyrus-fed rat. Rivanol reaction in 2nd month of lathyrus diet. Aortic adventitia, Rivanol positive thick fibres. Polarization microscope, \times 150 Fig. 12. Abdominal aorta of rat after 4 month of lathyric diet. Rivanol-positive fibres of the wessel wall arranged perpendicularly to the lumen, \times 210



Fig. 13. Thoracic aorta of lathyrus-fed rat. Accumulation of Rivanol-positive substances along the elastic fibres. Rivanol reaction, under polarization microscope, \times 150

Discussion

Earlier observations [16, 19, 12, 28] have established that the intensity of lathyrism depends on the age of the animals; the younger they are, the greater the damage. The changes occur especially in the thoracic aorta. Pyö-RÄLÄ *et al.* [23] found in animals of more than 70 to 80 g body weight the aorta remained unaffected after a prolonged period of a 50 per cent lathyrus diet. In our own experiments with 100 g rats, the gravest changes presented themselves in the abdominal area. The unequal degree of lathyrogenic change in the aorta of older animals — comparable to the localization of human atherosclerosis — is probably in connexion with the structural differences, emphasized by one of the present authors [5] and which we were able to trace [19] by polarization microscopy in the aorta of atherosclerotic patients.

The earliest change in the aorta of lathyric animals presented itself during the third week in the submicroscopic structure of elastic fibres at the same time when neither elastic elements nor the ground substance showed alterations using normal light microscope. Towards the end of the experimental period (approximately 4 months), elastic fibres in the abdominal portion became almost or fully unidentifiable by topochemical reactions, though fibres of irregular shape staining with orcein could be traced even in the most gravely

injured areas. As a kind of compensation for the decaying elastic fibres, there was a simultaneous increase in the number of collagen fibres. ROMHÁNYI's polarization optical observations [25] — contrasting with other results [22, 23] — led us to presume that the change of the elastic fibres is the earliest symptom, followed by mucopolysaccharide differences between the character-istically phenol-positive collagen fibres and the ground substance. Simultaneously a Rivanol-positive substance was accumulated along the elastic fibres, mainly in the thoracic portion. KEECH [9] on the basis of electron microscopic studies of the lathyric rat aorta, claims that accumulation of a highly PAS-positive amorphous substance along the elastic fibres is a characteristic sign of lathyrism. It seems likely that the PAS-positive substance which in our experiments showed a negative double refraction, agrees with the one described by KEECH, only to him it appeared amorphous while our submicroscopic examinations revealed a fibrillar structure (Fig. 13).

NÉMETH-CSÓKA'S [17] polarization microscopic observations in agreement with our findings [19] showed that the anilin reaction tones down in the aorta of aged atherosclerotic patients, with a simultaneous increase of collagen fibres along the elastic ones.

According to several authors, the increase in the number of collagen fibres in lathyrism is interrelated with the metachromatic substance [1, 29].

Our findings seem to indicate that the oriented acid mucopolysaccharides of the ground substance, while they increase in amount during the early phase and in the less severely affected thoracic portion, are either diminished or absent in the heavily damaged areas of the abdominal aorta.

Metachromasia of the ground substance of the epiphyseal cartilages, too, presented a pronounced decrease; at pH 4 even its complete absence, with increased storage of PAS-positive substance was observed, in agreement with NÉMETH-CSÓKA [18].

Considering the important role of acid mucopolysaccharides in the synthesis and structural stabilization of collagen fibres [7], it is not surprising that both the imbibition and the phenol reaction had revealed differences in the submicroscopic structure of collagen fibres. The gravest structural alterations of the collagen fibres were found at sites where the vessel was severely injured. At such sites, where the metachromatic effect was no longer noticeable, the phenol reaction, too, failed to demonstrate collagen fibres.

In agreement with the quoted authors, it is assumed that the registered changes are due to a disturbance of the maturing process of collagen fibres and to depolymerization of the acid mucopolysaccharides in the ground substance [24, 6, 28].

REFERENCES

1. CASTELLANI, A. A., CASTELLANI-BISI: (1958) Decrease in Hexosamine Content of Epiphyseal Plates in Experimental Lathyrism. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 98, 318. - 2. CHURCHILL, D. W., GELFENT, S., LALICH, J. J. and ANGEVINE, D. M.: (1955) Alterations in the Polysaccharides and the Elastic Fibres in the Aorta of Rats Fed Toxic Lathvrus Factor. Lab. Invest. 4. 1. - 3. EBNER, V. v.: (1896) Über eine optische Reaktion der Bindesubstanz auf Phenol. S. - B. Akad. Wiss. Wien, math.-nat. Kl. Abt. 3, 103, 162. - 4. FARKAS K., ROJKO A., TANKA D., BÁNYAI B., NEUMARK T.: (1962) A kísérletes lathyrismus befolyásolása. Budapest. — 5. FARKAS K. (1962) Magy. Tud. Akad., Biol. Orv. Oszt. Közl. — 6. Follis, R. H., TONSINIS, A. J.: (1958) Experimental Lathyrism in the Rat. Nature of Defect in Epiphyseal Cartilage. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 98, 843. - 7. JACKSON, D. S.: (1954) The nature of Collagen-Chondroitinsulphate Linkages in Tendon. Biochem. J. 56, 699. - 8. JOBST, K.: (1954) Beiträge zur submikroskopischen Struktur der Fibrinoiden-Degeneration. Acta morph. Acad. Sci. hung. 4, 333. – 9. KEECH, M. K.: (1962) Electron Microscopic Study of the Lathyritic Rat Aorta. J. biophys. biochem. Cytol. 7, 539. – 10. KENNEDY, J. S., KENNEDY, G. D. C.: (1962) Autoradiographic Studies in Experimental Lathyrism. J. Path. Bact. 84, 123. – 11. LALICH, J. J., WIRKA, H. W., ANGEVINE, C. D.: (1962) Influence of Beta-Aminopropionitrile Feeding on Collagen Synthesis in Rat Aortas. Path. et Microbiol. (Basel) 24, 140. - 12. LALICH, J.J.: (1959) Influence of Beta-Aminopropionitrile Concentration upon the Production of Angiorrhexis in Rats. Fed. Proc. 18, 487. - 13. LEWIS, H. B., ESTERER, M. B.: (1943) Experimental Lathyrism in the White Rat. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 53, 263. - 14. MARTIN, G. R., GROSS, J., PIEZ, K., LEWIS, M. S.: On the Intramolecular Cross-Linking of Collagen in Lathyritic Rats. Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 53, 599. - 15. MENZIES, D. W., MILLS, K. W.: (1957) The Aortic and Sceletal Lesions of Lathyrism in Rats on a Diet of Sweet Pea. J. Path. Bact. 73, 223. - 16. MEYER, B. J., Voss, A. C.: (1956) S. Afr. J. med. Sci. 21, 131. - 17. NÉMETH-Csóкл. M.: (1955-56) Untersuchungen über die feinere Structur der elastischen Fasern bei pathologischen Gefässveränderungen. Acta morph. Acad. Sci. hung. 6, 327. - 18. NÉMETH-ČSÓKA M., VISZLÓY K.: (1960) A kísérletes osteolathyrismusos elváltozások polarisatiós optikai vizsgálata. Rheum. Balneol. Allerg. (Budapest) 2, 65. – 19. NEUMARK T., TANKA D.: (1962) Nagverek submikroszkópos elváltozásai különös tekintettel az életkorra. Conference of Hungarian Gerontologists, Budapest. - 20. PONSETI, I. V., SHEPARD, R. S.: (1954) Lesion of Skeleton and of Other Mesodermal Tissues in Rats Fed with Sweet Pea (Lathyrus odoratus) Seeds. J. Bone and Jt. Surg. 36-A, 1031. - 21. PONSETI, I. V., BAIRD, W. A.: (1962) Scoliosis and Dissecting Aneurysm of the Aorta in Rats Fed with Lathyrus odoratus Seeds. Amer. J. Path. 28, 1059. – 22. PYÖRÄLÄ, K., PUNSAR, S., SEPPÄLÄ, T., KARLSSON, K.: (1957) Mucopolysaccharides of the Aorta and Epiphyseal Cartilage in Lathyritic Growing Rats and Rat Fetuses. Acta path. microbiol. scand. 41, 497. - 23. PYÖRÄLÄ, K., SEPPÄLÄ, T., PUNSAR, S.: (1959) Effect of Corticoids, Adrenocorticothrophic Hormone, Thyreotrope and Thyreotrophic Hormone on Aortic Lesion in Experimental Lathyrism. Acta path. microbiol. scand. 45, 37. -24. RAMAMURTI, P., TAYLOR, H. E.: (1958) Histochemical Studies of the Evolution and Regression of Skeletal Deformities Due to Beta Aminopropionitril (BAPN) Lab. Invest. 7, 115. 25. ROMHÁNYI, GY.: (1955) Über die submikroskopische Struktur der elastischen Fasern. Acta morph. Acad. Sci. hung. 5, 311. – 25/a. ROMHÁNYI, GY.: (1962) A polarizációs mikroszkópia a szubmikroszkópos szerkezet kutatásban. Morph. és Ig. Orv. Szemle 2, 161. – 26. Romhányi, Gy.: (1963) Über die submikroskopische strukturelle Grundlage der metachromatischen Reaktion. Acta histochem. (Jena) 15, 201. - 27. SCHMIDT, W. J.: (1938) ed. E. Abderhalden: Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden. Springer, Berlin. Pt. 5/10, P. 827. - 28. SCHWARTZ, C. J.: (1959) The Nature of Ground Substance Changes in Experimental Lathyrism and Their Effect on Atherogenesis in Cholesterol Fed Rabbits. Brit. J. exp. Path. 40, 44. - 29. WALKER, D. G., WIRTSCHAFTER, Z. T.: (1956) Histopathogenesis of Aortic Aneurysms in the Lathyrus Fed Rat. Arch. Path. 61, 125. - 30. WIRTSCHAFTER, Z. T.: (1957) Acid Mucopolysaccharides in the Histopathogenesis of Aortic Aneurysms in the Lathyrus-Fed Rats. Arch. Path. 64, 577. - 31. Žáhor, Z., Czabanova, V.: (1962) The Frequency and Pathogenesis of Aortic Fibro-Elastosis in Foetal Lathyrism in Rats. J. Path. Bact. 84, 209. - 32. ZUGIBE, F. T.: (196?) The Demonstration of the Individual Acid Mucopolysaccharides in Human Aortas Coronary Arteries and Cerebral Arteries. J. Histochem. Cytochem. 10, 448.

SUBMIKROSKOPISCHE STRUKTURÄNDERUNGEN DER AORTA VON RATTEN NACH LATHYRUSFÜTTERUNG

T. NEUMARK und K. FARKAS

Nach lathyrushaltiger Diät sind die submikroskopischen Strukturänderungen der Aorta von weißen Ratten über 100 Gramm Gewicht durch Polarisationsmikroskopie untersucht worden. Die schwersten Läsionen befinden sich im abdominalen Abschnitt der Aorta. Laut der Beobachtungen kommt am frühesten eine Veränderung in der fibrillären Struktur der elastischen Fasern zustande, welcher sich eine vorübergehende Erhöhung der Menge der orientiert eingebauten aziden MPS der Grundsubstanz, nachher ihre hochgradige Abnahme und eine Vermehrung der Kollagenfasern anschließen. In der feineren Struktur der neugebildeten Kollagenfasern läßt sich eine deutliche Abänderung beobachten. Es fällt ferner eine Vermehrung des perivaskulären Bindegewebes entlang der schwer geschädigten Gefäßabschnitten auf. Die Untersuchungen der Verff. sprechen für die Annahme, daß die Lokalisation und der Schweregrad der beim experimentellen Lathyrismus entstandenen Aortaläsionen mit der Grundstruktur der Gefäßwand im Zusammenhang stehen.

ИЗМЕНЕНИЕ СУБМИКРОСКОПИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ АОРТЫ КРЫС ПРИ ЛАТИРУСНОЙ ДИЕТЕ

Т. НЕЙМАРК и К. ФАРКАШ

Авторы исследовали под поляризационным микроскопом изменение субмикроскопической структуры аорты белых крыс с весом больше 100 г, продержанных на латирусной днете. Наиболее тяжелое поражение они наблюдали в брюшном отрезке аорты. По их наблюдениям отклонение наблюдается раньше всего в фибриллярной структуре эластических волокон. К этому присоединяется временное повышение количества кислых мукополисахаридов и затем его понижение и увеличение количества коллагеновых волокон. В тонкой структуре новообразованных коллагеновых волокон наблюдается выраженное отклонение. Бросается в глаза, что вдоль тяжело пораженных отрезков сосудов наблюдается разрастание периваскулярной соединительной ткани. Исследования авторов говорят за то, что локализация и степень тяжести поражений аорты, возникших в связи с экспериментальным латиризмом, связаны с основной структурой сосудистой стенки.

Dr. T. NEUMARK Dr. K. FARKAS Budapest II. Frankel Leó u. 17/19, Hungary

Printed in Hungary

A kiadásért felel az Akadémiai Kiadó igazgatója A kézirat nyomdába érkezett: 1965. I. 18. – Terjedelem: 8,25 (A/5 ív), 103 ábra (37 színes), 6 melléklet

65.60146 – Akadémiai Nyomda, Budapest. – Felelős vezető: Bernát György

THE SECOND INTERNATIONAL CONFERENCE ON PROTOZOOLOGY

will be held at the Imperial College of Science and Technology, London S. W. 7., from 29th July to 5th August, 1965.

Participants hoping to attend should contact the Secretary: Dr. R. S. Bray, London School of Hygiene and Tropical Medicine, Keppel St., London W. C. 1.

Participants wishing to read papers (10 mins each) should communicate the title and a very short account to the Secretary. Abstracts only of papers will be published and abstracts of 450 words or less (unless specially invited) must reach the Secretary by 1st April, 1965.

The official languages will be English, French and Russian. Simultaneous translation into these languages will be provided.

Fees: — Full members £5. 0. 0. (\$14).

Associate members £2.10. 0. (\$7).

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 forints a volume. Orders may be placed with "Kultúra" 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 destinés à la redaction à l'adresse suivante:

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

Toute correspondance doit être envoyée à cette même adresse.

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

On peut s'abonner à l'Entreprise du Commerce Extérieur de Livres et Journaux «Kultúra» (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 «Kultúra» (Budapest I., Fő utca 32. Текущий счет № 43-790-057-181) или его заграничные представительства и уполномоченные.

INDEX

Morphologia Normalis et Experimentalis

Mazsuga, P. M.: Die Morphogenese der Gelenkkapsel und ihrer Blutgefäße	187
Módis, LSüveges, IFöldes, I.: Histochemical Identification of Carbohydrates by Means of Metal Colloids	207
Michailow, S. S.: Einige Gesetzmäßigkeiten der afferenten Innervation der extra- und intrakranialen Venenbildungen	217
Kondics, L. : Die Wirkung von ACTH und Prednisolon auf die funktionale Zonation der Nebenniere bei der Taube (Columba domestica)	233
Gyenge, EOrbán, INagy, J.: Anisotropic Staining of Mast Cell Granules	241
Jobst, K. : Metaphosphoric Acid Reaction of Nucleoproteins	247
Szabó, I.: Combined Staining of Central Nervous System Tissue with Luxol Fast Blue and Basic Fuchsin	251
Banga, ISzabó, D.: Examination of Collagen Fibres Following Treatment with Lyo- tropic Agents	255
Réthelyi, M. – Világhy, M. : On Supposed Direct Reflex Collaterals of Primary Trigeminus Afferents to Motor Cranial Nerve Nuclei	263
Neumark, T Farkas, K.: Submicroscopic Changes of the Aortic Structure in La-	269

26,- Ft

Index: 26.017

Acta Morphologica

Academiae Scientiarum Hungaricae

ADIUVANTIBUS

(////

I. BALÓ, P. ENDES, K. FARKAS, L. HARANGHY, B. KELLNER, I. KROMPECHER, GY. ROMHÁNYI, J. SZENTÁGOTHAI

> redigit I. TÖRŐ

TOMUS XIII * FASCICULUS 4



ACTA MORPH. HUNG.

307.223

ACTA MORPHOLOGICA

A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA ORVOSTUDOMÁNYI KÖZLEMÉNYEI

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

Technikai szerkesztő: 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 »Kultúra« (Budapest I., Fő utca 32. Bankkonto Nr. 43-790-057-181) oder bei seinen Auslandsvertretungen und Kommissionären. Institut für Anatomie, Histologie und Embryologie, und Zentrales Forschungslaboratorium der Medizinischen Universität, Debrecen

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN AM POSTEMBRYONALEN EPIPHYSENKNORPEL DER ALBINORATTE

I. FÖLDES, I. Zs. NAGY, K. BENKŐ, G. LÉVAI und P. ARY-BALOGH

(Eingegangen am 28. Juni, 1963)

Die Ultrastruktur des proximalen Epiphysenknorpels der Rattentibia wurde im Alter von 5 bis 90 Tagen untersucht. Im Epiphysenknorpel sind sechs verschiedene Zelltypen zu unterscheiden, welche – ausgenommen die 5 Tage alten Tiere – vom Alter unabhängig aufzufinden sind. Parallel mit der Entwicklung dieser Zelltypen sind an ihnen drei sekretorische Phänomene zu beobachten.

1. In der Restzellen- und im oberen Teil der Proliferationszone (Zelltypen A und B) enthalten die Zellen im Plasma einen gegen dieses nicht scharf abgrenzbaren, zum Teil feinkörnigen Stoff in großer Menge; die Körnchen dürften dem Glykogen entsprechen, der homogene Teil ist der afibrillären Grundsubstanz ähnlich.

 In den Zellen vom Typ B und C der Proliferationszone herrschen die erweiterten Bläschen des Golgi-Komplexes vor, deren Inhalt – was seine Dichte anbetrifft – der afibrillären Grundsubstanz ähnlich ist. Da letztere histochemisch den sauren Mukopolysacchariden (Chondroitinsulfat) entspricht, erscheint die Annahme berechtigt, daß die Mukopolysaccharidesynthese ihren Anfang im Golgi-Komplex nimmt.
 3. Vor allem in den Zellen vom Typ D der Proliferationszone, im geringen Maße

3. Vor allem in den Zellen vom Typ D der Proliferationszone, im geringen Maße aber auch in den Zellen vom Typ E im oberen Abschnitt der Reifungszone stehen die sackartig erweiterten Zisternen des Ergastoplasmas im Vordergrund, deren Inhalt mit dem von KNESE und KNOOP (1961) gefundenen Mukopolysaccharid-Protein-Komplex identisch sein dürfte; möglicherweise besteht der Zisterneninhalt nur aus Protein.

Infolge des Unterganges der Zellorganellen ist in den tieferen Schichten des Epiphysenknorpels keine Sekretion mehr anzunehmen. In diesen Schichten findet eine Zelldestruktion statt, woran eine aktive Beteiligung bestimmter Zelltypen (Chondroklasten) nicht nachzuweisen war.

Einleitung

Untersuchungen über die Ultrastruktur des Knorpels nahmen ihren Anfang im vorigen Jahrzehnt. Die erste einschlägige Arbeit — über die Ultrastruktur des Epiphysenknorpels junger Katzen — ist jene von Scott und PEASE (1956). CAMERON und ROBINSON (1958) beschrieben die Ultrastruktur des Epiphysen- und Gelenkknorpels am Femur Neugeborener, TOUSIMIS und FOLLIS (1958) berichteten über die Untersuchung des Epiphysenknorpels der Ratte mit dem Elektronenmikroskop. Die Ultrastruktur des Gelenkknorpels wurde am Meerschweinchen, bei der Maus und bei der Ratte von ZELANDER (1959) untersucht, GODMAN und PORTERS Ergebnisse hinsichtlich der embryonalen Chondrogenese bei der Ratte wurden veröffentlicht. Die Bildung des Mukopolysaccharid-Protein-Komplexes der Knorpelgrundsubstanz wurde am Epiphysenknorpel bei der Ratte und am Kalb von KNESE und KNOOP (1961)

> TUDORARYOS AKANINA KONYVIAR

1

untersucht. Die Ultrastruktur des Gelenkknorpels verschieden alter Mäuse ist von Silberberg und Silberberg (1961) beschrieben worden.

Da die erwähnten Untersuchungen — vor allem in bezug auf den Epiphysenknorpel — embryonales Material betreffen, ist die Ultrastruktur des Epiphysenknorpels (nachfolgend Ep.) im postembryonalen Leben nicht genügend bekannt. Insbesondere bezieht sich das auf die parallel mit der Ossifikation einhergehenden Veränderungen, die wir selbst mittels lichtmikroskopischer und histochemischer Untersuchungen vorausgehend beobachtet haben (FÖLDES, MÓDIS und SÜVEGES) (im Druck).

Der Zweck der nachfolgend berichteten Untersuchungen war, eine weitere Klärung der Ultrastruktur des Ep., verläßliche Grundlagen zum Vergleich des Ep. verschieden alter Tiere zu schaffen.

Material und Methoden

Die Untersuchungen wurden an 5, 20, 35, 50 und 90 Tage alten Albinoratten ausgeführt. Der freipräparierte proximale Tibia-Ep. (bzw. am 5 Tage alten Tier der dieser entsprechende Abschnitt) wurde im mit Veronalacetat auf pH 7,2 gepufferten 1% OsO₄ bei 4° C über 2 Stunden fixiert. Nach dreimaligem Waschen von je 20 min. Dauer in dest. Wasser und Entwässerung in Alkoholserien erfolgte die Kontrastierung mit Uranylacetat. Einbettung in ein 4:1 Gemisch von Butyl- und Methylmetakrylat; Polymerisation bei 56° C über 24 Stunden, in Anwesenheit von 1% Benzoylperoxid. Die Schnitte wurden mit einem LKB Ultratom, die Aufnahmen bei 2000, 3000, 6000 und 12 000× Vergrößerung mit dem Zeiss D 2 Elektronenmikroskop hergestellt. Die photographische Nachvergrößerung ist 2–5fach.

Die einzelnen Schichten des Ep. sind nach den Vorschlägen von HAM benannt.

Ergebnisse

Im Ep. sind 6 Zelltypen zu unterscheiden, die wir mit A-F bezeichnen. Zelltyp A: Zellen dieser Art sind in den obersten Schichten des Ep. zu finden, wo der Säulenknorpel noch kein geordnetes Aussehen aufweist; dies entspricht der Restzellenzone.

Die Zellen sind im allgemeinen oval, auf der einen Seite mitunter eingedellt. Der Kern liegt zumeist exzentrisch und ist von großer Dichte. Der Zelleib ist größtenteils von einer weniger dichten, körnigen Masse ausgefüllt, welche von der Kernmembran nur durch einen schmalen Hyaloplasmasaum getrennt ist. Nach außen, gegen die Zellmembran zu, liegt ebenfalls nur ein schmaler Ektoplasma-Saum. In der Masse in den Randpartien der Zelle, jedoch in Berührung mit dem Kern liegen die übrigen Bestandteile. Hier sind die Lamellen des Ergastoplasmas wahrzunehmen; der Spalt zwischen diesen erweitert sich stellenweise zu einer, eine homogene Masse von mittlerer Dichte enthaltenden Zysterne. Atypische kleine Mitochondrien kommen hier auch vor, ebenso die feinen Bläschen der Golgischen Substanz. Die Zelloberfläche erscheint wegen der zahlreichen kurzen Fortsätze uneben. In der Nähe der Zelle liegt die feine Fasern enthaltende Grundsubstanz (Abb. 1 und 2).

Zelltyp B: Zellen dieser Art sind zwischen der Zone der Restzellen und der geordneten Knorpelzellsäulen vorzufinden. Sie unterscheiden sich vom Typ A darin, daß sie eine flachere Form aufweisen und weniger körniges Material enthalten. Zugleich tritt im Plasma eine homogene Masse von geringer Dichte in Erscheinung. Die gleiche Masse ist in den erweiterten Golgischen Bläschen zu sehen, die gruppenweise geordnet vorkommen und eine Größe bis zu 1 μ aufweisen. Auch in der Umgebung der Zelle ist dieselbe Masse als afibrilläre Grundsubstanz wahrzunehmen. An der Zellmembran sind Öffnungen zu sehen; scheinbar tritt die homogene Masse durch diese Öffnungen aus der Zelle heraus. Die Oberfläche ist auch bei diesem Zelltyp uneben (Abb. 3 und 4).

Zelltyp C: Zellen dieser Art sind im oberen Abschnitt der Proliferationszone zu finden, wo die Zellen bereits in Säulen angeordnet sind. Dieser Zelltyp entspricht der von Scott und PEASE beschriebenen Proliferationszelle.

Die Zellen vom Typ C sind abgeflacht, im Zelleib fehlt das Material von geringer Dichte, zugleich ist in der Umgebung der Zelle die afibrilläre Grundsubstanz vermehrt. Der Zellkern ist nach wie vor von großer Dichte und exzentrisch gelagert. Die Organellen füllen das Zytoplasma völlig aus. Charakteristisch für die Zelle ist ihre starke Dichte. Weiterhin sind in der Zelle erweiterte Golgische Bläschen zu sehen, die über das Gesamtgebiet des Zelleibs verstreut liegen. Die Lamellen des Ergastoplasmas weisen einen parallelen Verlauf auf, zwischen ihnen liegen stellenweise zisternenartige Erweiterungen, die von einer Substanz mittlerer Densität ausgefüllt sind. Im Zytoplasma sind reichlich dichte Körnchen zu sehen, welche den Paladeschen Granula ähnlich sind. Verstreut sind auch Mitochondrien wahrzunehmen. Die Oberfläche der Zelle ist von Fortsätzen besetzt; diese sind länger als bei den oben beschriebenen Zelltypen und durchweben die afibrilläre Grundsubstanz (Abb. 5).

Zelltyp D: Zellen dieser Art sind in den tieferen Schichten der Proliferationszone zu sehen. Im Vergleich zum Zelltyp C sind diese von verminderter Densität, infolge der Auflockerung der Zellstruktur. Infolgedessen vergrößern sich die Zellen allmählich, anfänglich sind sie länglich, späterhin runden sie sich ab. In den sich abrundenden Zellen nimmt der Kern eine zentrale Lage ein; zugleich erscheint die Zelloberfläche gelappt.

Das Zytoplasma ist zum größten Teil vom endoplasmatischen Reticulum besetzt. Es sind parallele Lamellenpaare zu sehen, die miteinander anastomisieren. Recht häufig kommt eine zysternenartige Erweiterung des interlamellären Spaltes vor. Die Spalten und Zisternen sind mit einer mitteldichten Substanz gefüllt. Längs der Lamellen sind Reihen von Granula zu sehen. In der Mehrzahl sind Zisternen in der Nähe der Zelloberfläche zu finden. Die erweiterten Bläschen der Golgischen Substanz befinden sich verstreut im Plasma, es sind aber auch juxtanuklear Anhäufungen derartiger Bläschen wahrzunehmen. Mitochondrien kommen in geringer Zahl vor. Die Zelloberfläche ist von unregelmäßigen Fortsätzen besetzt; diese reichen bis zur fibrillären Grund-

285



Abb. 1. Zelle vom Typ A aus dem Epiphysenknorpel eines 21 Tage alten Tieres. Abkürzungen für sämtliche Abbildungen: Gl — Glykogen: K — Zellkern; Er — Ergastoplasma; Zi — Zisternenartige Erweiterungen zwischen den Lamellen des Ergastoplasmas; G — Golgische Substanz; Af — Afibrilläre Grundsubstanz; F — Fibrilläre Grundsubstanz; C — Verkalkung in der Grundsubstanz; M — Mitochondrium; N — Nucleolus; H — Homogene Substanz in der Zelle



Abb. 2. Zelle vom Typ A in einem 35 Tage alten Tier. Näheres s. im Text



Abb. 3. Zellen vom Typ B in einem 5 Tage alten Tier. Die Pfeile weisen auf Öffnungen der Zellmembran



Abb. 4. Zelle vom Typ B in einem 5 Tage alten Tier. Der Pfeil weist auf eine Öffnung der Zellmembran



Abb. 5. Zelle vom Typ C in einem 50 Tage alten Tier



Abb. 6. Übergang zwischen Zelltyp C und D in einem 21 Tage alten Tier Acta morph. tomus XIII.

substanz. Die afibrilläre Grundsubstanz besteht aus einer homogenen Masse, welche nur wenige Fasern enthält (Abb. 7 und 8).

Zelltyp E: Diese Zellen sind im oberen Abschnitt der Reifungszone, in der Nähe der Zellen vom Typ D zu beobachten. Die Zellen sind rund, von geringer Densität, ihr Zytoplasma ist aufgelockert. Das Ergastoplasma ist



Abb. 7. Teil einer Zelle vom Typ D in einem 35 Tage alten Tier

fragmentiert, zisternenartige Erweiterungen sind nur vereinzelt zu finden. Zerstreut im Plasma liegen Golgische Bläschen die mit einer mäßig dichten Substanz gefüllt sind. Der Zellkern ist gelappt; im Kern sind Anfänge herdförmiger Konglomerate zu sehen. An der Oberfläche der Zelle befinden sich Fortsätze, welche bis in die fibrilläre Grundsubstanz reichen. In der fibrillären Grundsubstanz sind um diese Zellen stellenweise die Anfänge einer Kalkablagerung wahrzunehmen (Abb. 9 und 10).

Zelltyp F: Zellen dieser Art sind an der Grenze der Verkalkungszone zu finden. Die Zellen sind geschrumpft, in der Grundsubstanz ist überall Kalk-



Abb. 8. Zelle vom Typ D in einem 5 Tage alten Tier

ablagerung zu beobachten. Die Kernsubstanz ist geschrumpft, zuletzt bleibt statt des Kerns nur ein ovaler Fleck von starker Densität. Die Plasmabestandteile verlieren ihre charakteristischen Eigenheiten und nehmen das Bild eines unregelmäßigen Netzes auf (Abb. 12).



Abb. 9. Zelle vom Typ E in einem 35 Tage alten Tier

In der Verkalkungszone sind die Zellen völlig degeneriert; es bleibt lediglich ein fragmentarisches Netz an ihrer Stelle zurück. Mit der Progression der Verkalkung der Grundsubstanz erfolgt von der Metaphyse her der Einbruch von Gefäßen in die Knorpelhaut und es treten Osteoblasten auf.

291



Abb. 10. Teil einer Zelle vom Typ E in einem 21 Tage alten Tier



Abb. 11. Übergangsform zwischen Zelltyp E und F in einem 50 Tage alten Tier



Abb. 12. Zelle vom Typ F in einem 35 Tage alten Tier



Abb. 13. Osteoblast aus der Verknöcherungszone in einem 50 Tage alten Tier

Diskussion

Die von uns untersuchten Ep. stammen von 5 bis 90 Tage alten Tieren. Wir haben diejenigen Zelltypen beschrieben, die in den einzelnen Schichten des Ep. unabhängig vom Alter zu finden waren. Eine Ausnahme bilden nur die von 5 Tage alten Tieren stammenden Präparate, in denen nur Zellen vom Typ A, B und C zu finden waren. Zwischen den verschiedenen Zelltypen gibt es Übergangsformen, man findet aber auch Bilder mit Zellen von verschiedenem Typ in unmittelbar benachbarten Schichten.

Die Zellen der einzelnen Knorpelzonen überblickend waren drei verschiedene Sekretionsphänomene zu beobachten:

1. Der in den Zellen vom Typ A beobachtete körnige Stoff von geringer Dichte, der das Zellplasma in verschiedenem Maß ausfüllt, entspricht der von GODMAN und PORTER (1960) im embryonalen Knorpel beobachteten Glykogenablagerung. Mit Rücksicht auf den histochemischen Nachweis von großen Glykogenmengen in den Zellen desselben Gebietes des Ep. (SCHAJOWICZ 1958) sowie auf den Umstand, daß diese Schicht des Ep. die besternährte sein dürfte (HOLMDAHL und INGELMARK 1948, TRUETA und MORGAN 1960), ist die Annahme berechtigt, daß diese Körnchen tatsächlich einer zellulären Glykogenspeicherung entsprechen. Da in den gleichen Untersuchungen in der afibrillären

Grundsubstanz kein Glykogen nachgewiesen wurde, kann es keinem Zweifel unterliegen, daß die afibrilläre Grundsubstanz nicht mit dem Glykogen identisch ist; sie kann hingegen mit der in den Zellen vom Typ B beobachteten homogenen Masse identisch sein. So ist die Annahme berechtigt, daß das Glykogen intrazellulär eine Änderung erfährt, bzw. an der Bildung der afibrillären Grundsubstanz beteiligt ist. Von GODMAN und PORTER (1960) werden die glykogenhaltigen Zellen als hypertrophisch bezeichnet. Der Unterschied ist nur nomenklatorischer Art, der sich daraus ergibt, daß die embryonale Anlage des Ep. unseres Erachtens schwer mit den Verhältnissen des postembryonal entstandenen Ep. zu vergleichen ist.

2. Golgische Bläschen wurden in allen Zellen, außer Typ F, nachgewiesen; die höchste Aktivität scheint in den Zellen vom Typ B, C und D vorzuliegen. Da in der Literatur über die Funktion des Golgi-Komplexes keine einheitliche Meinung herrscht (DE ROBERTIS, NOWINSKI und SAEZ 1956, HAM 1957, BARGMANN 1959), können wir bei der Beurteilung ebenfalls nur auf Hypothesen Bezug nehmen. Der Umstand, daß Glykogen aus der Zelle nicht entleert wird, und seine Umwandlung gleichzeitig mit einer verstärkten Aktivität des Golgi-Komplexes vor sich geht, läßt zwischen den beiden Phänomenen einen Zusammenhang vermuten. Es liegen autoradiographische Befunde vor (BÉLANGER 1954, PELC 1955, ENGFELDT und WESTERBORN 1960), wonach das Maximum der saueren Mukopolysaccharidenbildung gerade auf die Proliferationszone lokalisiert ist. Dieser Befund läßt wiederum einen Zusammenhang zwsichen Mukopolysaccharidbildung und Golgi-Komplex vermuten. Hierfür sprechen auch die Angaben von GODMAN und PORTER (1960), wonach die Golgische Substanz ihre höchste Entwicklungsstufe in den Chondroyten erreicht und die der Zelloberfläche nahe liegenden Bläschen ihren Inhalt zu entleeren scheinen. An Hand unserer Untersuchungen ist die Möglichkeit in Erwägung zu ziehen, daß der Inhalt der Golgischen Bläschen nicht unmittelbar aus der Zelle entleert wird, sondern zunächst der Inhalt mehrerer Bläschen innerhalb der Zelle konfluiert und es erst dann zur Entleerung aus der Zelle kommt.

3. Das dritte Sekretionsphänomen stellen die zisternenartigen Erweiterungen des endoplasmatischen Reticulums dar. Sie kommen in der größten Zahl in Zellen vom Typ D vor. Die PAS positive Substanz, welche von KNESE und KNOOP (1961) für einen Mukopolysaccharid-Protein-Komplex gehalten wird, ist histochemisch zuerst in den untersten Schichten der Proliferationszone nachzuweisen, in der Grundsubstanz zwischen Zellen vom Typ D. KNESE und KNOOP sind der Meinung, daß der Mukopolysaccharid-Protein-Komplex in den Zisternen des Ergastoplasmas erzeugt wird. Unseres Erachtens ist aber auch die Möglichkeit in Erwägung zu ziehen, daß die Zisternen des Ergastoplasmas nur das Protein produzieren. Dies stimmt mit der allgemeinen Ansicht über die Funktion des Ergastoplasmas gut überein (DE ROBERTIS, NOWINSKI

und SAEZ 1956, HAM 1957, BARGMANN 1959). Die Mukopolysaccharide dürften von dem, auch hier anwesenden Golgi-Komplex erzeugt werden. Eine Stütze dieser Auffassung bildet die allerdings in Chondroblasten gemachte Feststellung von GODMAN und PORTER (1960), wonach zwischen den Zisternen des Ergastoplasmas und dem Inhalt der Golgischen Bläschen ein Zusammenhang besteht.

Die berichteten Sekretionsphänomene und ihre Deutung lösen die vorliegenden Probleme durchaus nicht; zur Klärung der gegenseitigen Zusammenhänge zwischen den einzelnen Phänomenen und zur chemischen Identifizierung der verschiedenen Sekrete sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Im oberen Teil der Reifungszone, angefangen in den Zellen vom Typ E, beginnt gleichzeitig mit der Verkalkung der Grundsubstanz ein langsamer Destruktionsprozeß, der nach Scott und PEASE (1965) mit der Dehydration zusammenhängen dürfte. In ihren Hauptmerkmalen sind die Zellen vom Typ E jenen vom Typ D weitgehend ähnlich; sie enthalten noch Golgische Bläschen und, in verringerter Zahl, mäßig weite Zisternen des Ergastoplasmas. Diese Befunde sind dahin zu deuten, daß in den Zellen noch eine gewisse Sekretionstätigkeit vor sich geht, die Intensität derselben jedoch bereits stark nachgelassen hat.

Die Zellen vom Typ F weisen deutliche Zeichen der Destruktion auf. Es sind keine Zellorganellen nachzuweisen. Unseres Erachtens kann im Zusammenhang mit diesen Zellen von einer aktiven Sekretion keine Rede sein. Die Destruktion der Zelle wird in der Verkalkungszone beendet. Nach unseren Beobachtungen sind am Untergang der Knorpelzellen keine spezifischen zerstörenden Zellen (Chondroklasten) beteiligt.

LITERATUR

1. BARGMANN, W.: (1959) Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. - 2. BÉLANGER, L. F.: (1954) Autoradiographic Visualisation of Entry and Transit of S35 in Cartilage, Bone and Dentine of Young Rats and Effect of Hyaluronidase in Vitro, Canad. J. Biochem. 32, 161-169. - 3. CAMERON, D. A. ROBINSON, R. A.: (1958) Electron Microscopy of Epiphyseal and Articular Cartilage Matrix in the Femur of the Newborn Infant. J. Bone Jt. Surg. 40 A. 163-170. - 4. DE ROBERTIS, E. D. P., NOWINSKI, W. W., SAEZ, E. A.: (1956) General Cytology, W. B. Saunders, Philadelphia, London. - 5. ENGELDT, B., WESTERBORN, O.: (1960) An Autoradiographic Study of the Epiphyseal Cartilage in Normal Rabbits after Administration of Radiosulphate. Acta path. microbiol. scand. 49, 73-81. 6. FÖLDES, I., MÓDIS, L., SÜVEGES, I.: (IM Druck) – 7. GODMAN, G. C., PORTER, K. R.: (1960) Chondrogenesis Studied with the Electronmicroscope. J. biophys. biochem. Cytol. 8, 719– 760. - 8. HAM, A. W.: (1957) Histology, J. B. Lippincott. Co. Philadelphia. - 9. HOLMDAHL, D. E., INGELMARK, B. E.: (1948) Der Bau des Gelenkknorpels unter verschiedenen funktionellen Verhältnissen. Acta anat. (Basel) 6, 309-375. - 10. KNESE, K. H., KNOOP, A. M.: (1961) Über den Ort der Bildung des Mukopolysaccharid-Protein-Komplexes im Knorpelgewebe. Z. Zellforsch., 53, 201-258. - 11. PELC, S. R., GLÜCKSMANN, A.: (1955) Sulphate Metabolism in the Cartilage of the Trachea, Pinna and Xiphoid Process of Adult Mouse as Indicated by Autoradiographs. Exp. Cell. Res., 8, 336-344. - 12. Schajowicz, F. M. D., Cabrini, R. L. M. D.: (1958) Histochemical Studies on Glycogen in Normal Ossification and Calcification. J. Bone Jt. Surg., 40, A. 1081-1092. - 13. Scott, B. L., PEASE, D. C.: (1956) Electron Microscopy of the Epiphyseal Apparatus. Anat. Rec. 126, 465-495. - 14. SHELDON, H., ROBINSON, R. A.: (1960) Studies on Cartilage. II. Electronmicroscopic Observations on Rabbit Ear

297

Cartilage Following the Administration of Papain. J. biophys. biochem. Cytol., 8, 151–163. – 15. SILBERBERG, R., SILBERBERG, M., VOGEL, A., WETTSTEIN, W.: (1961) Ultrastructure of Articular Cartilage of Mice of Various Ages. Amer. J. Anat., 103, 251–275. – 16. TOUSIMIS, A. J., FOLLIS, R. H.: (1958) Ultrastructure of Rat Epiphyseal Cartilage. Fed. Proc. 17, 460. – 17. TRUETA, J., MORGAN, J. D.: (1960) The Vascular Contribution to Osteogenesis. J. Bone Jt. Surg. 42, B. 97–109. – 18. ZELANDER, T.: (1959) Ultrastructure of Articular Cartilage. Z. Zellforsch. 49, 720–732.

ELECTRON-MICROSCOPIC EXAMINATION OF THE POST-EMBRYONIC EPIPHYSEAL CARTILAGE OF WHITE RATS

I. FÖLDES, I. ZS. NAGY, K. BENKŐ, G. LÉVAI, and PIROSKA ARY-BALOGH

The ultramicroscopic structure of the proximal epiphyseal cartilage of the tibia has been studied in rats ranging in age between 5 and 90 days. Six different cell types were found to exist in the epiphyseal cartilage. Except in 5-day old animals — their occurrence was independent of age. Along with the development of these types three secretory phenomena can be observed.

(1) Cells of types A and B contain in their cytoplasm a great abundance of finely granular substance which is not sharply distinguishable from the cytoplasm; the granules presumably represent glycogen, while the homogeneous part is suggestive of afibrillar ground substance.

(2) In cells belonging to types B and C of the proliferation zone, the distended vacuoles of Golgi's apparatus are predominant; the density is similar to that of the afibrillar ground substance. Considering that the latter is histochemically equivalent to acid mucopolysaccharides (chondroitin sulphate), it is safe to assume that synthesis of mucopolysaccharides starts in the Golgi apparatus.

(3) Cells of type D in the proliferation zone and, to some extent, also cells of type E in the upper part of the maturation zone are characterized by distended ergastoplasmic cisterns: their contents may be identical with the mucopolysaccharide-protein complex demonstrated by KNESE and KNOPP in 1961. It is likewise possible that the cisterns only contain protein.

Owing to the disappearance of cell organelles no secretory activity can be noted in the deeper layers of the epiphyseal cartilage. A destruction of cells takes place in these layers, and no chondroclastic activity has seen observed in them.

ЭЛЕКТРОННОМИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОСТЭМБРИОНАЛЬНОГО ЭПИФИЗАРНОГО ХРЯЩА У КРЫС-АЛЬБИНОСОВ

И. ФЁЛЬДЕШ, И. Ж. НАДЬ, К. БЕНКЁ, Г. ЛЕВАИ и П. АРИ-БАЛОГ

Ультраструктура проксимального эпифизарного хряща большеберцовой кости была исследована у 5—90-дневных крыс. В эпифизарном хряще можно различать шесть клеточных типов, которые обнаруживаются — за исключением 5-дневных животных независимо от возраста. Параллельно развитию этих клеточных типов у них можно выявлять три секреторных явления.

1. В зоне остаточных клеток и в верхней части зоны пролиферации (клеточные типы А и Б) в плазме клеток содержится большое количество отчасти тонкозернистого вещества, который нельзя резко отграничить от плазмы. Зернышки по всей вероятности соответствуют гликогену, а однородная часть подобна фибриллярному основному веществу.

2. В клетках типа Б и В пролиферационной зоны господствуют расширенные пузырьки аппарата Голджи; содержимое пузырьков — в отношении густоты — подобно афибриллярному основному веществу. Так как последний гистохимически соответствует кислым мукополисахаридам (хондроитинсульфату), кажется обоснованным предполагать, что синтез мукополисахаридов начинается в аппарате Голджи.

3. Прежде всего в клетках типа Г зоны пролиферации, но в незначительной мере и в клетках типа Д верхней части зоны созревания на переднем плане находятся расширенные цистерны эргастоплазмы, содержимое которых предположительно соответствует

мукополисахаридно-протеиновому комплексу, обнаруженному Кнезе и Кноппом (1961 г), но возможно и то, что содержимое цистерны состоит исключительно только из протеина.

Вследствие разрушения клеточных органелл в более глубоких слоях эпифизарного хряща нельзя предполагать секрецию. В этих слоях происходит распад клеток. Не удалось выявить активного участия определенных типов клеток (хондрокластов) в этом процессе.

Dr. István Földes: Dr. Imre Zs. NAGY: Dr. Imre Zs. NAGY: Dr. Károly Велкő: Debrecen, Anatómiai Intézet, Ungarn Dr. Geza Lévai: Dr. Piroska Ary-Balogh:



Institute of Pathology (Director: Prof. Gy. ROMHÁNYI), University Medical School, Pécs

QUANTITATIVE CYTOPHOTOMETRIC DETERMINATION OF NUCLEAR PROTEINS AFTER ALKYLATION

K. Jobst

(Received January 2, 1964)

Cytophotometric studies have been made for the quantitative determination of the basic nucleoproteins in smears of calf thymus and bull sperm methylated with diazomethane and stained with pH 8.1 fast green. The acid dye uptake, and consequently the basic protein content, of the alkylated preparations was closely similar to what was found in nuclei pretreated by the ALFERT-GESCHWIND method. No change was noted in the arginine content of nuclei extracted with trichloroacetic acid and blocked with diazomethane. On the basis of the results it is surmised that diazomethane blocks exclusively the phosphate groups of desoxyribonucleic acid and does not react with the basic amino groups of proteins. Therefore, from the uptake of acid dyes after alkylation with diazomethane conclusions can be drawn as to the quantitative distribution of basic nucleoproteins. Preparation of diazomethane and the experimental conditions of alkylation are described in detail.

The complex chemical structure of the cell nucleus is well known from biochemical and cytochemical studies [5, 32]. Of the components, electronegative desoxyribonucleic acid (DNA) was long ago demonstrated by means of basic dyes [8], whereas the basic protein-histon component only some ten years ago [2].

This may be due to the fact that the nuclear DNA: histone ratio indicates a preponderance of DNA [5], thus with the close inner electrostatic connection between the two components it is only the excess negativ charge of the DNA molecule which becomes manifest. This is why it is first of all with positive dyes that the nuclei stain, viz., the negative DNA excess overshadows the positive charges of histone, occupies its positive radicals that would combine with negative dyes and thereby inhibits the formation of linkages with acid dye molecules [5, 23]. However, if the electrostatic equilibrium between the two nuclear components of opposite character is shifted in favour of the proteins, the resulting preponderance of the basic proteins allows them to be demonstrated histologically. This is best achieved by extracting the DNA from the desoxyribonucleo-protein complex.

Besides various other procedures [18, 21, 26, 29, 33], ALFERT and GESCHWIND's fast green method, based on the trichloroacetic acid extraction of DNA from the nuclei, is used most extensively for the histological demonstration of nuclear proteins. However, our spectrophotometric measurements indicated traces of protein in the trichloroacetic acid eluate of the thymus sections (see: Results, II/c). An attempt was therefore made to eliminate the electronegative phosphate groups of DNA by chemical reaction.

After FRAENKEL-CONRAT [14] it was suggested [34] that the acid groups should be eliminated by methanol-HCl alkylation, which is done today according to WIGGLESWORTH [36] and FISHER—LILLIE [12]. It has been found, however, that besides the degradation of both DNA [7] and protein, the amino groups of the latter are also alkylated in the course of the reaction [20, 26, 34]. For this reason we blocked the phosphate groups of DNA with the more effective and selective diazomethane, applied by PETERS [27] for methylation of the carboxyl groups of proteins in histological preparations.

Diazoalkanes, thus also diazomethane, will first of all alkylate acid compounds and such groups as contain active hydrogen

$$\begin{array}{c} H_2C=N\equiv N\,+\,HO-C-R{\longrightarrow}H_3C{\longrightarrow}O-C{\longrightarrow}R\,+\,N_2\\ \parallel\\ O\\ \end{array}$$

and, to a smaller extent, other polarizable molecules [13]. As end products, esters or ethers are obtained. The presence of blocking of acid hydrogen in the sections can be inferred from the changes in basophilia following upon methylation.

Our preliminary experiments showed a marked decrease and then disappearance of the basophilia of nuclei continually treated with diazomethane. At the same time, the nuclear pattern obtained on fast green staining at pH 8.1 was apparently the same as that produced by the original ALFERT—GESCHWIND method (extraction with trichloroacetic acid, *Fig. 1*). This observation was interpreted to mean that after diazomethane blocking fast green might also be used for the quantitative demonstration of nuclear proteins, and in this way an insight might be gained into the selectivity and specificity of the protein (histone)-diazomethane reaction. Therefore cytophotometric studies were made to compare the results obtained after pretreatment with diazomethane and staining with pH 8.1 fast green with those yielded by the original ALFERT—GESCHWIND reaction [2]. No significant difference in acid dye uptake could be demonstrated between the nuclei pretreated with the two different methods.

Material and methods

Materials. Calf thymus fixed in formalin, or occasionally in alcohol, as well as smears of bull sperm were used. Paraffin-embedded and frozen sections were made.

Staining methods. Gallocyanin-chromalune according to EINARSON; 0.05 per cent toluidine blue dissolved in pH 3.5 veronal-acetate buffer; Feulgen's reaction to demonstrate nucleic acids; pH 8.1 fast green; naphthol yellow S; and BAKER's modification of the arginine reaction [3] were used for the demonstration of basic proteins, guanidine derivatives.

QUANTITATIVE CYTOPHOTOMETRIC DETERMINATION OF NUCLEAR PROTEINS

Methods of blocking and extraction [16]. Amino groups were blocked with nitrous acid according to van Slyke, or with Chloramine-T. Acid radicals were alkylated partly according to FISHER and LILLIE with methanol-HCL [12], dimethylsulphate [4, 10], and partly with diazomethane.

Preparation of diazomethane [16, 17]. Thirty g of NaNO₂ are dissolved in 60 ml of water cooled to 0° C. To this, are added 30 g of methylurea (Light) in 180 ml of water cooled to 0° C, then, dropwise, 150 ml sulphuric acid, cooled to 0° C, under constant chilling in ice and mechanical stirring. The N-nitrosomethylurea precipitating in the form of crystals is sucked off, washed with ice-water, dried in vacuo and recrystallised in 2 volumes of methanol. The yield is approximately 30 g. The crystals are light yellow, and melt at 124°C. As N-nitrosomethylurea decomposes on storage, quantities sufficient for 5 or 6 experiments are prepared at a time, and stored in a refrigerator.



Fig. 1. Calf thymus nuclei stained with pH 8.1 fast green (oil-immersion),
 a) After trichloroacetic acid extraction according to Alfert and Geschwind,
 b) Following methylation with diazomethane

Diazomethane (a poisonous gas) is prepared from 5 g of N-nitrosomethylurea with 50 per cent KOH in a fractionating flask; the liberated gas is collected in 60 ml absolute ether. After distillation of the ether, 50 ml of an intensive yellow solution is obtained. The actua diazomethane content of this was not titrated in every case, but by using the same relative concentrations throughout, an excess of diazomethane, required for complete methylation, was ensured.

Diazomethane treatment of sections. Sections deparaffinized in xylol were carried through ether, carefully avoiding water and alcohol, into the given volume of diazomethane solution. Using a vessel with 8 compartments 16 sections were simultaneously alkylated with 50 ml of the solution. At 20°C the reaction starts immediately, with intensive gas (N_2) formation, later the reagent gradually loses its colour and gas formation ceases. This indicates completion of the section, which takes place usually after 2 hours. The sections were then carried through ether and alcohol into water and the control nuclear stains were applied. Methylation with diazomethane did not destroy the sections. It is important to dissolve the reagent in absolute ether, and the sections must be practically free of water.

The stained preparations were subjected to quantitative cytophotometry by means of a Lison-type histophotometer [30] used in our Institute since 1961 and modified as suggested by SANDRITTER (for technical details, see [28]). Light from a 100 W point was projected through a Stanko UM2 monochromator, 0.3 N. A. condenser, $\times 7$ eyepiece and $\times 100$ lens, interposing the dividing prism of the photographic attachment to an RCA 1P28 electronmultiplier with a 2 mm stop. With a projection of 105 cm, magnification was \times 3500, so that objects larger than 1 μ could be measured. The usual slit of the monochromator was 0.02 mm. The scanning technique was used, taking up 3 or 6 points. The results are expressed in arbitrary units (AU), obtained by multiplying the mean extinction by the photographed cell area expressed in

square microns. The wavelengths of measurements were 547 m μ for the Feulgen reaction, 585 m μ for preparations stained with fast green, and 510 m μ for those stained for arginine.

In the extraction studies 50 formalin-fixed 15 μ thick frozen sections of thymus tissue were extracted for 30 minutes with 96 per cent alcohol and xylol and then treated for 15 minutes with 30 ml of 5 per cent 95° trichloroacetic acid. Further 50 sections were treated with 30 ml of diazomethane solution at room temperature for 2 hours. The supernatants were removed by distillation then taken up in 100 ml of warm 5 N HCl. The solutions were diluted in a ratio of 1 to 10 and their absorption was estimated in a Beckman spectrophotometer.



Fig. 2. Graphic representation of the results of cytophotometric measurements made in bull sperm smears and calf thymus stained with pH 8.1 fast green. Upper columns: results after extraction of DNA with trichloroacetic acid. Lower columns: results after methylation with diazomethane

Results

I. Protein staining

a) Staining. Quantitative dye-binding of calf thymus and the bull sperm smears extracted with trichloroacetic acid according to ALFERT and GESCHWIND and stained with pH 8.1 fast green are presented in Fig. 2, which, in addition, shows the results obtained on pretreatment with diazomethane instead of trichloroacetic acid, followed by staining in the same

way. No substantial difference was found in the basic dye content of the nuclei after the two different types of pretreatment, the histone contents were distributed in the same way in the haploid spermatozoa and diploid thymic nuclei [31]. The slightly higher fast green values found after pretreatment with diazomethane are within the limits of error of the method (b = 0.3 - 1.2).



Fig. 3. Graphic representation of quantitative results of the arginine reaction (Baker). The two lower columns show values obtained after alkylation with diazomethane

For this reason the cytophotometric measurements alone cannot decide whether treatment with trichloroacetic acid *in situ* will or will not cause a major protein loss.

b) Arginine reaction (Fig. 3). The arginine reaction was carried out partly according to the original description, and partly after extraction with trichloroacetic acid and blocking with diazomethane. It was found that neither the extraction of DNA nor its blocking caused significant quantitative differences in the arginine concentration of the nuclear proteins, and that this

corresponded with the haploid and diploid chromosomal counts of the two kinds of cell.

c) Naphthol-yellow "S" staining. No quantitative measurements were made. Qualitatively, the histological patterns were the same after trichloro-acetic acid extraction, diazomethane blocking and in the controls.

d) Effect of amino group blocking on acid dye binding. Sections treated with diazomethane at room temperature for 2 hours were deaminated partly according to VAN SLYKE, partly with Chloramine-T, and then stained with pH 8.1 fast green. As compared with preparations treated with diazomethane only, the deaminated and then alkylated sections bound no dye. It was only the preparations treated with Chloramine-T that showed slight, 1.5 to 2 AU dye uptakes, which however, could not be evaluated reliably because of the diffuse localisation.

II. Nuclear [DNA] staining

a) Extraction with trichloroacetic acid. After extraction with 5 per cent trichloroacetic acid at 90° C for 15 minutes the nuclei did not stain either with gallocyanin chromealum, pH 3.5 toluidine blue, or with Feulgen's stain. This indicated that all DNA had been extracted.

b) Diazomethane pretreatment. Nuclei pretreated with diazomethane for 2 hours did not stain either with gallocyanin or with toluidine blue. The nuclei thus alkylated did not give the anisotropic rivanol reaction either: they showed the same intensity of birefringence as the non-alkylated unstained controls. Thus, the staining, histochemical and polarisation optical studies unequivocally indicated that demonstration of DNA *in situ* is greatly interfered with by diazomethane pretreatment.

c) Spectrophotometric measurements in vitro. Besides the peak at 259 m μ characteristic of DNA and of the nucleotides, also a lower absorption maximum, believed to be characteristic of proteins was found at 275 m μ after extraction with trichloroacetic acid. After diazomethane treatment two new absorption maximums appeared at 265 and 280 m μ . In view of the negative nuclear staining reactions and the positive protein fast green staining, the latter sign indicates that in the course of alkylation, which takes place without protein loss, DNA may not only be blocked but also decomposed or dissolved. This problem has been discussed in another paper [22], with special regard to the break-down of alkylated DNA.

Discussion

On the basis of the experimental results, two problems arise.

1. Is alkylation with diazomethane selective for DNA in the case of desoxyribonucleoprotein?

2. Does the fast green pattern after alkylation with diazomethane reflect the quantitative relations of the basic nuclear proteins?

There are several methods of alkylation which are easier to carry out than the one using diazomethane wherefore we first employed other techniques. However, in the preliminary experiments lower fast green values were found in the preparations extracted according to ALFERT and GESCHWIND after alkylation by methanol-HCl [11, 12] or dimethylsulphate [24].

In the case of methanol-HCl (we used concentrated hydrochloric acid solution instead of HCl gas), besides the alkylation of amino groups a hydrolysis of the protein chain may take place [1, 14]. In the case of dimethylsulphate the alkaline medium greatly interferes with the handling of the section, and hydrolysis cannot be eliminated either. At the same time, dimethyl derivatives may be produced from the primary amino groups, which explains the reduction of dye uptake. Many data indicate that both methanol-HCl and dimethyl-sulphate react with DNA, and a purinic acid [5] or methylated bases [4, 9] may arise. These data, too, indicate that the alkylating agents mentioned above react not only with DNA, but with the proteins as well, thus their action cannot be considered to be selective for any of the components.

The situation is different after methylation with diazomethane. According to our investigations to be reported in another paper [22], diazomethane, as one of the most potent alkylating agents, methylates, besides the phosphate groups of DNA, also the purine-pyrimidine bases [4, 5]. However, from the point of view of acid dye binding it is only the blocking of the phosphate groups that is important in fast green binding. As the cytophotometric data after fast green treatment yield values identical with those obtained after extraction with trichloroacetic acid, it may be surmised that diazomethane reacts, in the first place, not with the protein, but with DNA [6, 25]. Therefore, on the basis of the quantitative protein pattern, we consider it indirectly confirmed that it is the phosphate groups of DNA that react with diazomethane [15], which is directly corroborated by the cessation of nuclear basophilia.

Let us now examine whether alkylation *in situ* with diazomethane produces such changes in structure and composition of the nuclear proteins as would alter the charges of the amino groups involved in the combination with acid dyes.

According to the amino acid composition of histones (which are composed preponderantly of aliphatic diaminocarbonic acids[10]) it is in the first place the N-alkylated nucleoproteins produced by diazomethane treatment that may interfere with fast green staining. Provided that treatment does not split the peptide linkage [19], i.e. no additional amino groups arise in the role of the alkylated amino and guanido groups that requires confirmation. According to TERNER and CLARK [34] the monosubstituted amino derivatives of the proteins are more basic than the free amino group, consequently such struc-

307

tures are more acidophilic. Our quantitative cytophotometric measurements, however, indicated no significantly increased fast green uptake. On the other hand, the positive arginine reaction is a sign [3] showing that the formation of dimethylamino type derivatives can also be ruled out. Thus, the arginine reaction speaks against the presence of dimethylated derivatives of the dialkylamino type, while the unchanged quantitative dye uptake argues against that of monosubstituted amino groups. On the basis of all these considerations it may be surmised that diazomethane treatment does not produce such fundamental changes in the amino group of basic nuclear proteins which would manifest themselves in the quantitative dye uptake. For this reason we think that the alkylation with diazomethane is selective as far as the phosphate groups of DNA are concerned. Moreover, by blocking the DNA component it becomes possible to determine the nuclear proteins quantitatively.

REFERENCES

1. ALEXANDER, P., CARTER, D., EARLAND, C., FORD, O. E.: (1951) Biochem. J. 48 365. - 2. ALFERT, M., GESCHWIND, I. I.: (1953) Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 39, 991. - 3. BAKER, J. R.: (1947) Quart. J. micr. 88, 115. – 4. BREDERECK, H., MÜLLER, G., BERGER, E.: (1940) Ber. dtsch. chem. Ges. 73, 1059. – 5. CHARGAFF, E., DAVIDSON, J. N.: (1955) The Nucleic Acids. Vol. I. Academic Press Inc. Publ. New York. - 6. CHIBNALL, A. C., REES, Nucleic Acids. Vol. 1. Academic Press Inc. Publ. New York. - 6. CHIBNALL, A. C., KEES,
W. W.: (1951) Biochem. J. 48, P. 46. - 7. CHONG-FU, L., STACEV, M.: (1949) Nature (Lond.)
163, 538. - 8. EHRLICH, P.: (1879) Arch. Anat. Physiol. 3, 166. - 9. ELLIOTT, D. E.: (1952)
Biochem. J., 50, 542. - 10. FELIX, N., RAUCH, H.: (1931) Z. physiot. Chem. 220, 27. - 11.
FINDLAY, G. H.: (1955) J. Histochem, Cytochem. 3, 431 - 12. FISHER, E. R., LILLIE, R.
D.: (1954) J. Histochem. Cytochem. 2, 81. - 13. FODOR, G.: (1960) Szerves Kémia. Tankönyvkiadó, Budapest. Vol. 1. – 14. FRAENKEL-CONRAT, H., OLCOTT, H. S.: (1945) J. biol. - 15. FRANKEL, M., KATCHALSKI, E.: (1944) J. Amer. chem. Soc. 66, 763. -Chem. 161, 259. -16. FRIEDMAN, O. M., SELIGMAN, A. M.: (1951) J. Amer. chem. Soc. 73, 5292, 5295. - 17. GATTERMANN, L.: (1936) Die Praxis des organischen Chemikers. De Gruyter, Berlin. - 18. GEYER, G.: (1951) Naturwissenschaften, 48, 623. - 19. GEYER, G.: (1961) Habil. Schft., 20. GEYER, G.: (1962) Acta histochem. (Jena) 14, 2284. - 21. GOSLAR, H. G.: Jena. -(1963) Histochemie 3, 249. – 22. JOBST, K.: Acta biol. Acad. Sci. hung. In press. – 23. KELLEY, E. G.: (1939) J. biol. Chem. 127, 55-73. – 24. KIESEL, A., ZNAMENSKAJA, M.: (1932) J. physiol. Chem. 213, 89. – 25. O'DONNELL, J., SWAN, J. M.: (1953) Nature (Lond.) (1955) Guart. J. Micr. Sci. 96, 84. - 28. RAPPAY, GY.: (1962) Morph. és Ig. Orv. Szle
 2, 41. - 29. RAPPAY, GY., PÓSALAKY, Z.: (1963) Acta Histochem. (Jena) 15, 325. - 30. SANDRITTER, W., SCHIEMER, G., MÜLLER, D., SCHRÖDER, H.: (1958) Z. wiss. Mikr. 63, 453. 31. SANDRITTER, W., SCHIEMER, H. G.: (1959) Verh. dtsch. Ges. Path. 42, 449. - 32. SANDRITTER, W.: (1961) Ultraviolettmikrospektrophotometrie. In: Handbuch der Histochemie. Fischer, Stuttgart. Vol. 1. - 33. SPICER, S. S.: (1962) J. Histochem. Cytochem. 10, 691. — **34.** ТЕRNER, J. Y., CLARK, G.: (1961) J. Histochem. **8.** 184. — **35.** Тномая, L.: cit. Pearse (26). — **36.** WIGGLESWORTH, V. B.: (1952) Quart. J. micr. Sci. 93. 105. —
QUANTITATIVE CYTOPHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG DER KERNEIWEIBE NACH ALKYLIERUNG

K. JOBST

Zur quantitativen Bestimmung der basischen Kerneiweiße wurden an mit Diazomethan methylierten und bei pH 8,1 mit Fast green gefärbten Spermien- und Thymusdrüsenausstrichen cytophotometrische Bestimmungen durchgeführt und festgestellt, daß die alkylierten Präparate in bezug auf die Basophilie und den basischen Eiweißgehalt eine weitgehende Übereinstimmung mit den mit der Alfert-Geschwindschen Methode vorbehandelten Gewebekernen zeigen. Auch hinsichtlich des Arginingehaltes der mit Trichloressigsäure extrahierten und mit Diazomethan blockierten Gewebekerne konnte kein Unterschied beobachtet werden. Es wird angenommen, daß das Diazomethan nur die Phosphatgruppen der Desoxyribonukleinsäure blockiert und mit den für die Basophilie entscheidenden basischen Aminogruppen in keine Reaktion eingeht. Deshalb kann man aus der nach Alkylierung mit Diazomethan erfolgenden sauren Farbstoffaufnahme auf die quantitative Verteilung der basischen Kerneiweiße schließen. Die Herstellung von Diazomethan und die experimentellen Bedingungen der Alkylierung werden ausführlich erörtert.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ЦИТОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЯДЕРНЫХ БЕЛКОВ ПОСЛЕ АЛКИЛИРОВАНИЯ

қ. йобст

На мазках семенних нитей и зобной железы метилированных диазометаном и окрашенных красителем fass green при pH 8,1 проводились цитофотометрические исследования в целях количественного определения основных ядерных белков. Установлено, что в отношении ацидофилии алкилированных препаратов и их содержании основных протейнов выявляемое значительное совпадение с этими же свойствами тканевых ядер, обработанных по методу Альферт—Гешвинда. В содержании аргинина в тканевых ядерах, экстрагированных трихлоруксусной кислотой и блокированных диазометаном, также не наблюдалось отклонения. На основании полученных результатов авторы предполагают, что диазометан блокирует лишь группы фосфата дезоксирибонуклеиновой кислоты, и не вступает в реакцию с основными аминогруппами, имеющими решающее значение с точки зрения ацидофилии. Поэтому из поглощения кислых красителей после алкилирования диазометаном можно делать заключения относительно количественного распределения основных ядерных белков. В экспериментальных условий алкилирования.

Dr. Kázmér Jobst: Pécs, Dischka Győző u. 5., Hungary

309



Institut für gerichtliche Medizin der Medizinischen Universität (Direktor: Prof. Dr. S. Ökrös), Budapest

HISTOCHEMISCHE UND FLUORESZENZOPTISCHE UNTERSUCHUNGEN DER STROMMARKE

E. Somogyi, G. Rózsa und P. Sótonyi

(Eingegangen am 27. März, 1964)

Strommarken von vor 2-12 Stunden verstorbenen Personen wurden untersucht Einzelne histochemische Methoden ergaben in der Strommarke eine veringerte Färbung oder deren Ausfall; die basischen Farbstoffe wurden in erhöhtem Maße gebunden. Die Änderungen der Kerne werden selbst bei Zerstörungen großen Ausmaßes für charakteristisch angesehen. Die Strommarken werden, vom Grad der Gewebeschädigung abhängend, in drei Gruppen eingeteilt.

Die elektrische Stromeinwirkung ist ein technisch und biologisch breit erforschtes Problem, das auch vom strafrechtlichen Standpunkt wesentlich ist [7, 9, 12]. Die wichtigsten Beweise der Einwirkung, die auf der Haut auffindbaren Strommarken wurden von uns histochemisch und fluoreszenzoptisch untersucht.

Methoden

Die Beobachtungen wurden an Strommarken durchgeführt, die auf der Haut von 2-12 Stunden vorher verstorbenen, vom elektrischen Strom betroffenen Personen zu finden waren. Die herausgeschnittenen Gewebestücke wurden in neutralem Formalin oder Carnoyscher Lösung fixiert, dann wurden daraus Gefrierschnitte oder in Paraffin eingebettete Schnitte bereitet.

Anläßlich der histochemischen Untersuchungen wurden die reaktiven Gruppen der Eiweißkörper mit der BURSTONEschen [2] Dinitrofluorbenzol und Betanaphthol-Methode, die basischen Eiweißstoffe mit Eriochromschwarz, die Disulfid- und Sulfhydrilgruppen gemeinsam nach PEARSE [11] mit Tetrazoliumblau und Neotetrazolium, die Sulfhydrilgruppen gesondert mit der BARNETT-SELIGMANschen Methode [1], die Alfaaminosäuren mit der YASUMA-ICHIKAWAschen Ninhydrinreaktion [15] nachgewiesen. Die saueren Mucopolysaccharide wurden mit Azur A, Toluidinblau, Thionin, mit der Methode von HALE [6] und Eskelund, sowie mit der Münch und ERNSTschen perjodsaueren Diaminreaktion [8] nachgewiesen. Die Nukleinsäuren wurden mit Gallocyanin-Chromalaun nach EINARSON [4], Methylgrün-Pyronin nach TAFT [14] und Naphtholsäurehydrazid nach DANIELLI [3] untersucht.

Für die fluoreszenzoptischen Untersuchungen [5] wurden in Carnoyscher Lösung fixierte, in Paraffin eingebettete Schnitte mit 1:10 000 Acridinorange, Ghoriphosphin, Geranin und Vitolin yellow, 1:50 000 Flavophosphin und 1:1000 000 Thioflavin S-Lösung in einer Pufferserie von Veronalacetat, mit den pH-Werten 2,62-3,0-3,5-4,33-4,93-5,5 - 6,11-6,99-7,66-8,15 und 9,18 gefärbt.

Beobachtungen

Die zum Nachweis der Eiweißkörper und einzelner reaktiver Gruppen derselben dienenden histochemischen Verfahren ergaben in dem Gebiet der Strommarke eine hochgradige Verminderung oder einen vollständigen Mangel an Färbung, oder eine nicht spezifische Farbstoffbindung. Abb. 1 zeigt die Färbung der Eiweißstoffe der unversehrten Haut mit der BURSTONEschen Dinitrofluorbenzol-Methode. Abb. 2 die schwächere homogene Farbstoffbindung in der Strommarke.

Unter den Nukleinsäuren war die verminderte Färbung der Plasmanukleinsäuren augenfällig. In dieser Hinsicht lieferten die Methoden von TAFT, EINARSON und DANIELLI übereinstimmende Ergebnisse. In Abb. 3 ist die Elongation und die wirbelartige Anordnung der an der Grenze der Strommarke und der unversehrten Haut befindlichen Kerne zu sehen; die Färbung der Kernnukleinsäuren ist nicht oder kaum schwächer geworden.

Im Gegensatz zu den unversehrten Gebieten, wurden die basischen Farbstoffe durch die vom Strom beschädigten Hautteile in großem Maße befunden. Diese Erscheinung wurde mit der ESKELUNDschen Färbung am deutlichsten beobachtet (Abb. 4 und 5); auch das zum Nachweis der saueren Mucopolysaccharide dienende Verfahren von MÜNCH und ERNST wies auf gesteigerte Farbstoffbindung hin (Abb. 6). Die übrigen metachromatischen Mucopolysaccharid Färbungen ergaben in der Strommarke in jedem Fall eine verminderte Reaktion (Abb. 7 und 8) und keine Metachromasie.

Mit der Fluoreszenzmikroskopie konnten alle jene allgemein bekannten Veränderungen beobachtet werden, die mit Routine-Färbeverfahren nachzuweisen sind. Die Schnitte der lädierten Hautteile wurden miteinander und mit von unversehrten Gebieten verfertigten Schnitten verglichen. Bei letzteren konnte selbst bei weniger günstigen pH-Werten eine gut abgegrenzte Färbung beobachtet werden; nach Behandlung im günstigen Milieu wurde folgendes gesehen (Abb. 9 und 10):

a) die Randteile der Hornschicht waren intensiver gefärbt;

b) an der Grenze des Keratins und des Epithels sonderte sich eine heller gefärbte doppelte Schicht ab;

c) die unteren Epithelschichten zeigten ständig zunehmende Aktivität; am intensivsten war der Farbstoff an die Zellen des Stratum germinativum gebunden;

d) die sich voneinander gut abgesondert, geordnet gelagerten Bindegewebefasern und die Gebilde der Cutis und Subcutis färbten sich lebhaft an.

Die durch den elektrischen Strom geschädigten verschiedenen Hautteile zeigten kein einheitliches Bild.

In oberflächlichen Strommarken und an den Randteilen von schweren Läsionen färbte sich die Horn- und Epithelschicht gleichartig an, war homogenisiert und riß entweder ab, oder löste sich ganz los. Unter dem Schutz dieser Schichten waren die Bindegewebefasern nur wenig gequollen, und auch die Verminderung ihrer Färbung war unbedeutend (Abb. 11 und 12).

Im Zentrum oberflächlicher Strommarken und in der Umgebung der Mittelpunkte von tieferen, ausgedehnteren Läsionen zeigte die Horn- und



Abb. 1. Färbung der Eiweißkörper der unversehrten Haut nach Burstone



Abb. 2. Färbung der Strommarke nach Burstone



Abb. 3. Färbung der Nucleinsäuren am Rand der Strommarke (Einarsonsche Methode)



Abb. 4. Unversehrte Haut. Eskelaundsche Reaktion



Abb. 5. Erhöhte Bindung des basischen Farbstoffes in der Strommarke (Eskelundsche Methode)



Abb. 6. Intensive Auffärbung mit basischem Farbstoff im Gebiet der Strommarke (Methode von Münch und Ernst)



Abb. 7. Färbung der unversehrten Haut und der Strommarke mit Thionin



Abb. 8. Färbung der unversehrten Haut und der Strommarke mit Azur A. In der zurückgebogenen, homogenisierten Horn- und Epithelschicht keine Reaktion



Abb. 9. Gut abgegrenzte intensive Färbung der Gebilde der unversehrten Haut mit Choriphosphin (6,99 pH)



Abb. 10. Färbung der unversehrten Haut mit Flavophosphin (pH 5,5). Augenfällig ist die stärkere Färbung des Stratum lucidum und des Stratum germinativum



Abb. 11. Am Rande der Strommarke ist die Horn- und Epithelschicht zerstört und abgerissen, die Bindegewebefasern sind gequollen, die Intensität ihrer Färbung ist verringert (Flavophosphin pH 5,5)

Abb. 12. Veränderungen des Randes der Strommarke mit Vitolin yellow (pH 6,99)



Abb. 13. Abreißen des Keratins und des Epithels, Quellung und Homogenisierung der Zellen der Drüsengänge und der Bindegewebefaser (Flavophosphin, pH 5,5)



Abb. 14. Ausgedehnte Homogenisierung, mit Höhlenbildung im Zentrum der Strommarke (Vitolin yellow, pH 6,99)



Abb. 15. Homogenisierung, Höhlenbildung in der zerstörten Strommarke (Geranin, pH 3,0)



Abb. 16. Gewebezerstörung, Homogenisierung, Ansengen, bizarre Färbung in einer schwer zerstörten Strommarke (Acridinorange, pH 6,99)

Epithelschicht — falls sie nicht fehlte — Zeichen von grober Zerstörung und war vollständig homogenisiert. In der größtenteils unbedeckten Bindegewebeschicht waren die Fasern bedeutend gequollen, lagen dicht beieinander, ihre Färbung war jedoch stark vermindert. Auch die Wandzellen der Gefäße und der Drüsengänge waren gequollen, an den meisten Stellen füllten sie die Lumina (Abb. 13, 14 und 15).

Die Zeichen der Höhlenbildung waren an den mittleren Teilen der gröberen Strommarken am augenfälligsten (Abb. 14 und 15).

Bei den schwersten Verletzungen wurden angesengte Gewebe (Abb. 14 und 15), Höhlenbildungen zwischen den Geweben, eine bedeutendere Homogenisierung sowohl in der Epithelschicht als auch in dem Bindegewebe und starke Destruktion mit bizarrer Färbung beobachtet.

Besprechung

Der elektrische Strom führt auf der Haut Verletzungen verschiedenen Grades herbei, die von der Intensität und Spannung, von dem Widerstand der Gewebe und von der Dauer der Einwirkung abhängig sind. In den Geweben verursacht der Strom nicht nur Zerstörungen, sondern auch gewisse biologischchemische Veränderungen. Eine Folge dieses Umstandes ist aller Wahrscheinlichkeit nach auch jene Erscheinung, daß im Gebiete der Strommarke durch die Gewebe mehr basischer Farbstoff gebunden wird, als in der nicht verletzten Haut. Zu ähnlichen Resultaten führten die polarisationsoptischen Untersuchungen [13], und im Einklang mit diesen scheint die Schlußfolgerung berechtigt zu sein, daß sich in den Strommarken Prozesse abspielen, die Säureradikale freisetzen. Auf Grund der Beobachtungen konnten die Säureradikale mit den saueren Mucopolysacchariden nicht in Zusammenhang gebracht werden.

Auf Grund der Untersuchungen dürfte angenommen werden, daß die Zellkerne viel widerstandsfähiger sind als das Plasma, und an den Kernen lassen sich selbst bei den schwersten Zerstörungen strombedingte Veränderungen: Elongation, Wirbelbildung usw. beobachten.

Auf Grund der fluoreszenzoptischen Untersuchungen wurden vom Grade der Schädigung abhängend, die Strommarken in drei Gruppen eingeteilt:

I. Die in den oberflächlichen Strommarken sowie an der Grenze der geschädigten und unversehrten Hautteilen wahrnehmbaren, kleineren bis größeren Epithelschädigungen und die geringe Quellung der Bindegewebefasern werden als die leichtesten Veränderungen angesehen (Abb. 11 und 12), deren Färbung vom Normalen kaum abweicht.

II. In die zweite Gruppe werden die Epithelzerstörung, starke Quellung des Bindegewebes, Homogenisierung und vermindertes Farbstoffbindungs-

vermögen eingereiht. Zwischen den Geweben ist auch eine Höhlenbildung möglich. In solchen Strommarken ergeben die zum Nachweis der Eiweißkörper und der Plasmanukleinsäuren dienenden Methoden eine verminderte Reaktion, eventuell eine unspezifische Bindung, und mit basischen Farbstoffen eine gesteigerte, intensive Färbung (Abb. 5, 6, 13, 14 und 15).

III. Die Kennzeichen der dritten Gruppe sind schwerste Zerstörungen, eine sich auf alle Gewebearten erstreckende Homogenisierung, Höhlenbildung hohen Grades, Versengung und bizarre Färbung. Auch in den allerschwersten Strommarken werden die basischen Farbstoffe in erhöhtem Maße gebunden, dagegen ist die unspezifische Färbung ausgedehnter und überraschend vielfarbig; im Zusammenhang mit der Homogenisierung verringert sich oder verschwindet die Kernfärbung (Abb. 16).

LITERATUR

1. BARNETT, R. J., SELIGMAN, A. M.: (1954) J. nat. Cancer Inst. 14, 769. – 2. BURS-TONE, M. S.: (1959) Handbuch der Histochemie. Fischer, Stuttgart. – 3. DANIELLI, J. F.: (1950) Quart. J. micr. Sci. 91, 215. – 4. EINARSON, L.: (1951) Acta path. microbiol. scand. 28, 82. – 5. HAITINGER, M.: (1954) Fluorescens Mikroskopie, Akademische Verlags Gesellschaft, Leipzig. – 6. HALE, C. W.: (1946) Nature (Lond.) 157, 802. – 7. IRÁNYI, J., OROVECZ, B., SOMOGYI, E.: (1960) Münch. med. Wschr. 102, 3, 140. – 8. MÜNCH, O., ERNST, B.: (1964) Acta histochem. (Jena) 18, 51. – 9. OROVECZ, B., IRÁNYI, J., SOMOGYI, E.: (1959) Mentőorvos-továbbképzés 2, 77. – 10. PEARSE, A. G.: (1961) Histochemistry. Churchill, London. – 11. Rózsa, GY., SóTONYI, P.: (1964) Acta morph. Acad. Sci. hung. 13, 35. – 12. SOMOGYI, E., OROVECZ, B., IRÁNYI, J.: (1961) Dtsch. Z. gericht. Med. 52, 52. – 13. SOMOGYI, E., Rózsa, GY., SóTONYI, P.: (1965) Polarisationsoptische Untersuchungen der elektrischen Strommarke. Im Druck. – 14. TAFT, E. B.: (1951) Stain Technol. 26, 205. – 15. YASUMA, A., ICHIKAWA, T.: (1953) J. Lab. clin. Med. 41, 269. – 16. SOMOGYI, E., SÓTONYI, P., Rózsa GY.: (1965).A bőr collagen rostjai elektromos áram hatására történt változásainak polarizációs optikai vizsgálata. Morph. Ig. Orv. Szemle, V, 3. 186.

HISTOCHEMICAL AND FLUORESCENCE-OPTICAL INVESTIGATIONS OF FLASH BURNS

E. SOMOGYI, GY. RÓZSA and P. SÓTONYI

Flash burns in persons dead since 2 to 12 hours have been studied. The flash burns gave no or only a weak reaction with certain histochemical methods, whereas basic dyes were intensively bound. Nuclear changes are regarded as characteristic even in cases of extensive destruction. The flash burns may be divided into three categories according to the degree of tissue damage.

314

HISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN DER STROMMARKE

ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ И ФЛЮОРЕСЦЕНТНО-ОПТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭЛЕКТРОМЕТОК

Э. ШОМОДИ, Дь. РОЖА и П. ШОТОНЬИ

У лиц, умерших 2—12 часов до исследования, электрометки показали при определенных гистохимических исследованиях уменьшение или даже отсутствие окрашивания. В противоположность этому окрашивание основными красителями повысилась. По мнению авторов изменения ядер характерны даже в случае разрушений значительного размера. Они распределяют электрометки в зависимости от степени разрушения тканей в три группы. Экспериментальные исследования еще продолжаются.

Dr. Endre Somogyi: Dr. György Rózsa: Dr. Péter Sótonyi:

Budapest IX., Üllői út 93., Ungarn

Institute of Surgical Anatomy and Operative Surgery (Director: Prof. D. NAGY), and Institute of Anatomy (Director: Prof. J. SZENTÁGOTHAI), University Medical School, Budapest

CORRELATION BETWEEN PORTOBILIARY AND VENOUS LOBES AND THE SHAPE OF THE LIVER

J. FALLER and G. UNGVÁRY

(Received July 6, 1964)

The relationships of the portobiliary and hepatic venous lobes and the correlations between the shape of the liver and the types of division of the vascular systems have been examined in 200 human livers. Injection, preparative, corrosion and X-ray studies yielded the following results.

1. The two types of lobar system are overlaping so that first of all on the convex surface the lobes of the hepatic venous system are shifted to the left as related to the portobiliary lobes.

2. The right hepatic venous lobe drains blood from the right portobiliary lobe and the right half of the intermediate portobiliary lobe; the intermediate hepatic venous lobe from the left half of the intermediate portobiliary lobe; and the part of the left portobiliary lobe lying right to the falciform ligament, further the left hepatic venous lobe drain blood from the hepatic areas situated left to the falciform ligament.

3. The fissures separating the lobes contain one or another of the main trunks of the opposite system.

4. As to shape, triangular, oval and intermediate liver forms could be distinguished, and correlations could be demonstrated between the above shapes and the division type and size of intrahepatic blood vessels.

The advance achieved during the past two decades in anaesthesiology, surgical techniques, preoperative and postoperative management has made it possible that operations on the liver be performed in an increasing number of cases at the major medical centres. In this connexion studies have been made of the gross intrahepatic structure. It has been assumed that like the other parenchymal organs (lung, kidney) the liver would also show a characteristic lobar structure. In analogy to the bronchopulmonary segments, various authors differentiated portobiliary segments within the liver. The fundamental investigations in this field have been carried out by HJORTSJŐ, HEALEY, and SCHROY, COUINAUD and others. At the same time, COUINAUD and KNOPP were the only authors to study the surgical aspects of the system of the hepatic vein.

On the basis of the said investigations we have studied both the portobiliary system and the system of the hepatic veins. Our findings have been described in detail in two previous papers. On the basis of the evidence obtained we do not think it justified to divide the liver into small segments. Within each of the two systems we could distinguish all three big independent parts (lobes). Within the portobiliary system two lateral lobes (lobus dexter and sinister) and a wedge-shaped intermediate lobe (lobus intermedius) can be distinguished (Fig. 1). The shape and size of the lobes, and the distribution of the fissures between them change according to the type of portobiliary distribution.

Within the system of the hepatic veins there are likewise three lobes, separated by the right and left fissures. The main hepatic venous trunks and their side branches, the blood vessels termed perforating veins and the independent smaller veins emptying at different levels into the inferior vena cava and described by COUINAUD are arranged in the three lobes (Fig. 2, a, b).



Fig. 2. a, b

As it has been pointed out, there seems to be no practical reason for a further subdivision of any of the systems. An exception to this is that part of the left portobiliary lobe which lies to the left of the falciform ligament. This is structurally not an independent lobe or segment, because its Glisson trunk is directly continuous with the main trunk of the left lobe. Its separation is nevertheless at the level of the falciform ligament there being a small fissure, along which, owing to the characteristic structure of the portobiliary system, the part lying left from the falciform ligament can be removed without damaging a major branch or the remaining part of the lobe. The independent significance of this portion of the liver is emphasized also by the fact that in that area lies the whole of the left hepatic venous lobe.

The present paper deals with the interrelationships of these two lobar systems and with their correlation with the shape of the liver.

Materials and methods

Two hundred normal livers obtained from fresh adult human cadavers were studied, by the methods used in previous investigations, notably

1. Filling up with well-diffusing dyes readily soluble in water, as well as with China ink.



Fig. 1

2. Preparation after filling up with dye.

3. Corrosion studies.

4. X-ray studies.

ad 1. The capillaries of the system to be examined were closed with a 5 per cent solution of PVC from the side of the opposite system. Then the various trunks of the system to be examined were filled up with aqueous solutions different in colour. Subsequently, the part of the liver belonging to the trunk in question could be visualised on the surface of the liver.

ad 2. After the dyes had been injected and the boundaries of the lobes become visible, the fissures separating the lobes were cut open to study the interior surfaces.

ad 3. In the corrosion studies, after fixation the livers were corroded in hydrochloric acid, then each of the three lobes of both systems were filled up with 5 to 10 per cent PVC solutions of various colours. The portobiliary and hepatic venous systems were injected together. Corrosion studies have been carried out also with the first method, in livers filled up with PVC from one of the systems.



ad 4. In the X-ray studies lead tetroxide suspended in 5 per cent PVC was used as the contrast medium. In most cases the two systems were studied together, filling up the portobiliary system through the hepatic ducts. Then an ureter catheter was passed into the main trunks of the hepatic vein system, and bilateral radiographs were made, one with the liver lying on its visceral aspect and one with it standing on its anterior edge.

The methods employed have been described in detail previously.

Results

In our previous studies it has been shown that the liver was divided into three independent lobes corresponding to both the portobiliary system and the hepatic venous system. It was to be seen then what correlations existed between the lobes of the two systems (Fig. 3). The fissures separating the lobes lie at different angles to the sagittal plane running through the right margin of the inferior vena cava. The angles were measured as shown in Fig. 4. The livers were laid with their posterior aspect on the frontal plane, so the inferior vena cava lay in the frontal plane. The sagittal plane was led through the right

margin of the inferior vena cava and the angle it closed with the fissures was measured on the horizontal plane. In the subject standing upright the position of the liver is different. If we consider the inferior vena cava to be the axis of rotation, then any point of the anterior wedge shifts 10 to 15 degrees to the right as related to our diagram and thus the angles of the right portobiliary and right hepatic venous fissures increase by 10 to 15 degrees, while the angles of the left fissures decrease by the same degrees.



In the portobiliary system the projection of the fissure separating the right lobe from the intermediate one runs one to $1\frac{1}{2}$ inches to the left of the right margin of the liver on the convex surface; on the posterior aspect and visceral aspect it runs right to the inferior vena cava and gall bladder bed, respectively. As related to the sagittal plane, the fissure bends 40 to 45 degrees to the right (50 to 60 degrees *in situ*). The surface projection of the fissure separating the intermediate lobe from the left one corresponds grossly with Rex-Cantlie's line. The fissure bends 10 to 15 degrees to the left *(in situ, 5 degrees to the left and 5 to 10 degrees to the right)*. In the hepatic venous system the projection of the fissure separating the right lobe from the intermediate one is, on the convex surface, a line bulging to the right, with one of the end



Fig. 5







points at the right side of the gall bladder bed on the anterior wedge; the other runs at the right side of the inferior vena cava, where the posterior and superior aspects meet. The greatest distance between the straight line between the two points and the convex line varies from a half to one inch. The projection of the fissure on the visceral aspect runs in the right branch of the H-shaped sulcus. The right hepatic venous fissure bends by about 25 degrees to the right from the sagittal plane 35 to 40 degrees *in situ*. The hepatic venous fissure separating the intermediate lobe from the left lobe has its projection on the anterior aspect in the line of the falciform ligament, on the superior aspect it is deflected



in the direction of the inferior vena cava, and on the visceral aspect it runs in the left branch of the H-shaped sulcus. The fissure bends 20 to 30 degrees (5 to 15 degrees *in situ*) to the left.

Identical findings were obtained when the two systems were compared. It was obvious that they do not correspond exactly as the hepatic venous lobes are shifted to the left as related to the portobiliary system, and the lobes of the two systems are partly overlapping (Fig. 5 and Fig. 6).

The right hepatic venous lobe includes the whole right portobiliary lobe and half of the intermediate portobiliary lobe. The intermediate hepatic venous lobe includes the left half of the intermediate portobiliary lobe and that part of the left portobiliary lobe which lies right from the falciform ligament, while the left hepatic venous lobe includes merely that part of the left portobiliary lobe which lies left from the falciform ligament. It follows that while in the portobiliary system the right lobe is smaller in size than the intermediate and left ones, in the hepatic venous system the right lobe is the largest, the left one is

the smallest. Correspondingly, all the venous blood of the right portobiliary lobe is drained through the right hepatic venous lobe. The blood from the right side of the intermediate portobiliary lobe is drained by the veins emptying into the main trunk of the right hepatic vein from the anterior direction and from the left. The left half of the lobe is drained by the main trunk and right



Fig. 9

side branches of the intermediate hepatic vein. From that part of the left portobiliary lobe which lies right from the falciform ligament, the blood is drained by the veins emptying into the intermediate hepatic vein from the left side, while the rest of the lobe is drained by the entire left lobe of the hepatic venous system (Fig. 7).

The simultaneous corrosion studies and those outlined above indicate that, as related to the hepatic porta and to the H-shaped sulcus system, four interlobar fissures can be found, fan-wise, viz. from right to left: the right portobiliary fissure, the right hepatic venous fissure, the left portobiliary fissure, and the left hepatic venous fissure (Fig. 3). It is important that the



Fig. 10



Fig. 11

fissures separating the single lobes contain some of the main trunks of the opposite system. This makes it possible to locate and leave undamaged the main trunk of the opposite system, or ligate the blood vessels emptying into it from the part to be removed when we detach the lobes from each other from fissure to fissure (Fig. 8, Fig. 9).

In the right portobiliary fissure are found the main trunk of the right hepatic vein, and the major branches reaching it from the right side. When we enter the fissure from the convex aspect of the liver, we can expose first the side branches emptying into the right hepatic vein at the highest level, then we find those entering it at lower and lower levels, and finally we find the right hepatic vein itself, running deep in the fissure (Fig. 10, Fig. 11). The

main trunk is lying in the fissure the deeper, the bigger its calibre, and the larger the right side of the liver (triangle-shaped liver). When we operate in the fissure, we must take care to ligate the side branches and to spare the main trunk, because this drains also the right side of the intermediate portobiliary lobe. This is the more important, because the hepatic venous lobes not always are anastomosing copiously.

The left portobiliary fissure contains the main trunk of the intermediate hepatic vein as well as one, usually the middle one, of the three branches



Fig. 12

forming the main trunk downward from the level of the porta hepatis (Fig. 11, Fig. 12). The main trunk runs deep in the fissure, near the visceral aspect. Here, too, care must be taken to spare the main trunk when operating in the fissure, because it drains the left side of the intermediate portobiliary lobe.

In the right fissure of the hepatic venous system enters from the porta hepatis Glisson's trunk (v. portae, hepatic artery, hepatic duct). The trunk runs toward the convex surface of the liver deep in the fissure, then it divides characteristically into many small branches. One branch each runs upward and downward, in the fissure, at about half the thickness of the liver. Glisson's right and middle trunks often separate in the continuance of the hepatic porta, at the junction of the fissure and the visceral surface. When operating in the fissure, Glisson's main trunk must be spared, because its branches running to the left supply the rest of the left half of the intermediate portobiliary lobe (Fig. 13.)

In the left fissure of the hepatic venous system is found, in the case of the typical left-side division, the characteristic J-shaped, blind, sac-like end of



Fig. 8



Fig. 15

.



Fig. 16



Fig. 17

the vena portae. Many components of Glisson's left trunk run uninterrupted through the fissure. When resection is performed here, it is advisable to spare the blind end of the vena portae, because it gives branches to the part of the liver lying right from the fissure (Fig. 14).

As to shape, the livers may be divided into two groups. There are, of course, also intermediate forms between the two types. To one of the groups belong the livers of approximately "transversally oval" shape, where the height of the liver is about the same at the right margin and the midline of the left



Fig. 13, 14

hepatic venous lobe. This type may be termed "oval liver". To the other group belong the livers of rounded triangle shape. With this type the height of the liver measured in the right portobiliary fissure is about $1\frac{1}{2}$ times the height measured in the midline of the classic left lobe. This type is termed "triangleshaped liver". Thickness varies little with the oval type, while with the triangleshaped type the part of the liver lying left from Rex-Cantlie's line is much thinner than the contralateral one. In our material there were 40 per cent oval livers, 40 per cent triangle-shaped ones and 20 per cent transitory forms.

A correlation could be observed to exist between the shape of the liver and the type of division of the portobiliary system. In oval livers division is in the right portobiliary lobe of the scattered type and correspondingly two distinct segments are visible (Fig. 15). In the triangle-shaped livers the right lobe is composed of a magistral arch and of the branches arising from it. Correspondingly, no further segments can be distinguished (Fig. 16). In the

transitory forms both types of division may occur. In the case of triple division a magistral arch is mostly found in the oval livers.

As anticipated on the basis of the classification principle, no definite correlation could be established between shape and type of division in the other two lobes.

As regards the shape of the hepatic venous lobes and the shape of the whole liver, in the triangle-shaped livers the right hepatic venous lobe is much larger than the two other main venous trunk systems. In oval livers the hepatic venous lobes are of about the same size (Fig. 17).

The discussed findings have convinced us that a generally valid classification of the liver is possible only on the basis of the above outlined scheme. Division into further parts, or schemes drawn up on the basis of smaller portions, cannot be applied generally, owing to the excessive variability of the branches. On the basis of the evidence obtained in certain corroded preparations one may insist upon such schemes, but they will certainly not be valid for other preparations. On the other hand, our classification can be applied to every liver. This pattern is not stable either, because the size and shape of the lobes changes with the shape and type of division of the liver, but the number of the lobes and the contents of the fissures are always the same. Demonstration of the latter by X-rays, which is feasible also during operation by the use of an image amplifier, after filling up the intrahepatic biliary ducts or by demonstration of the hepatic veins by means of a heart catheter, will always make it possible to determine the position of the fissures and together with that the shape and size of the lobes.

At present, it is generally accepted in surgical circles that in view of the extreme variability of its blood vessels and the excessive tendency to haemorrhage of the liver it is irrelevant where a resection is performed. Many workers refuse to accept the view that the liver has a lobar structure and that this structure is of a surgical significance. Except for very small resections it is not at all irrelevant where a resection is carried out. If it is performed in a fissure, the immediate surgical results will significantly improve and the hazards diminish, since there will be less haemorrhage and the afferent and efferent blood vessels of the remaining part of the liver will not be damaged. In view of its great regenerating power and of the fact that eventually a small part of the organ may fulfil the tasks of the whole liver, it may seem reasonable to sacrifice in a given case a major portion of the organ and carefully to determine the location of the lobes, in order to diminish the surgical stress and risks, involved.

REFERENCES

1. BECKER, V.: (1955) Schweiz. med. Wschr. 85, 801. – 2. BRONNE, E. Z.: (1940) Surgery 8, 424. – 3. CANTLIE, J.: (1898) Proc. Anat. Soc. G. B. Irel. 32, 4. – 4. CHOUKÉ, K. S.: (1932) Anat Rec. 53, 177. – 5. COUINAUD, C.: (1954) Presse med. 62, 709. – (1955)

Presse med. 63, 417: 669. - (1954) J. Chir. (Páris) 70, 933. - (1955) J. Chir. (Páris) 71, 578. -6. DANIEL, P. M., PRICHARD, MARJORIE, M. L.: (1951) J. Physiol. (Lond.) 114, 521. - 7. DEGKWITZ, R.: (1938) Fortsch. Röntgenstr. 58, 472. - 8. DOUGLAS, B. E., BAGGENSTOSS, A. H., HOLLINSHEAD, W. H.: (1950) Surg. Gynec. Obstet. 91, 562. - 9. EISENDRATH, D. N.: (1918) J. Amer. med. Ass. 71, 864. - 10. GRINDLAY, J. H., BOLLMAN, J. Z.: (1952) Surg. Gynec. Obstet. 94, 491. – 11. HEALEY, J. E., Jr., SCHROY, P. C.: (1953) Arch. Surg. 66, 599. – 12. HEALEY, J. E., Jr., SCHROY, P. C., SORENSEN, R. J.: (1953) J. int. Coll. Chir. 20, 133. - 13. HITTNER, J., HÜTTL, T., ZSEBŐK, Z.: (1953) Zbl. Chir. 78, 1906. - 14. HJORTSJŐ, C. H.: (1951) Acta Anat. (Basel) 11, 599. - 15. HOBSLEY, M. H.: (1958) Brit. J. Surg. 45, 635. - 16. HOLLINSHEAD, W. A.: (1956) Anatomy for Surgeons. Vol. 2. - The Thorax, Abdomen and Pelvis. Casell, London. - 17. KADAR, F.: (1957) Anat. Anz. 104, 97. - 18. KNOPP, H.: (1953) Virchows Arch. Anat. path. 323, 563. - 19. KNÖLL, E.: (1938) Anatomische Berichte 37, 158. - 29. MARTENS, E.: (1920) Arch. klin. Chir. 114, 1001. - 21. MCINDOE, A. H., Counseller, V. S.: (1927), Arch. Surg. 15, 589. – 22. Ney, H. R.: (1956) Fortschr. Rönt-genstr. 86, 302. – (1958) Acta Radiol. (Stockh.) 49, 227. – 23. OLSON, O., EKMAN, B.: (1949) Acta Radiol. (Stockh.) 31, 33. – 24. POPPER, H., SCHAFFNER, F.: Die Leber. Eger, W., Haller, J. Stuttgart. – 25. Rex, H.: (1888) Morph. Jb. 14, 517. – 26. STUCKE, K.: (1959) Leberchirurgie, Springer, Berlin. - 27. THOMPSON, J. M.: (1933) Univ. Calif. Publ. Anat. 1, 55. - 28. UNGVÁRY, G., FALLER, J.: (1963) Acta morph. Acad. Sci. hung. 12, 189. -(1963) Zbl. Chir. 88, 1885.

ZUSAMMENHÄNGE ZWISCHEN DEN PORTOBILIÄREN UND VENÖSEN LEBERLAPPEN SOWIE DER LEBERFORM

J. FALLER und GY. UNGVÁRY

Das gegenseitige Verhältnis der früher bereits eingehend untersuchten portobiliären und V.-hepatica-Lappen, ferner die Zusammenhänge zwischen der Leberform und den Teilungstypen der Gefäßsysteme wurden analysiert. An 200, aus Kadavern entnommenen humanen Lebern wurden Injektions-, Präparierungs-, Korrosions- und Röntgenuntersuchungen durchgeführt und festgestellt, daß

1. die beiden Lappensysteme einander überdecken, und zwar in der Weise, daß vor allem auf der konvexen Oberfläche die Lappen des V.-hepatica-Systems gegenüber den portobiliären Lappen nach links verschoben sind.

2. Der rechte V.-hepatica-Lappen führt das Blut aus dem rechten portobiliären Lappen und aus der Hälfte des mittleren portobiliären Lappens ab; der mittlere V.-hepatica-Lappen führt das Blut aus der linken Hälfte des mittleren portobiliären Lappens sowie aus dem vom Lig. falciforme rechts befindlichen Teil des linken portobiliären Lappens ab. Der linke V.hepatica-Lappen führt das Blut aus dem links vom Lig. falciforme befindlichen Leberteil ab.

3. Die Fissuren, die die einzelnen Lappen trennen, sind nicht leer, sondern es verläuft in ihnen jeweils einer der Hauptstämme des gegenseitigen Systems.

4. Im Laufe der Untersuchungen wurden sog., "ovale", "dreieckige" und "Übergangs"-Formen der Leber beobachtet. Zwischen diesen Leberformen und den Teilungstypen bzw. der Größe der in ihnen verlaufenden Gefäßsysteme gelang es, einen Zusammenhang aufzudekken.

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ПОРТОБИЛИАРНЫМИ И ВЕНОЗНЫМИ ДОЛЬКАМИ И ФОРМОЙ ПЕЧЕНИ

Й. ФАЛЛЕР и Д. УНГВАРИ

В настоящей работе авторы исследуют взаимосвязь между портобилиарными и венозными дольками печени, а также между формой печени и типами разветвлений сосудистых систем. На 200 человеческих печенях, полученных из трупов, проводились инъекционные, препаративные, коррозионные и рентгеновские исследования. Установлено, что:

1. две различные системи долек перекрывают друг друга таким образом, что, прежде всего на выпуклой поверхности, дольки системы печеночной вены смещены влево по сравнению с портобилиарными дольками.

2. Правая долька печеночной вены отводит кровь из правой портобилиарной дольки и из правой половины средней портобилиарной дольки. Средняя долька печеночной вены отводит кровь из левой стороны средней портобилиарной дольки, а также из части левой портобилиарной дольки, находящейся вправо от серповидной связки. Левая долька печеночной вены отводит кровь из части печени, расположенной влево от серповидной связи.

3. Щели между дольками не пусты, а в каждой из них обнаруживается один из главных стволов противоположной системы.

4. В ходе исследований авторы наблюдали так наз.«овальные», «трехугольные» и «переходные» формы печени. Между этими формами печени и типом разветвлений или размером идущих в них сосудистых систем удалось выявить взаимосвязь.

Dr. József Faller: Dr. György Ungváry:	Budapest IX. Tűzoltó u. 58., Hungary
---	--------------------------------------
Department of Histology and Embryology (Head: Asst. Prof. J. JONEK), Silesian Academy of Medicine

DIHYDRONICOTINAMIDE-ADENINE DINUCLEOTIDE (NADH₂) DIAPHORASE, THIAMINE PYROPHOSPHATASE AND ACID PHOSPHATASE IN THE SPINAL CORDS OF RABBITS WITH CHRONIC MANGANESE POISONING

J. JONEK and Z. OLKOWSKI

(Received July 10, 1964)

Thiamine pyrophosphatase (TPP-ase), acid phosphatase and dihydronicotinamideadenine dinucleotide (NADH₂)-diaphorase has been studied in the spinal cord of rabbits with chronic manganese poisoning. A decrease of NADH₂-diaphorase and TPP-ase activities and an increase of acid phosphatase activity has been observed. The changes in activity of the investigated enzymes had probably resulted from the toxic influence of manganese upon the neurons. It is concluded that manganese might interfere with cellular oxidation and carbohydrate metabolism. The increase of acid phosphatase activity and the appearance of cytolysosomes in the neurons seem to point to an enhancement of catabolic processes in the neurons.

Introduction

Manganese and its compounds are widely used in industry [3]. It is a metal causing chronic poisoning in workers coming in contact with it. The manganese dust and steam find their way into the organism through the respiratory tract and affect mainly the nervous system. In chronic poisoning degeneration and atrophy of neurons, focuses of emollition subcortical nuclei and the cerebral cortex occur [3]. In the pulmonary alveoli manganese forms compound with protein which pass directly into the blood [7]. Indirectly, manganese passes into the blood by reticuloendothelial action [22]. The protein compounds pass from the blood to the tissues and organs [12], and are stored in the liver, the kidneys and other parenchymal organs, and according the some authors, in the central nervous system [7]. Chronic accumulation of manganese explains to a certain degree the late symptoms and the progressive illness, which may appear after the patient has left his original work [3]. Excretion of manganese is slow and takes place through the alimentary tract and to a smaller extent through the kidneys. Mode and site of action of manganese are unknown; studies of certain enzymes in the central nervous system and in other tissues [9, 11] would probably allow some insight.

Material and methods

The experiments were made on 10 adult female rabbits weighing 2500-3000 g. Seven experimental animals were treated intravenously with 1 mg/kg body weight of MnCl₂. 4H₂O in 0.15 *M* NaCl each other day for 68 days. Three rabbits formed the control group. After 68 days

all animals were decapitated. The spinal cord was removed, fixed overnight in cold Baker's solution and cut by a freezing microtome into sections 15 microns thick. The following enzymes were investigated: thiamine pyrophosphatase (TPP-ase) according to NOVIKOFF et al. [13, 14, 15], acid phosphatase according to GOMORI [21] and dihydronicotinamide-adenine dinucleotide (NADH₂)-diaphorase according to NOVIKOFF et al. [16] Some sections were stained with haema-toxilin and eosin.



All micrographs have been made with $\times 10$ eyepiece and $\times 40$ lens Figs 1 and 2. NADH₂-diaphorase activity in spinal neurons of the controls

Results

$NADH_2$ -diaphorase — Control group

In the spinal motoneurons NADH_2 -diaphorase is located in the granules, most of which are distributed around the nucleus, while the rest near the cell membranes. The same picture is seen in the posterior horns. In the nerve fibres the reaction seems to be negative (Figs 1, 2).

$NADH_2$ -diaphorase — Experimental group

 $\rm NADH_2$ -diaphorase activity is decreased in the motoneurons of the anterior horns (Figs 3, 4). The positive reaction is still located around the nucleus, but a smaller amount of granules is found. In the rest of the cytoplasm there are less positive granules than in the controls. In the neurons of the

posterior horns a decrease of activity is also evident. In the white matter the reaction seems to be similar to that in the controls.

TPP-ase — Control group

In the spinal motoneurons TPP-ase activity occurs in the form of threadlike structures, granules and vesicles, lying around the nucleus in nearly the



Figs 3 and 4. NADH_2 -diaphorase activity in spinal neurons of animals with manganese poisoning

whole cytoplasm (Fig. 5). The intensity of this activity is not uniform. The interior of the vesicles seems to have a weaker TPP-ase activity than the peripheral parts. In the commissural cells the activity occurs in the form of threads and granules distributed in the whole cytoplasm and is weaker than in the motoneurons. In the posterior horns there are few cells showing activity. In the white matter the activity is situated in the blood wessel walls. In the ependymal epithelium of the central canal the activity is found in the form of granules and short threads in the whole cytoplasm.

TPP-ase - Experimental group

In the spinal motoneurons a decrease of TPP-ase activity appears. The enzyme is located in threads, granules and vesicles, but these structures are



Fig. 5. TPP-ase activity in spinal cord of control animal



Fig. 6. TPP-ase activity in spinal cord of animal with manganese poisoning

less numerous (Fig. 6). Simultaneously a diffuse reaction appears. In the commissural cells activity is weaker than in the controls. In the spinal white matter an increase of TPP-ase activity in the walls of blood vessels is found. In

the cells of the ependymal epithelium of the central canal activity seems to be stronger than in the control group.

Acid Phosphatase — Control group

In the spinal motoneurons activity occurs in granules lying in the whole cytoplasm, but especially around the nucleus. In the commissural cells activity is distributed in granules over the whole cytoplasm. In the neurons of the



Fig. 7. Acid phosphatase activity in spinal cord of control animal

posterior horns the same picture is observed. In the white matter only few granules indicate activity. In the ependymal epithelium of the central canal activity is found in granules situated in the cytoplasm above the nucleus (Fig. 7).

Acid Phosphatase – Experimental group

In most spinal motoneurons there is a marked increase of activity. The reaction appears in the form of big granules, cytolysosomes, (Figs 8, 9) located in the whole cytoplasm. In certain motoneurons there is a diffuse reaction with a decrease in the number of positive granules. In the commissural cells the picture is similar. In the neurons of the posterior horns activity is increased.



Figs 8 and 9. Acid phosphatase activity in spinal motoneurons of animal with manganese poisoning

The reaction seems to be more diffuse than granular. In the white matter activity is the same as in the controls. In the ependymal epithelium of the central canal the reaction is stronger than in the control group.

Discussion

In order to clarify the pathogenesis of manganese poisoning we have studied the behaviour of some enzymes in the spinal cords of rabbits with chronic intoxication. To find out the probable disturbance in secretion or storage of the metabolic products, we investigated the Golgi apparatus for TPP-ase and acid phosphatase as enzymes connected with the Golgi zone [8, 15, 18, 20, 24], and NADH₂-diaphorase which to a certain extent is the measure of cellular oxidative processes TPP-ase in the opinion of some authors allows to state the location of the membraneous structures of the Golgi apparatus [8, 14, 15, 17, 18, 20, 24]. Thiamine diphosphate, the form in which predominant quantities of vitamin B₁ occur in animal organisms [19] plays an important role in tissues. This role is probably connected with cellular oxida-

Acta morph. tomus XIII.

MAGYAR Huuhantos akaderea Kunyitara tion [4] as the quantities of a-ketoglutarate, acetate, pyruvate and citrate are decreased by a diet lacking in thiamine [6], and the lack of thiamine inhibits oxidative processes while administration of thiamine or thiamine diphosphate restores cellular oxidation to the normal level [4]. The decrease of TPP-ase activity in the spinal cord of rabbits with chronic manganese poisoning may thus indicate disturbances in the a-ketoglutarate, acetate, pyruvate and citrate metabolism.

It is remarkable that a decrease of TPP-ase activity should take place as manganese is otherwise known to activate that enzyme [1, 2], but a similar decrease of leucine aminepeptidase activity has been observed in the liver of animals with manganese poisoning in spite of the fact that this enzyme is also activated by manganese [10]. We ascribe this to the fact that the doses of manganese administered by us were much larger than that activating the enzymes *in vitro*. Besides, the reactions observed in *vivo* and *in vitro* cannot be compared.

SHIMIZU et al. studying the brain of animals treated with diet lacking thiamine found an increase in alkaline phosphatase and a decrease in acid phosphatase [23]. Many data underline the interrelation between Golgi's apparatus and the lysosomes in which acid phosphatase is located, for instance after ligation of the blood vessels [8, 20], in experimental diphtheric meningitis in the rat [5], after oestrogen treatment in the uterine epithelium in mice [24], etc. Changes in Golgi's apparatus are preceded by changes in the lysosomes [5,8,20,18,24]. In chronic manganese poisoning an increase of acid phosphatase activity and a decrease of TPP-ase activity have been observed. The increase of acid phosphatase activity may indicate an enhancement of catabolic processes associated with a low oxidation rate and simultaneously a higher amount of unoxidated substances which are hydrolyzed.

The disturbance of oxidative processes is shown by the decrease of $NADH_2$ -diapherese activity in the neurons of animals with chronic manganese poisoning. This enzyme occurs in mitochondria, in the endoplasmic reticulum and in the membranes of Golgi's apparatus. It has been concluded that manganese interferes with enzymatic processes in the neurons and this is probably responsible for the symptoms appearing in chronic poisoning.

REFERENCES

1. ALLEN, J. M.: (1963) The Properties of Golgi-Associated Nucleoside Diphosphatase and Thiamine Pyrophosphatase: I. Cytochemical Analysis. J. Histochem. Cytochem. 11, 529. - 2. ALLEN, J. M.: (1963) The Properties of Golgi – Associated Nucleoside -Diphosphatase and Thiamine Pyrophosphatase: II. Electrophoretic Separation and Identification. J. Histochem. Cytochem. 11, 542. - 3. BAADER, E.: (1954) Gewerbekrankheiten. Urban und Schwarzenberg, München. - 4. BANGA, I., OCHOA, S., and PETERS, R. A.: (1939) Pyruvate Oxidation in Brain. VI. The Active Form of Vitamin B₁ and Role of C₄ Dicarboxylic Acids. Biochem. J. 33, 1109. - 5. BECKER, N. H., NOVIKOFF, A. B., GOLDFISCHER, S.: (1961) A

Cytochemical Study of the Neuronal Golgi Apparatus. Experimental Diphtheric Encephalitis in Rats. Arch. Neurol. Chic. 5, 497. - 6. GREN, D. E., STUMPF, P. K., ZARUDNAYA, K.: (1947) Diacetyl Mutase. J. Biol. Chem. 167, 811. – 7. GUARDASCIONE, V.: (1954) Malattie causata da mangenese, I. N. A. I. L. Roma. – 8. GUBAIA, Z., OLKOWSKI, Z.: (1963) Studies on the Functional and Morphological Relationship Between Lysosomes and Golgi Structures. Folia histochem. cytochem, 1, 207. - 9. JONEK, J. JONDERKO, G.: (1964) Das Verhalten der Atmungsfermente in der Leber nach Manganvergiftung. (In press.). - 10. JONEK, J., JON-DERKO, G.: (1964) Histochemische Untersuchungen über das Verhalten der Leucinaminopeptidase im quergestreiften Muskel und in der Leber nach akuter Manganvergiftung. (In press). - 11. JONDERKO, G., JONEK, J.: (1964) Die Aktivität einiger Enzyme im quergestreiften Muskel nach experimenteller Manganvergiftung. (In press). -12. KOELSCH, F.: (1959) Handbuch der Berufskrankheiten. Gustav Fischer Verlag, Jena. - 13. NOVIKOFF, A. B., GOLDFISCHER, S. ESSNER, E.: (1961) The Importance of Fixation in Cytochemical Method for the Golgi Apparatus. J. Histochem. 9, 459. - 14. NOVIKOFF, A. B., GOLDFISCHER S.: (1961) Nucleoside Diphosphatase Activity in the Golgi Apparatus and its Usefulness for Cvtological Studies. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 47, 802. - 15. NOVIKOFF, A. B.: (1961) Observations on the Golgi Apparatus and Related Lysosomes. Biol. Bull. 121, 369. - 16. NOVIKOFF, A. B., WOO, J. S., DRUCKER, J.: (1961) Mitochondrial Localization of Oxidative Enzymes: Staining Results with Two Tetrazolium Salts. J. biochem. Cytol., 9, 47. - 17. Novi-KOFF, A. B.: (1961) Lysosomes and Related Particles. In The Cell. Ed. by J. Brachet and A. Mirsky. Academic Press, New-York, 2, 424-481. – 18. NOVIKOFF, A. B., ESSNER E.: (1962) Pathological Changes in Cytoplasmic Organelles. Proc. 21, 1130. – 19. ОСНОА, S. PETERS R. A.: (1938) Vitamin B1 and Cocarboxylase in Animal Tissues. Biochem. J., 32, 1501. - 20. OLKOWSKI, Z., GUBAŁA Ż.: (1964) Cytochemical Studies on the Functional and Morphological Interrelation between Lysosomes and Golgi Apparatus in Epididymis Epithelium. Folia biol. (Krakow) 12, 175. – 21. PEARSE, A. G. E.: (1960) Histochemistry, Theoretical and Applied. Churchill, London. - 22. RODIER, J.: (1955) Brit. J. Industr. Med. 1, 12. - 23. SHIMIZU, N., HANDA J., and KUMOTO T.: (1950) Histochemical Studies of Phosphatase in the Nervous System of Thiamine Deficient Pigeons. Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.) 75, 696. – 24. STEPLEWSKI, Z., OLKOWSKI, Z.: (1962) Cytochemical Studies on the Interrelation Between Lysosomes and the Golgi Zone in Uterine Epithelium. Bull. Acad. Spol. Sci. 10, 495.

DIHYDRONIKOTINAMID-ADENIN-DINUKLEOTID (NADH₂) DIAPHORASE, THIAMIN-PYROPHOSPHATASE UND SAURE PHOSPHATASE IM RÜCKENMARK VON RATTEN BEI CHRONISCHER MANGANVERGIFTUNG

J. JONEK und Z. OLKOWSKI

Im Rückenmark von Ratten mit chronischer Manganvergiftung wurden die Enzyme Thiamin-pyrophosphatase (TPP-ase), saure Phosphatase und Dihydronikotinamid-adenindinukleotid (NADH₂)-diaphorase bestimmt. Es wurde eine Abnahme der NADH₂-asen und TPP-asenaktivität und eine Zunahme der Aktivität der sauren Phosphatase festgestellt. Die Änderungen sind vermutlich der toxischen Wirkung des Mangans auf die Neuronen zuzuschreiben. Auf Grund dieser Ergebnisse wird angenommen, daß bei chronischer Manganeinwirkung die Zelloxydation und der Kohlenhydratstoffwechsel eine Störung erleiden. Die Zunahme der sauren Phosphatase sowie das Erscheinen von Cytolysomen in den Neuronen weist auf die Intensität der katabolischen Vorgänge in den Neuronen hin.

ПОВЕДЕНИЕ ДИГИДРОНИКОТИНАМИД-АДЕНИН-ДИНУКЛЕОТИД (NADH₂)-ДИАФОРАЗЫ, ТИАМИН-ПИРОФОСФАТАЗЫ И КИСЛОЙ ФОСФАТАЗЫ В СПИННОМ МОЗГЕ КРЫС ПОСЛЕ ХРОНИЧЕСКОГО ОТРАВЛЕНИЯ МАРГАНЦЕМ

Й. ЙОНЕК и З. ОЛКОВСКИ

Авторы изучали спинной мозг крыс, хронически отравленных марганцем. Исследования распространились на следующие энзимы: тиамин-пирофосфатазу (ТПФ), кислую фосфатазу и дигидроникотинамид-аденин-динуклеотид (NADH₂)-диафоразу. Установлено понижение активности NADH₂- и ТПФ-азы, и повышение активности кислой фосфатазы

в спинном мозге подопытных животных. Изменения активности исследовавшихся энзимов, предположительно, обуславливаются действием марганца на нейроны. На основании полученных результатов авторы придерживаются того мнения, что при хроническом воздействии марганца на нейроны нарушаются процессы окисления клеток и метаболизма сахаратов. Повышение активности кислой фосфатазы и появления в нейронах цитолизомов, по-видимому, указывает на большую интенсивность катаболических процессов, происходящих в нейронах.

Dr. med. Jan JONEK: Zabrze-Rokitnica, ul. K. Marksa 19., Dr. med. Zbigniew Olkowski: Poland

Institut für Anatomie (Direktor: Prof. Dr. J. SZENTÁGOTHAI) der Medizinischen Universität, Budapest

DIE LYMPHGEFÄSSSTRUKTUR DER DÜNNDARMWAND

J. VAJDA und THERESIA TÖMBÖL

(Eingegangen am 4. August 1964)

Das Lymphsystem der Dünndarmwand wurde mit der Durchlichtungsmethode untersucht und festgestellt, daß aus der Topographie der einzelnen Geflechte bzw. aus ihrer Verbindungen klar folgt, welche Faktoren auf die Strömung der aus dem Darm absorbierten Lymphe einwirken. Maß und Geschwindigkeit der Absorption werden von der auf nervösen Einfluß zustandekommenden Erschlaffung oder Kontraktion der Tunica muscularis mucosae bestimmt. Bei den Lymphgefäßen der Darmwand wird ein in Ruhezustand ableitendes und ein sich bei größerer Lymphproduktion in die Ableitung einschaltendes Lymphsystem unterschieden.

In der Literatur sind zahlreiche Angaben über die Lymphgefäße, ihren Aufbau, ihren Verlauf innerhalb der einzelnen Organe sowie ihre Verhältnisse zu den Gefäßen zu finden. Obwohl die diesbezüglichen Untersuchungen mit den verschiedensten Verfahren (Peroxyd-, Vitalfärbungs-, Injektions-, Stauungs-, Fettfütterungs-, Silberimpregnations-, Fluoreszenz-, elektronenmikroskopische usw. Methoden) durchgeführt worden sind, sind die Ansichten hinsichtlich der Topographie des Gefäßnetzes in der Darmwand sowie des Vorhandenseins zentraler Lymphgefäße noch immer Geteilt. In letzter Zeit haben GRAU und SCHLÜNS mit der Fluoreszensmethode nach Fettfütterung das Bestehen zentraler Lymphgefäße überzeugend bewiesen. Die diesbezügliche Auffassung von HYRTL und TEICHMANN wurde auch durch neuere japanische elektronenmikroskopische Untersuchungen bekräftigt.

Eine ähnliche Meinungsverschiedenheit herrscht hinsichtlich der Topographie der in der Dünndarmwand befindlichen Lymphgefäße bzw. Geflechte. Die Lymphgefäße der Darmwand und des Mesenteriums wurden von HORST-MANN und JAMIOLSKOWKA und anderen Autoren morphologisch untersucht.

Untersuchungsmaterial und Methodik

Um die in der Darmwand befindlichen Lymphgeflechte, deren Topographie und strukturellen Aufbau entsprechend untersuchen zu können, wendeten wir die sogenannte Durchhellungsmethode an, die wir zur räumlichen Orientierung für am geeignetsten halten.

Unsere Versuche wurden an Hunden und Katzen annähernd gleicher Größe, gleiches Gewichtes und Alters vorgenommen. In Äthernarkose wurde nach Eröffnung der Bauchhöhle in die verschiedenen Abschnitte des Dünndarmes mit dünner Nadel und schwachem Druck – der von KUBIK verwendeten Methode gemäß – eine kleine Menge zehnfach verdünnter, filtrierter Tusche in die einzelnen Schichten injiziert. Die Injektionen wurden danach in einigen Fällen mit größerem Druck wiederholt. Die Exaktheit der schichtweise verabfolgten Injektion wurde nach der Durchhellung kontrolliert. Die Tiere wurden nach der Injektion in 2stündigen Intervallen getötet. Der Weg der Tusche wurde nach der Durchhellung des Darmabschnittes untersucht. Von Druck und Tiefe der Injektion abhängig gelang es, die Lymphgefäße der Serosa und Subserosa und auch der muskulären und submukösen Schicht retrograd aufzufüllen, da es an diesen Stellen noch wenig, die Strömungsrichtung beeinflussende Klappen in den Lymphgefäßen gibt. Mit dieser Methode gelang hingegen die Auffüllung der zentralen Lymphgefäße nicht. Die Tusche ist in jedem Fall — unabhängig von dem Injektionsdruck — scharf abgegrenzt an der der Tunica muscularis mucosae entsprechenden Linie stecken geblieben.

Danach wurde den Versuchstieren zwecks Auflockerung der glatten Darmmuskulatur 0,01 g/kg Körpergewicht Papaverin hydrochloricum verabreicht. Nach solcher Vorbereitung gelang es in jedem Fall, durch die Tunica muscularis mucosae die zentralen Chylusgefäße retrograd aufzufüllen.

Um den physiologischen Weg der Absorption verfolgen zu können, wurde an einem Dünndarmabschnitt eine »end to side« Anastomose herangelegt und – von der Weite des Darmlumens abhängig – 1–3 ml verdünnte und filtrierte Tusche in den etwa 10 cm langen Stumpf eingespritzt. In den in regelmäßigen Zeitabschnitten entnommenen und durchlichteten Darmabschnitten konnten in den Zotten nach 5–6Stunden Tuschekörnchen beobachtet werden. Zwecks Erleichterung der Absorption wurden auch in dieser Versuchsserie kleine Dosen Papaverin verabreicht. Ohne Papaverinvorbehandlung gelangte die Tusche nach 14–16Stunden in das submuköse Geflecht, während sich das Geflecht nach Vorbehandlung bereits nach 5–6Stunden gut auffüllte. Diese Versuche beweisen, daß Maß und Geschwindigkeit der Absorption vom augenblicklichen Zustand der Tunica muscularis mucosae bestimmt werden. Weitere diesbezügliche Untersuchungen sind im Gange.

Ergebnisse und Besprechung

Auf Grund der Befunde läßt sich das Lymphsystem der Dünndarmwand folgendermaßen rekonstruieren:

An der Grenze des mittleren und Spitzendrittels der einzelnen Zotten nimmt das zentrale Lymphgefäß mit einer geringen Erweiterung seinen Anfang. Die Erweiterungen befinden sich - vom Kontraktions- oder Erschlaffungszustand der Zotten abhängig - nicht in gleicher Höhe. Bis zur Basis der Zotten verläuft das zentrale Lymphgefäß (Abb. 1) genau in der Achse der Zotte. Auf dem basalen Teil der Zotten kommen zwischen den einzelnen Chylusgefäßen Anastomosen zustande. Entweder teilt sich das zentrale Lymphgefäß in 3-4 Teile und stehen diese Nebenäste miteinander in Verbindung, oder gehen die Anastomosen aus dem in der Mitte der Zotte verlaufenden Lymphgefäß selber aus. Die aus diesem Netz hervortretenden allmählich dünner werdenden, und schließlich strahlenförmig verlaufenden Lymphgefäße erreichen die Tunica muscularis mucosae, worin sie ein lockeres Geflecht bilden. Aus diesem führen einige größere Lymphgefäße in die Submucosa hinüber (Abb. 2). Hier kommt ein weit ausgebreiteter, reich anastomisierender Plexus zustande (Abb. 3). Am durchlichteten Darmabschnitt ähnelt dieses Geflecht einem Stauungsreservoir der Lymphe. Auf dem Längsschnitt der muskulären Schicht weisen die Lymphgefäße eine polygonale Form auf und umfangen die Muskelstränge (Abb. 4). Recht häufig sind aber auch dickere, meistens gleich weite Lymphgefäße zu beobachten, die von der Submucosa ausgehend, schräg über die muskuläre Schicht bis zur Serosa ziehen (Abb. 5). In diesen sind bereits in jedem Fall Klappen – zumeist mit einem zusätzlichen Segel – zu finden (Abb. 6). Für

diese durchlaufenden Lymphgefäße ist noch kennzeichnend, daß sie nicht in jedem Fall an der Bildung des Serosanetzes teilnehmen, sondern in eines der ableitenden Lymphgefäße einmünden. Die aus dem Plexus entspringenden



Abb. 1. Darmzottenquerschnitt mit aufgefüllten Chylusgefäßen



Abb. 2. Die vom Lumen aus aufgefüllten zentralen Chylusgefäße 1. Basales Geflecht, 2. Tunica muscularis mucosae, 3. Submuköses Lymphgefäßnetz

wenigen, dünneren muskulären Lymphgefäße münden in die subserösen, zur Längsachse des Darmes senkrecht und miteinander parallel verlaufenden, eine gestreckte U-Form aufweisenden Lymphgefäße (Abb. 7). Diese bogenförmigen Lymphgefäße überbrücken die Bündel der äußeren Längsmuskelschicht und stehen mit dem Serosanetz in Verbindung. Das verzweigte, poly-

gonale Serosanetz zieht, entweder einen gemeinsamen Stamm bildend, oder in eines der aus den tieferen Schichten kommenden Lymphgefäße mündend, weiter (Abb. 8). In den oberflächlichen ableitenden Lymphgefäßen sind bereits



Abb. 3. Submuköses Lymphgefäßnetz



Abb. 4. Muskuläres Lymphnetz

in jedem Fall Klappen mit 2 Segeln zu finden (Abb. 9). Die zustandegekommenen Hauptlymphgefäße stehen — in Richtung des mesenterialen Darmrandes ziehend — infolge des reichen Anastomosensystems in enger Verbindung miteinander (Abb. 10).

Betrachtet man das Lymphsystem des Dünndarms als Ganzes (Abb. 11), so ist zu beobachten, daß einer jeden, einer aktiven Bewegung fähigen Schicht

je ein Lymphgeflecht folgt. So befindet sich ein Geflecht bei der Basis der Zotten, der Tunica muscularis mucosae folgt das reiche submuköse Geflecht, während auf der muskulären Schicht der subseröse Plexus zustandekommt.



Abb. 5. Muskuläres Lymphnetz im Querschnitt



Abb. 6. 1. Zentrales Lymphgefäß, 2. basales Geflecht 3. submuköses Netz, 4. durch die muskuläre Schicht verlaufendes ableitendes Lymphgefäß, 5. subseröses Geflecht

Aus diesem Aufbau läßt sich darauf schließen, daß die auf neurale Einwirkung funktionierenden Schichten entweder der vor ihnen bereits angesammelten Lymphe durch ihre Erschlaffung den Weg frei geben, oder sie diese bei ihrer Kontraktion aus sich herauspressen. Im letzteren Fall kommt — wie dies bereits in der muskulären Schicht zu beobachten ist — den Klappen eine



Abb. 7. Subseröses Netz



Abb. 8. Oberflächliches Serosanetz



Abb. 9. Aus dem oberflächlichen Serosanetz ableitendes, mit Klappe versehenes Lymphgefäß Acta morph. tomus XIII.



Abb. 10. Anastomisierende ableitende Lymphgefäße



Abb. 11. 1 Zentrales Chylusgefäß. 2. Basales Geflecht. 3. Tunica musc. mucosae. 4. Submuköses Geflecht. 5. Muskuläres Netz. 6. Subseröses Geflecht. 7. Oberflächliches Netz. 8. Ableitendes Lymphgefäß

entscheidende Bedeutung zu; wenn diese fehlen, ist die Stromrichtung nicht gewährleistet. Vom Gesichtspunkt der Lymphströmung läßt sich die Tunica muscularis mucosae auch als Schicht auffassen, die — die Klappen ersetzend aus dem weiten submukösen Geflecht die retrograde Strömung verhindert. Die aus der Submucosa ausgehenden und bis zur Oberfläche schräg verlaufen-

den, über Klappen verfügenden Lymphgefäße leiten im Ruhezustand des Darmes die Lymphe ab. Bei hungernden Tieren fanden wir in diesen Lymphgefäßen nur aus dem Darmstumpf absorbierte Tusche. Bei verstärkter Lymphproduktion fällt nach reichlicher Ernährung den einzelne Geflechte verbindenden Lymphgefäßen — in denen die Strömung durch die Bewegung der aktiven Schichten aufrechterhalten wird — erst nach der Auffüllung der Plexus eine bedeutendere Rolle zu. Wir schließen uns der Auffassung mehrerer Autoren an, laut welcher das submuköse Geflecht nebst seiner Reservoirfunktion auch für die Einkonzentrierung der Lymphe verantwortlich ist.

LITERATUR

1. FAVORO, G.: (1908) Ueber der Ursprung des Lymphgefäßsystems. Anat. Anz. 33, 75. – 2. GRAU, H., SCHLÜNS, J.: (1962) Experimentelle Untersuchungen zum zentralen Chylusraum der Darmzotten. Anat. Anz. 111, 241–249. – 3. HORSTMANN, E.: (1952) Über die funktionelle Struktur der mesenterialen Lymphgefäße. Morph. Jb. 91, 483. - 4. JAMIOL-KOWSKA, K.: (1952) The Lymphatic Vessels of the Small Intestine. Folia morph. (Warszawa) 22/2, 123-144. - 5. KUBIK, I.: (1952) Die hydrodynamischen und mechanischen Faktoren in der Lymphzirkulation. Acta morph. Acad. Sci. hung. 2, 95. – 6. KRAUS, H.: (1962) Zur Kreislaufmechanik im Bereiche des Lymphknotens. Anat. Anz. 111, 207–212. – 7. KRAUS, H.: (1959) Das Lymphsystem in funktionell-anatomischer Sicht. Anat. Anz. 107, Heft 6/10. -8. LAWRENTEW, A. P.: (1927) Über die Nerven der Lymphgefäße in der Bauchhöhle. Anat. Anz. 63, 268. – 9. RÉNYI-VÁMOS, F.: (1960) Das innere Lymphgefäßsystem der Organe. Verl. d. Ungarischen Akademie d. Wissenschaften, Budapest. - 10. Rusznyák, I., Földi, M., SZABÓ, GY.: (1957) Physiologie und Pathologie des Lymphkreislaufs. Verl. d. Ungarischen Akademie d. Wissenschaften, Budapest. - II. SIMER, P. H.: (1947) The Drainage of Particulate Matter from the Peritoneal Cavity by the Lymphatics. Anat. Rec. 88, 175. -12. YAMA-GISHI, T.: (1960) The Fine Structure of the Small Lymph and Blood Vessels in the Serous and Muscular Coats and Mesentery of the Small Intestine of Various Vertebrates. Nagoya med. J. 215, 6.

LYMPHATIC APPARATUS OF THE WALL OF THE SMALL INTESTINE

J. VAJDA and T. TÖMBÖL

Enteroscopic examination of the lymphatics of the small intestine has proved that the topography of the various plexuses and their communications permit conclusions to the factors which influence the flow of lymph absorbed from the intestine. Extent and rate of the absorption are determined by the neurally conditioned relaxation and contraction of the tunica muscularis mucosae. Two kinds of lymph vessels can be distinguished in the intestinal wall: efferent vessels which operate at rest, and a second system which is inserted into the efferent apparatus when the volume of lymph is increased.

СТРУКТУРА ЛИМФАТИЧЕСКИХ СОСУДОВ СТЕНКИ ТОНКОЙ КИШКИ

Й. ВАЙДА и Т. ТЁМБЁЛ

Лимфатическая система стенки тонкой кишки исследовалась методом просвечивания. Было установлено, что на основании топографии отдельных сплетений или их соединений можно определить, какие факторы воздействуют на ток лимфы, абсорбирован-

ной из кишки. Размер и скорость абсорбции регулируются ослаблением или сокращением слизистой оболочки мышцы, возникающих при невральном воздействии. В стенке тонкой кишки можно различать две системы лимфатических сосудов, одна отводит лимфу при состоянии покоя, а другая включается лишь в случае повышенного образования лимфы.

Dr. János Vajda: Dr. Teréz Tömböl: Budapest IX. Tűzoltó u. 58., Ungarn



Anatomisches Institut (Direktor: Prof. Dr. J. SZENTÁGOTHAI) der Medizinischen Universität, Budapest

BEITRÄGE ZUM MESENTERIALEN LYMPHKREISLAUF

J. VAJDA und THERESIA TÖMBÖL

(Eingegangen am 6. August 1964)

Die Wirkung der arteriellen Pulswelle auf die Lymphströmung in dem Gekröse und der Darmwand wird angenommen. Die Ampullen, die sich an den Lymphgefäßen bei der Kreuzung derselben mit den Arterien befinden, übernehmen die Pulswelle und fördern dadurch die Entleerung der Lymphgefäße. Angesichts der Gesamtheit des mesenterialen Lymphkreislaufs wird die Rolle der Anastomosen zwischen den Hauptstämmen, sowie die der Reserve-Lymphgefäße, in der Behebung der sich auf kleinere mesenteriale Gebiete beschränkenden Lymphüberlastung wiederum die der Kollateralen und der Shunts hervorgehoben.

Die Auffassung, laut welcher der zwischen den Klappen gelegene Lymphgefäßabsehnitt als eine selbstständig funktionierende Einheit aufgefaßt werden soll, wird bestätigt.

Mehrere Autoren haben die Morphologie und den Ablauf der mesenterialen Lymphgefäße (KUBIK, SHDANOW, HORSTMANN), andere wiederum die Innervierung derselben untersucht (DOGIEL, LAWRENTJEW, KUBIK). Der histologische Aufbau der Lymphgefäße, sowie die funktionale Beschaffenheit, Blutversorgung und Innervation der Lymphknoten bildeten ebenfalls Gegenstand der Forschung. Jüngst berichtete YAMAGISHI auf Grund elektronenmikroskopischer Untersuchungen über Unterschiede zwischen Lymph- und Blutkapillaren. Trotz der zahlreichen Mitteilungen gibt es nur wenige Angaben über den mesenterialen Lymphkreislauf.

Material und Methode

Die Untersuchungen wurden an jungen Hunden und Katzen ausgeführt. In Äthernarkose wurde die Bauchhöhle geöffnet und ein Abschnitt des Dünndarmes mit seinem Mesenterium ausgestreckt. Wir trachteten das physiologische Maß der Spannung des Mesenteriums, und dadurch den ursprünglichen Zustand der in der Bauchfellduplikatur verlaufenden dünnwandigen Lymphgefäße beizubehalten. Um eine Austrocknung zu verhüten, wurden die ausgestreckten Abschnitte mit lauwarmer physiologischer Kochsalzlösung befeuchtet. Einem Teil der Tiere wurde vor der Operation fettreiche Nahrung zugeführt. So konnten wir uns schon mit unbewaffnetem Auge über Ablauf und Lage der sichtbar gewordenen Lymphgefäße orientieren. Einen anderen Teil der Tiere ließen wir vor der Operation 24 Stunden hungern. Bei beiden Gruppen wurde zehnfach verdünnte, auf Körpertemperatur erwärmte, filtrierte Tusche mit einer dünnen Nadel, unter leichtem Druck in ein an der Dünndarmoberfläche sichtbares Lymphgefäß gespritzt. In anderen Fällen verfolgten wir den Weg der Resorption des in die Darmwand gegebenen Tusche-Depots in den Lymphgefäßen des Gekröses. Die Einspritzung wurde dann mit größerem Druck wiederholt, ohne jedoch damit eine Klappeninsuffizienz zu verursachen; das Schließen der Klappen wurde nach der Aufhaltung sorgfältig kontrolliert. Der injizierte Gekröseabschnitt mit dem dazugehörenden Darmsegment und Lymphknoten wurde sofort, oder bei Anlegen eines Tusche-Depots nach 30 bzw. 60 Minuten entfernt, und nach Formolfixierung aufgehellt.

Ergebnisse und Folgerungen

Das aufgehellte Material wurde stereomikroskopisch untersucht. Die Lymphgefäße wiesen am mesenterialen Rande, wo sie von Schlagadern über-



Abb. 1. Ampullen und das die arterielle Arkade begleitende Lymphgefäß



Abb. 2. Anastomosierende Lymphgefäße

kreuzt werden, in allen Fällen eine mäßige Erweiterung, eine Ampulle auf. Die Ampulle befindet sich an jenem Abschnitt des Lymphgefäßes, der den Adern anliegt und sie rechtwinklig kreuzt (Abb. 1). Vor der Ampulle befindet sich eine Klappe im Lymphgefäß. KUBIK beschrieb ähnliche Ampullen unmittelbar vor den Lymphknoten an den mesenterialen Lymphgefäßen und auch an anderen Abschnitten des Lymphsystems. Die Ampullen münden rechtwinkelig in das die arteriellen Arkaden begleitende, bogenförmig ablaufende Abflußgefäß, das mit den benachbarten ableitenden Hauptlymphstämmen in Ver-

bindung steht. Die Lymphgefäße verfolgen im weiteren die Richtung der im Gekröse verlaufenden Blutgefäße. Diese Lymphgefäße bilden ein mächtiges Anastomosensystem untereinander im darmnahen Bezirk des Mesenteriums



Abb. 3. Ein- und Zweisegel-Klappen an demselben Lymphgefäß



Abb. 4. Ableitende Hauptlymphstämme in Ausbildung

(Abb. 2). Es sind in den anastomosierenden Lymphgefäßen zahlreiche bikuspidale Klappen zu sehen, an den schmaleren kommen auch Klappen mit einem Segel oder beide Formen abwechselnd vor (Abb. 3). Vor den Einflußstellen nimmt die Anzahl der Klappen zu. Dem reichlichen Netz der Anastomosen entspringt je ein ableitender Hauptstamm an beiden Seiten des Blutgefäßes (Abb. 4). Die Lymphstämme verlaufen parallel mit den Blutgefäßen,



Abb. 5. Ableitende Hauptlymphstämme in Ausbildung



Abb. 6. Zweisegel-Klappen in den Hauptlymphstämmen



Abb. 7. Anastomose zwischen den Hauptlymphstämmen

kommen jedoch mit diesen nicht in Berührung (Abb. 5). An diesen Lymphgefäßen befinden sich bikuspidale Klappen (Abb. 6). In jeden mesenterialen Lymphknoten münden 4-5 afferente mäßig erweiterte Hauptlymphstämme mit kurzen Abschnitten zwischen den Klappen ein.



Abb. 8. Reserve-Lymphgefäße neben den Arterien



Abb. 9. Reserve-Lymphgefäße verschiedenen Kalibers

An den Präparaten, wo die Tusche unter größerem Druck in die Lymphgefäße gespritzt wurde, waren außerdem dünnere Lymphgefäße zu beobachten.

In Präparaten, die eine halbe Stunde nach Eingabe des Tusche-Depots verfertigt wurden, fallen zwischen den Hauptstämmen zahlreiche Anastomosen auf. Die verbindenden Äste kreuzen den Gefäßstrang in spitzem Winkel; sie sind schmäler als die Hauptstämme und besitzen Klappen (Abb. 7). Vom Anastomosensystem, das sich am darmnahen Rande befindet, geht ein sog.



Abb. 10. Kollateralgefäß mit Klappen, den Zusammenfluß überbrückend



Abb. 11. Kollateralgefäß mit Klappen, den Zusammenfluß überbrückend

Reserve-Lymphgefäßstrang aus, welcher dicht an die Arterien anliegt und mit diesen verläuft (Abb. 8). Das Lumen dieser Gefäße ist sehr unterschiedlich (Abb. 9); ihre Klappen befinden sich manchmal 4-5 cm voneinander entfernt. In der unmittelbaren Nähe der Lymphknoten münden die Reserve-Lymphgefäße in einen der Hauptstämme ein. Unmittelbar in den Lymphknoten eintretende Reserve-Lymphgefäße wurden nicht beobachtet.

Bei den darmnahen Lymphgefäß-Anastomosen lassen sich zahlreiche Kollateralen beobachten. Unter ihnen kann man zwei Typen unterscheiden. Beim einen Typ überbrückt der Kollateralast einen Zusammenfluß und den darauffolgenden, 4-5 Klappen enthaltenden Lymphgefäßabschnitt, während der andere Kollateralen-Typ nach Übersprung eines 1 oder 2 Klappen enthaltenden Abschnittes in dasselbe Lymphgefäß zurückfließt (Abb. 10, 11 und 12). Bei beiden Typen ist der Kollateralast mit Klappen versehen.



Abb. 12. Kollateralgefäß, einen kurzen Lymphgefäßabschnitt überbrückend

An den darmnahen Partien des Gekröses sind zahlreiche Shunts sichtbar, im allgemeinen dort, wo sich zwei ineinander mündende Lymphgefäße gleicher Größe treffen (Abb. 13). Die letzten Klappen vor der Einmündung beider zusammenfließenden Lymphgefäße sowie die erste Klappe des dadurch entstandenen gemeinsamen Stranges umgrenzen einen Y-förmigen Abschnitt, der auch als eine Einheit des Lymphgefäßes aufgefaßt werden kann. Aus ihm entspringen die zwei Wurzeln des Shunts, namentlich die eine aus dem Mündungswinkel, der Stromrichtung stets entgegengesetzt, rückwärts, die andere hingegen aus einem sehr proximalen Teil der Einheit. Sie vereinen sich später, ein kleineres Lymphgefäß bildend, um nach längerem Verlauf in einen Hauptstamm zu münden.

Auf Grund unserer Beobachtungen können folgende Schlüsse gezogen werden:

Bei geringen Lymphmengen wird der Abfluß den Lymphknoten zu durch die Hauptstämme gewährleistet. Die gleichmäßige Verteilung der Lymphe in beiden Hauptstämmen ist dem reichen Anastomosen-System vor ihrer Ausbildung zuzuschreiben. Der Lymphstrom in den mesenterialen Hauptstämmen wird durch Lymphgefäß-Segmente oder Einheiten aufrechterhalten, wie dies

von KUBIK, HORSTMANN und anderen Verfassern beobachtet wurde. Diese Tätigkeit erfährt eine Unterstützung durch die Bewegungen des Gekröses im Zusammenhang mit der Darmperistaltik. Laut unserer früheren Untersuchungen dürfte die Lymphströmung durch die Bewegung der aktiven, in Abhängigkeit von neuralen Einwirkungen sich entspannenden oder kontrahierenden Schichten in der Darmwand in Gang gesetzt und erhalten werden. In der Grenzzone der



Abb. 13. Lymph-Shunt 1: Klappen. 2: Zweige des Shunts. 3: gemeinsames Lymphgefäß

zwei verschiedenen Faktoren, die ihre Wirkungen auf die Lymphströmung ausüben, befinden sich die Ampullen, sich dicht den Arterien anschmiegend. Demnach kann angenommen werden, daß die Pulsation der Schlagader durch Vermittlung der Ampullen den die Lymphströmung aufrechterhaltenden Faktoren hinzutritt. Die Arterien erleiden beim Durchtritt der Pulswelle eine Dehnung, dadurch erhalten die mit ihnen eng verbundenen Ampullen einen Impuls zur zentripetalen Fortbeförderung der Lymphe. Ein Rückfluß wird durch die Klappe vor der Ampulle verhindert. LUCIANI, BECK, HERING, CLARK und CLARK betonen ebenfalls die Einwirkung der arteriellen Pulswelle auf die Lymphströmung.

Bei gesteigertem peripherem Lymphangebot (Fettfütterung, Tuscheinjektion unter größerem Druck) dienen außer den anderen möglichen Wegen die Anastomosen zwischen den zwei Hauptstämmen dem Ausgleich der Druck-

differenz. Die die Arterie eng begleitenden Reserve-Lymphgefäße leisten der stark in Anspruch genommenen Transportkapazität der Hauptlymphstämme Hilfe. Die Anastomosen und die Reserve-Lymphgefäße sind angesichts des Ganzen des peripheren Lymphkreislaufs von Bedeutung. Hinsichtlich der Behebung der örtlichen Überfüllung einzelner Lymphgefäßabschnitte ist die Rolle der zweierlei Kollateralsysteme sowie die der Shunts hervorzuheben. Die Tatsache, daß ein Shunt immer aus einem, durch die Klappen umgrenzten Lymphgefäßabschnitt seinen Ursprung nimmt, unterstützt die Auffassung von HORSTMANN und anderen, laut welcher der zwischen den Klappen gelegene Lymphgefäßabschnitt eine selbständig tätige funktionale Einheit bildet.

LITERATUR

1. BECK, C. S.: (1924) Bull. Johns Hopk. Hosp. 35, 206. – 2. CLARK, E. R., CLARK, E. L.: (1936–37) Amer. J. Anat. 60, 253. – 3. DOGIEL, A.: (1897) Arch. mikr. Anat. 49, 791. – 4. HORSTMANN, E.: (1952) Morph. Jb. 91, 483. – 5. KUBIK, I.: (1952–53–54) Acta morph. Acad. Sci. hung. 2, 95. – 6. KUBIK, I., SZABÓ, J.: Acta morph. Acad. Sci. hung. 4, 7. – 7. KRAUS, H.: (1962) Anat. Anz. 111, 207. – 8. KRAUS, H.: (1959) Anat. Anz. 107, 135. – 9. LAWRENTJEW, A. P.: (1927) Anat. Anz. 63, 268. – 10. LUCIANI: (1911) Human Physiology. Macmillan, London. – 11. RÉNYI-VÁMOS, F.: (1960) Das innere Lymphgefäßsystem der Organe. Akadémiai Kiadó, Budapest. – 12. RUSZNYÁK, I., FÖLDI, M., SZABÓ, GY.: (1957) Physiologie und Pathologie des Lymphkreislaufes. Akadémiai Kiadó, Budapest. – 13. YAMA-GISHI, T.: (1960) Nagoya med. J. 215, 6. – 14. SHDANOW, D. A.: (1962) Anat. Anz. 111, 17.

MESENTERIC LYMPH CIRCULATION

J. VAJDA and T. TÖMBÖL

It is assumed that arterial pulsation affects mesenterial and intestinal lymph flow. The ampullae, situated at the intersection of the lymph vessels and the arteries, take up the pulse waves thus facilitating lymphatic drainage. Considering the total mesenteric lymph circulation, the important role of anastomoses between the major trunks and that of the reserve lymphatics is emphasized. A similarly important role is ascribed to shunts and collaterals in connection with the lymphatic overloading of smaller mesenteric areas.

The theory that the lymphatic segment between two valves functions as an independent unit, has been confirmed.

ДАННЫЕ К МЕЗЕНТЕРИАЛЬНОМУ ЛИМФООБРАЩЕНИЮ

Й. ВАЙДА и Т. ТЁМБЁЛ

Предполагается, что артериальная пульсовая волна действует на лимфообращение в брыжейке и кишечной стенке. Ампулы, наблюдаемые в лимфатических сосудах на месте их встречи с артериями, воспринимают пульсовую волну и способствуют таким образом опорожнению лимфатических сосудов. Ввиду замкнутости мезентериального лимфообращения подчеркивается роль анастомозов между главными стволами, а также резервных лимфатических сосудев, а в прекращении перегрузки лимфатических сосудов, ограничивающейся на небольшие мезентериальные участки — роль коллатералей и шунтов.

Авторы подкрепляют предположение, согласно которому участок лимфатических сосудов, находящихся между клапанами, следует рассматривать как самостоятельно функционирующую систему.

Dr. János Vajda: Dr. Teréz Tömböl: Budapest IX. Tűzoltó u. 58., Ungarn 357



Pathologisches Institut (Direktor: Prof. Dr. L. H. KETTLER), Humboldt-Universität Berlin, Rudolf-Virchow-Haus der Charité

DAS FLÄCHENBILD DES ENDOTHELS DER DOPPELT LIGIERTEN ARTERIA CAROTIS DES KANINCHENS

H. A. HACKENSELLNER und I. TÖPELMANN

(Eingegangen am 15. Oktober 1964)

Die Veränderungen im Flächenbild des Endothels der doppelt ligierten Arteria carotis des Kaninchens verlaufen in 3 Phasen. In einer ersten Phase (1. bis 3. Versuchstag) sind nebeneinander degenerative, bis zur Nekrose führende Zellveränderungen neben solchen, die man als Aktivierung auffassen muß, zu beobachten. Die zweite Phase (5. Tag bis Ende 3. Woche) wird von reparativen Vorgängen beherrscht. Es lassen sich zahlreiche Mitosen (Maximum 5.-7. Tag) und in zunehmendem Maße Proliferationsherde nachweisen. Ein gewisser Ausgleich zwischen degenerativen und regeneratorischen Vorgängen ist für die 3. Phase (ab 4. Versuchswoche) charakteristisch; sie findet ihren Abschluß mit der Obliteration des isolierten Gefäßsegmentes.

Über doppelte Arterienunterbindung existiert ein sehr ausgedehntes, bis in die Mitte des 19. Jahrhunderts zurückgehendes Schrifttum [3, 4, 5, 6, 8, 24, 25, 27, 33, 36]. Auch in den letzten Jahrzehnten wurde die Ligatur von Arterien wiederholt als wissenschaftliches Modell angewandt [7, 15, 21, 22, 30, 31, 32, 37]. Sie diente dabei in der Regel der Aufklärung des Charakters und der formalen Genese der Intimaverdickung, des Obliterationsvorganges und der Thrombusorganisation [3, 4, 5, 7, 8, 24, 31, 33, 36, 37].

In neuerer Zeit wurden an isolierten Arteriensegmenten auch Probleme der Gefäßpathologie, vor allem der Arterioskleroseforschung untersucht [30, 32]. Allen Arbeiten an doppelt ligierten Arterien ist das Interesse an der Aufklärung der Beteiligung des Endothels am jeweils studierten Prozeß gemeinsam. Oft stehen Endothelfragen — Verhalten des Endothels bei der Thrombose, Abstammung und prospektive Potenzen des Endothels [7, 15, 21, 22, 25, 27] — im Mittelpunkt der Überlegungen.

Bei den bisher vorliegenden Veröffentlichungen handelt es sich fast ausschließlich um lichtmikroskopische Untersuchungen an Schnittpräparaten. Elektronenmikroskopische Studien liegen bisher zwei vor [7, 15]; in einer der beiden Arbeiten schließen die lichtmikroskopischen Paralleluntersuchungen auch die Auswertung von Zelloidinhäutchenpräparaten vom Endothel mit ein [15].

Im vorliegenden Aufsatz sollen Veränderungen im Flächenbild des Endothels der Arteria carotis des Kaninchens nach doppelter Unterbindung beschrieben werden, wie sie sich in Zelloidinhäutchen darbieten.

Material und Methode

Als Versuchstiere standen jugendliche Kaninchen beiderlei Geschlechtes zur Verfügung. In Äthernarkose wurde die rechte A. carotis dargestellt und an zwei Stellen – zuerst knapp über der oberen Thoraxapertur, dann möglichst weit kranial davon – unterbunden. An jeder dieser Unterbindungsstellen wurden dicht nebeneinander zwei Ligaturen (Perlin 00) gesetzt. Der etwa 2 mm betragende Gefäßabschnitt zwischen ihnen wurde mit einem Scherenschlag durchtrennt. Um eine Retraktion des damit isolierten Karotinabschnittes zu verhindern, wurden die Schnittenden durch Verknüpfen der Ligaturfäden aneinander fixiert (Abb. 1). Das aus der Hauptstrombahn ausgeschaltete Gefäßsegment hatte eine Länge von 3 bis 4 cm. Eine retrograde Blutfüllung über feine Seitenäste war gelegentlich festzustellen. Auf eine völlige Isolierung des ausgeschalteten Gefäßsegmentes mußte verzichtet werden, da damit eine zusätzliche Störung der Ernährung des Gefäßes über die Vasa vasorum mit Auftreten totaler Wandnekrose und schwerer sekundärer Entzündung verbunden gewesen wäre.



Abb. 1. Schematische Darstellung der Verhältnisse nach Durchführung der doppelten Ligatur

Die Versuchstiere wurden 1, 2, 3, 5, 7, 14, 21, 28, 35 und 42 Tage nach der Karotisunterbindung getötet. Der ausgeschaltete Abschnitt der rechten A. carotis wurde herauspräpariert. Kleine transversale Scheiben wurden ligaturnahe und/oder aus dem Zentrum des Präparates entnommen und in Formalin fixiert. Sie dienten zur Herstellung von Gefrier- und Paraffinschnitten, die dann mit Hämatoxylin-Sudan, mit Hämatoxylin-Eosin, nach vAN GIESON (in der von DOMAGK angegebenen Modifikation) oder zur Darstellung der elastischen Fasern nach WEIGERT gefärbt wurden. Der Hauptteil der Präparate wurde in der Längsrichtung aufgeschnitten und unter Vermeidung einer stärkeren Spannung mit der Endothelseite nach oben auf kleine Korkplatten geheftet. Er diente zur Herstellung von Häutchenpräparaten.

Die Anfertigung der Häutchenpräparate erfolgte in Anlehnung an die von Kot-SCHETOW [19] erstmals angegebene und neuerdings vor allem von SINAFIUS [35] empfohlene Zelloidinhäutchenmethode: Fixierung der ausgebreiteten Gefäßsegmente über 10 min in 10%igem Formalin. – Aufsteigende Alkoholreihe (50-, 60-, 80-, 96% iger Alkohol, 2mal absoluter Alkohol) je 10 min. – Äther-Alkohol aa 10 min. – Auftragen einer etwa 4% igen Lösung von Zelloidin in Äther-Alkohol. – Nach Erreichen einer entsprechenden Konsistenz (nach etwa 1 bis 2 min) Abziehen des Zelloidinhäutchens. – Auftrigen des Häutchens auf einen Objektträger. – Behandlung mit Äther-Alkohol über etwa 10 min zur Entfernung des Zelloidins. – Absteigende Alkoholreihe bis Aqua dest. Eisenhämatoxylin nach WEIGERT 3 min. – Fließendes Leitungswasser 10 min. – Aufsteigende Alkoholreihe, Xylol, Neutralbalsam.

Als Kontrolle diente in jedem einzelnen Fall die linke Å. carotis der Versuchstiere. Die Schnitt- und Häutchenpräparate wurden nach der für die Versuchsgefäße angegebenen Technik bearbeitet.

Das gesamte Material, Versuchs- und Kontrollgefäße, wurden nicht nur einer deskriptiven Beurteilung, sondern, soweit uns dies möglich erschien, auch einer mathematisch-statistischen Auswertung unterworfen. Diese Auswertung bezog sich auf das allgemeine Flächenbild des Endothels (Polarität) bzw. mehr oder weniger weitgehendes Fehlen einer polaren Strukturierung und auf bestimmte Charakteristika der Endothelkerne (Form, Nukleolenzahl, Vorkommen von Kernvakuolen), die jeweils an 100 Probanden erhoben wurden.

Insgesamt wurden 184 Tiere operiert. 14 Kaninchen starben vor demfür sie vorgesehenen Versuchsende. In 20 Fällen war das durch Ligatur ausgeschaltete Gefäßstück obliteriert. Bei 150 Tieren konnten Endothelhäutchen gewonnen werden. In 71 Fällen waren die Zelloidinhäutchen sowohl des Versuchs- als auch des Vergleichsgefäßes von ausreichender Qualität für die vergleichende statistische Auswertung.

Ergebnisse

Häutchenpräparate

a) Deskriptive Auswertung

1 bis 3 Tage nach Versuchsbeginn: Bereits einen Tag nach der doppelten Unterbindung zeigt sich eine gewisse Schwellung und Abrundung der Zellkerne. Ist ihre Form normalerweise als längsoval zu bezeichnen, so sind sie jetzt überwiegend rundlich-oval, z. T. auch fast rund, nierenförmig oder unregelmäßig. Die Kerne sind in der Regel hell und zart strukturiert und lassen oft mehrere relativ große Nukleolen deutlich hervortreten; sie liegen etwas dichter beieinander als in den Kontrollgefäßen. Kernvakuolen finden sich insgesamt spärlich, im Vergleich mit den Kontrollen aber doch vermehrt.

Herdförmig oder diffus sind regressive Zellveränderungen zu beobachten, die meist als Kernpyknose in Erscheinung treten. Neben eindeutig nachweisbaren Einzelzellnekrosen kommen offensichtlich auch ausgedehntere Gruppennekrosen vor. In den entsprechenden Arealen sind die zugrunde gegangenen Endothelzellen von lockeren Fibrin-Leukozyten-Erythrozytengerinnseln bedeckt oder ersetzt. Auch sonst finden sich in das Endothel diffus Entzündungszellen eingestreut. Es handelt sich dabei vorwiegend um segmentkernige Leukozyten, aber auch Lymphozyten und mononukleäre Zellelemente werden beobachtet. Gelegentlich sind topische Beziehungen zwischen den Leukozyten und pyknotischen Endothelzellkernen unverkennbar.

Ist die Ausrichtung der Endothelzellen, insbesondere ihrer Kerne, anfangs meist noch typisch, das heißt parallel zur Gefäßachse, so ist die Polarität oft schon am 2. oder 3. Tag nach Arterienligatur in kleineren oder auch ausgedehnteren Arealen zugunsten einer etwas unregelmäßigeren Zellagerung verloren gegangen (Abb. 2). Die Zellen haben hier, soweit dies in Eisenhämatoxylinpräparaten erkennbar ist, eine polygonale Gestalt. Die Kerne sind stark abgerundet bis unregelmäßig gestaltet. Das Zytoplasma ist besonders in Kernnähe auffallend dicht und basophil.

5 und 7 Tage nach Versuchsbeginn: Sind die ersten Tage vorwiegend von degenerativen Veränderungen beherrscht, so treten jetzt reparativ-regeneratorische Veränderungen in den Vordergrund. Es finden sich zahlreiche Mitosen in verschiedenen Phasen, ein Befund, der in dieser Form weder in früheren noch in späteren Versuchsstadien erhoben werden konnte. Eindeutige direkte Kernteilungen sind nicht zu beobachten.

Als Ausdruck der gesteigerten Proliferation ist nicht selten in umschriebenen, oft recht ausgedehnten Bezirken eine rhythmische Ausrichtung der Zellen festzustellen. Zellen und Kern sind hier oft in Wirbeln oder auch fischzugartig angeordnet. Neben Mitosen, die gerade an solchen Stellen bevorzugt vorkommen, werden vereinzelt auch zweikernige oder mehrkernige Zellen beobachtet.

Das Zytoplasma ist im Bereich der Proliferationsherde besonders stark basophil, die Kerne lassen eine gewisse Polymorphie erkennen. Kernvakuolen sind relativ häufig.



Abb. 2. Kn 189; Endothelhäutchen, 2 Tage nach Versuchsbeginn gewonnen. Oben Kontrolle, unten Zustand nach doppelter Ligatur. (Vergr. 100fach)

Entzündungszellen, sowohl polymorphkernige Leukozyten als auch Rundzellen, werden nach wie vor einzeln oder seltener in kleineren lockeren Gruppen in das Endothel eingestreut gefunden, auch im Bereich proliferierender Endothelbezirke. Regressive Zellveränderungen sind spärlich geworden. In wenigen Fällen kann man umschriebene zarte thrombotische Auflagerungen beobachten (Abb. 3).

2 bis 3 Wochen nach Versuchsbeginn: Die Atypie des Endothelbildes nimmt noch weiter zu. Die typische Lagerung der Zellkerne ist in jedem Falle in mehr oder weniger ausgedehnten Gebieten, nicht selten auch im Bereich der gesamten untersuchten Endothelfläche, verloren gegangen. Die Abweichung der Kernform von der Norm hat ein Maximum erreicht. Entsprechendes gilt auch für die Zahl der Nukleolen. Kernvakuolen sind hingegen sehr selten geworden. Eine Einlagerung von Entzündungszellen wird nach wie vor beobachtet (Abb. 4). Auch Zellnekrosen sind vereinzelt festzustellen. Ganz selten kann man einer Mitose begegnen (Abb. 5).



Abb. 3. Kn 162; Endothelhäutchen, 1 Woche nach der Operation. Dem Endothel haften herdförmig zarte Fibringerinnsel an, die wechselnd reichlich Erythrozyten und Leukozyten enthalten. (Vergr. 288fach)

4 bis 6 Wochen nach Versuchsbeginn: Alle bisher beschriebenen Veränderungen finden sich bis zum Versuchsende (Abb. 6). Eine gewisse Tendenz zur Rückbildung ist allerdings unverkennbar. Nach 6 Wochen kann das Endothel örtlich oder diffus, noch oder schon wieder bis zu einem gewissen Grade dem der Kontrolle ähneln. Eine völlige Angleichung erfolgt jedoch in keinem Falle.

b) Mathematisch-statistische Auswertung

Abweichen der Endothelkerne von der Idealform: Wenn man eine längsovale Kernform als typisch für das Endothel der A. carotis des Kaninchens ansieht, so ist eine Verschiebung zu rundovalen, runden und nierenförmig oder unregelmäßig gestalteten Kernformen in allen Stadien der von uns durchgeführten Versuche charakteristisch. Die unterschiedliche Verteilung auf die einzelnen Kernqualitäten ist nach der Quadrat-Methode statistisch signifikant (Tab. I).

Tabelle I

10		7		10		7		10		
1 '	1 Tag		2 Tage		3 Tage		5 Tage		1 Woche	
↓ K	v	K	v	K	v	K	v	K	v	
623	359	458	308	562	371	432	282	592	306	
367	601	233	376	429	581	262	400	396	594	
7	17	5	8	7	28	4	13	5	57	
3	23	4	8	2	20	2	5	7	43	
1000	1000	700	700	1000	1000	700	700	1000	1000	
147,1		65,0		89,3		66,3		200,2		
	I I K 623 367 7 7 3 1000 147	10 1 Tag K V 623 359 367 601 7 17 3 23 1000 1000 147,1	$ \begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $		$ \begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $	$ \begin{array}{ c c c c c c } \hline 10 & 7 & 10 \\ \hline 1 & Tag & 2 & Tage & 3 & Tage \\ \hline K & V & K & V & K & V \\ \hline 623 & 359 & 458 & 308 & 562 & 371 \\ \hline 367 & 601 & 233 & 376 & 429 & 581 \\ \hline 7 & 177 & 5 & 8 & 7 & 28 \\ \hline 7 & 177 & 5 & 8 & 7 & 28 \\ \hline 3 & 23 & 4 & 8 & 2 & 20 \\ \hline 1000 & 1000 & 700 & 700 & 1000 & 1000 \\ \hline 147,1 & 65,0 & 89,3 \\ \hline \end{array} $	$ \begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	$ \begin{array}{ c c c c c c c } \hline 10 & 7 & 10 & 7 \\ \hline 1 & Tag & 2 & Tage & 3 & Tage & 5 & Tage \\ \hline K & V & K & V & K & V \\ \hline 623 & 359 & 458 & 308 & 562 & 371 & 432 & 282 \\ \hline 367 & 601 & 233 & 376 & 429 & 581 & 262 & 400 \\ \hline 7 & 177 & 5 & 8 & 7 & 28 & 4 & 13 \\ \hline 3 & 23 & 4 & 8 & 2 & 20 & 2 & 5 \\ \hline 1000 & 1000 & 700 & 700 & 1000 & 1000 & 700 & 700 \\ \hline 147,1 & 65,0 & 89,3 & 66,3 \\ \hline \end{array} $	$ \begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	

Statistischer Vergleich von Kontrollen (K) und Versuche (V) hinsichtlich des Abweichens der genden Werte (hier alle!)

Vermehrung der Nukleolenzahl pro Kern: Die Zahl der Kernkörperchen liegt in allen Versuchsstadien über den entsprechenden Werten der Kontrollen. Die Chi-Quadrat-Methode weist auch hier in jeder einzelnen Gruppe Signifikanz aus (Tab. II). Die mittlere Nukleolenzahl, die bei den Kontrollen zwischen 1,5 bis 1,7 liegt, beträgt nach Unterbindung 2,3 bis 2,8. Die Differenz liegt außerhalb des Zufallsbereiches (Tab. III).

Depolarisation des Endothels: Eine unregelmäßige oder atypisch-rhythmische Lagerung der Endothelzellkerne war in den Kontrollen niemals festzustellen. Sie fand sich aber in jeder unserer Versuchsgruppen. In den Gruppen 3 und 4 Wochen post ligaturam fehlte sie in keinem einzigen Fall. Mittels des Chi-Quadrat-Verfahrens ergibt sich für die 3-Tage-Gruppe und für die 1-, 2-, 3- und 4-Wochen-Gruppen Signifikanz (Tab. IV).

Auftreten von »Kernvakuolen«: Die Zahl der Kernvakuolen ist in den ersten Versuchstagen (bis zu 1 Woche) gegenüber der Norm erhöht, später etwas herabgesetzt. Die Verschiebungen sind zu gering, als daß sie sich statistisch als überzufällig sichern ließen.

Synopsis der statistischen Befunde: In Tabelle V haben wir die Versuchswerte für die Nukleolenzahl, die Zahl der von der Idealform abweichenden Zellkerne und die Zahl der Kernnukleolen pro Zelle auf die gleich 100% gesetz-
Anzahl der Tiere	1	7	1	0	6	5	2		2	
Kernform	2 Wo	chen	3 Wo	3 Wochen		chen	5 Wochen		6 Wochen	
Ļ	K	v	K	v	K	v	K	v	K	v
Längsoval	405	208	612	253	363	211	135	99	123	88
Rundoval	284	413	376	575	236	335	63	82	72	108
Rund	3	37	10	93	1	34	-	9	1	_
Nierenförmig u. sonstiges	8	42	2	79	-	20	2	10	4	4
	700	700	1000	1000	600	600	200	200	200	200
χ^2	139	,2	33	30,7	10	8,5	22	.,4	14	,0

Kerne von der Idealform (längsoval) mittels der Chi-Quadrat-Methode. Die Signifikanz anzeisind eingerahmt

ten »Normalwerte« bezogen und die Anzahl der Versuche mit Endothelpolarisation in Prozent der Gesamtversuchszahl jeder Gruppe angegeben. Die idealisierte graphische Darstellung dieser Relativwerte (Abb. 7) zeigt:

1. Die mittlere Nukleolenzahl steigt anfangs sehr steil, später nur mehr gering an, um ab 4. Woche wieder etwas abzufallen.

2. Die Kurve der von der »Idealform« abweichenden Zellkerne verläuft biphasisch. Sie zeigt einen ersten Gipfel 1 Tag post operationem und einen zweiten, nur wenig höheren 3 Wochen nach Versuchsbeginn. Dazwischen liegt eine Senke mit ihrem tiefsten, aber noch über den Kontrollen liegenden Wert am 5. Versuchstag.

3. Die Zahl der Kernvakuolen steigt bis zum 5. Versuchstage. Dann fällt sie ab, um ab 2. Woche unter den Vergleichswerten zu liegen.

4. Die Depolarisation des Endothels nimmt zuerst gleichmäßig zu. 3 und 4 Wochen nach Versuchsbeginn hat sie ein Maximum erreicht. Nach 5 und 6 Wochen sinkt sie wieder etwas ab.

Schnittpräparate

In Schnittpräparaten sind die Versuchsgefäße stets mehr oder weniger stark kontrahiert. Die Endothelzellen liegen über den Kuppen der eng gewellten Lamina elastica interna sehr dicht und springen gegen die Lichtung stark vor. Eine nähere Aussage über die weiteren, oben beschriebenen Veränderungen des Endothels ist nach Schnittpräparaten kaum möglich.

Die subendotheliale Intima ist in den ersten Tagen gering verbreitert, was wohl auf ein Ödem zurückzuführen ist. In Ligaturnähe kann man schon





Abb. 4. Kn 75; Endothelhäutchen, 3 Wochen nach doppelter Ligatur gewonnen. In das Endothel zahlreiche Entzündungszellen, vorwiegend segmentkernige Leukozyten, eingestreut. (Vergr. 640fach)

Abb. 5. Kn 121; Endothelhäutchen, 3 Wochen nach Versuchsbeginn. Im Zentrum eine Mitose

nach wenigen Tagen eine zellige Verbreiterung der Intima beobachten. In den zentralen Partien der ausgeschalteten Gefäßsegmente sind die ersten Anzeichen davon erst nach Wochen festzustellen. Hier tritt die Obliteration unter den gewählten Versuchsbedingungen in der Regel erst nach Monaten ein. Ein vorzeitiger Verschluß des Gefäßes wird nur im Gefolge der (seltenen) Thrombusorganisation beobachtet.

In der Media sind bereits 1 Tag nach Versuchsbeginn in Ligaturnähe häufig, in zentralen Anteilen der Gefäßsegmente nur äußert selten sekretorenförmige, vereinzelt auch ausgedehnte, die ganze Zirkumferenz umfassende Nekrosen zu beobachten. Beziehungen zwischen Totalnekrose der tieferen

Anzahl d. Tiere \rightarrow		10		7		10		7		10		7		10		6	:	2	-	2
Nukleolenzahl	1	Tag	2 T	age	3 1	Гage	5 1	age	1 W	oche	2 W	ochen	3 W	ochen	4 W	ochen	5 W.	ochen	6 W.	ochen
Ļ	K	V	K	v	K	V	K	V	K	V	K	V	K	V	K	V	К	v	K	V
0	146	53	94	49	146	59	96	42	137	52	111	28	135	47	76	34	37	12	30	14
1	315	134	208	79	329	124	193	100	280	102	190	72	294	87	154	65	55	34	67	36
2	393	346	281	281	386	337	284	263	389	330	277	209	414	294	262	198	72	62	64	57
3	128	320	95	197	114	270	104	195	155	299	98	211	122	285	98	196	24	42	31	45
4	17	109	18	71	25	150	18	72	34	153	22	117	30	179	9	88	9	34	7	32
5	1	31	4	22	-	52	4	20	5	53	2	49	5	83	1	16	3	13	1	10
6	-	6	-	1	-	6	1	2	-	9	-	10	-	16	-	_	_	2	-	6
7	-	1	-	_	-	1	_	6	-	2	-	4	-	9	_	3	-	1	-	_
8	-	-	-		-	1	-	_	-	_	-	_	-	_	-	_	-	_	-	
	1000	1000	700	700	1000	1000	700	700	1000	1000	700	700	1000	1000	600	600	200	200	200	200
χ^2	30	04,0	15	2,8	36	5,7	12	9,5	29	8,1	27	5,8	44	1,0	17	4,4	47	,2	47	,5

Acta morph. tomus XIII.

 Tabelle II

 Statistischer Vergleich von Kontrollen (K) und Versuchen (V) hinsichtlich der Nukleolenzahl pro Kern mittels der Chi-Quadrat-Methode. Die Signifikanz anzeigenden Werte (hier alle!) sind eingerahmt

DAS FLÄCHENBILD DES ENDOTHELS

367

Tabelle III

Anzahl d. Tiere \rightarrow		10		7		10		7		10
Statistische	1	Tag	2 7	Гаде	3 7	Гаде	5	Tage	1 Woche	
Kennzahlen ↓	к	v	K	v	K	v	K	V	K	v
Zahl der ausge- werteten Kerne	1000	1000	700	700	1000	1000	700	700	1000	1000
Variationsbreite (Nukleolenzahl)	0-5	0-7	0-5	0-6	0-4	0-8	0-6	0-7	0-5	0-7
\overline{x} (mittlere Nukleolenzahl)	1,56	2,42	1,64	2,33	1,54	2,52	1,67	2,36	1,68	2,60
$s_x^-(Streuung d. mittl. Nukleolen-zahl)$	0,030	0,043	0,038	0,043	0,030	0,040	0,039	0,046	0,033	0,039
s (einfache Streuung)	0,95	1,36	1,00	1,13	0,96	1,26	1,02	1,21	1,03	1,24
μ _{em} (Vergleich zweier Stichproben)	10	5,4	112	2,1	19	9,6	1	1,5	1	8,0

Statistischer Vergleich der mittleren Nukleolenzahl pro Kern von Kontrollen (K) und Versuchen sind

Tabelle IV

Statistischer Vergleich von Kontrollen (K) und Versuchen (V) hinsichtlich des Vorkommens 3 Tage, 1, 2, 3 und 4 Wochen nach

Anzahl d. Tiere \rightarrow		10		7		10		7		10
Kernlagerung	1 Tag		2 Tage		3 Tage		5 Tage		1 Woche	
· · · ·	K	V	K	V	K	v	K	V	K	v
Polar	10	8	7	5	10	5	7	6	10	3
Unregelmäßig	_	2		2	_	5	-	1	_	7
	10	10	7	7	10	10	7	7	10	10
χ^2	2	,2	2	,3		6,7	1	,1		9,2
	1		1		1		1			

 χ^2_{99} $_{9/0, 1FG} = 6,635$

Anzahl d. Tiere \rightarrow		7		10		6	:	2		2
Statistische	2 W	ochen	3 W	ochen	4 W	ochen	5 Wochen		6 Wochen	
Kennzahlen ↓	K	V	K	v	K	v	K	v	K	v
Zahl der ausge- werteten Kerne	700	700	1000	1000	600	600	200	200	200	200
Variationsbreite (Nukleolenzahl)	0-5	0-7	0-5	0-7	0-5	0-7	0-5	0-7	0-5	0-6
x (mittlere Nukleolenzahl)	1,62	2,75	1,63	2,82	1,69	2,50	1,61	2,52	1,61	2,50
s, (Streuung d. mittl. Nukleolen- zahl)	0,039	0,049	0,031	0,043	0,039	0,048	0,081	0,098	0,075	0,100
s (einfache Streuung)	1,03	1,29	0,99	1,35	0,95	1,17	1,14	1,38	1,06	1,42
μ _{em} (Vergleich zweier Stichproben)	1	8,1	2	2,5		3,2		7,2		7,1

(V) mittels des Vergleiches zweier Stichproben. Die Signifikanz anzeigenden Werte (hier alle!) eingerahmt

 $\mu_{99^{0}/_{0}}=2{,}576$

von Depolarisation mittels der Chi-Quadrat-Methode. Die	Signifikanz	anzeigenden	Werte (hier:
Versuchsbeginn!) sind eingerahmt			

Anzahl d. Tiere \rightarrow	1 1	7		10		6		2		2
Kernlagerung	2 W	ochen	3 Wochen		4 Wochen		5 Wochen		6 Wochen	
*↓	K	v	K	V	K	v	K	v	К	v
Polar	7	2	10		6	_	2	1	2	1
Unregelmäßig		5	_	10		6	-	1	-	1
	7	7	10	10	6	6	2	2	2	2
χ^2	7	,8	2	20,0		12,0	1	,3	1	,3

369



Abb. 6. Kn 157; Endothelhäutchen, 4 Wochen post operationem gewonnen. Oben Kontrolle, unten Zustand nach doppelter Ligatur. (Vergr. 288fach)

Tabelle V

Zusammenstellung der verschiedenen Meßwerte der Versuche bezogen auf die Kontrollen

1 Tag 155 170 125 20 2 Tage 142 162 137 29	Versuchs- dauer	Mittlere Nu- kleolenzahl pro Kern im Versuch bezogen auf die Kontrollen (= 100%)	Zahl der von der »Ideal- form« abwei- chenden Zell- kerne im Ver- such bezogen auf die Kon- trollen (= 100%)	Zahl der Kern- vakuolen pro 100 Zellen im Versuch bezo- gen auf die Kontrollen (= 100%)	Zahl der Fälle mit Depolari- sation der Kern lagerung in % der Zahl der Versuche
2 Tage 142 162 137 29	ag	155	170	125	20
	age	142	162	137	29
3 Tage 164 144 141 50	age	164	144	141	50
5 Tage 141 156 174 14	age	141	156	174	14
1 Woche 155 146 112 70	⁷ oche	155	146	112	70
2 Wochen 170 163 75 71	ochen	170	163	75	71
3 Wochen 173 193 84 100	⁷ ochen	173	193	84	100
4 Wochen 148 165 90 100	ochen	148	165	90	100
5 Wochen 157 155 42 50	ochen	157	155	42	50
6 Wochen 155 145 88 50	ochen	155	145	88	50

Wandschichten und entsprechendem Endotheluntergang sind aus den Schnittpräparaten nicht zu erheben. In den ersten Versuchstagen zeigen sich in die Wand schütter Leukozyten eingestreut. Gelegentlich finden sich solche Zellen auch in der Intima unmittelbar subendothelial. In späteren Stadien kann man vereinzelt Medianarben beobachten. Im allgemeinen sind jedoch keine charakteristischen Veränderungen der tieferen Gefäßwandschichten, vor allem auch keine Veränderungen ihres elastischen Gerüstes festzustellen.



Abb. 7. Graphische Darstellung der Ergebnisse der statistischen Untersuchung. 1 = mittlereNukleolenzahl pro Kern im Versuch bezogen auf die Kontrollen (= 100%). 2 = Zahl der von der Idealform abweichenden Zellkerne im Versuch bezogen auf die Kontrollen (= 100%). <math>3 = Zahl der Kernvakuolen pro 100 Zellen im Versuch bezogen auf die Kontrollen (= 100%). <math>4 = Zahl der Fälle der Versuche. Die Ordinate 0-200% gilt für die Kurven 1-3, die Ordinate 0-100% für die Kurve 4

Besprechung

Die von uns beobachteten Veränderungen des Endothelflächenbildes nach doppelter Arterienligatur laufen in 3 Phasen ab:

Die erste Phase, die die ersten 3 Versuchstage umfaßt, ist charakterisiert durch Zellveränderungen, die man wohl als unmittelbare Folge der Ausschaltung des untersuchten Gefäßsegmentes aus dem allgemeinen Körperkreislauf, als akute Folge der damit verbundenen komplizierten Stoffwechselsituation für das Endothel auffassen muß.

Morphologisch äußert sich diese Phase einerseits in regressiven Veränderungen, die bis zu Einzelzell- und Gruppennekrosen reichen, andererseits in

Bildern, die als Ausdruck eines erhöhten Metabolismus gedeutet werden müssen. In einer unter identischen Versuchsbedingungen durchgeführten elektronenmikroskopischen Studie [15] konnten Befunde erhoben werden, die den hier vorgelegten voll entsprechen. Andererseits kam BUCK [7] auf Grund entsprechender Experimente an Ratten zur Ansicht, daß das Endothel des isolierten Arteriensegmentes als unmittelbare Folge seiner Ausschaltung qualitativ der Nekrose verfalle. Möglicherweise waren die regressiven Veränderungen hier tatsächlich ausgedehnter, was auf die geringe Entfernung zwischen den Unterbindungsstellen (5-10 mm) bezogen werden könnte (bei uns 30-40 mm!). Die von BUCK als von Monozyten des Blutes abstammende Makrophagen gedeuteten Zellen entsprechen nach unserer Ansicht Endothelzellen in kontrahierten Gefäßen [1, 2] bei gleichzeitiger Aktivierung ihres Stoffwechsels auf Grund der Ausschaltung des Gefäßsegmentes aus dem allgemeinen Kreislauf [15].

Die zweite Phase, die etwa vom 5. Versuchstag bis zum Ende der 3. Versuchswoche reicht, wird von reparativen Prozessen beherrscht, die weniger auffällig schon in den ersten Tagen nach Ligatur eingesetzt haben. Andererseits werden auch jetzt regressive Veränderungen beobachtet, sie treten aber in den Hintergrund.

Ihren morphologischen Ausdruck findet diese Phase im reichlichen Auftreten von Mitosen um den 5. und 7. Versuchstag und in den das mikroskopische Bild in zunehmendem Maße beherrschenden Endothelproliferationsherden. Die Proliferationsherde heben sich durch die atypische, oft polymorphe Form der Zellen, die beträchtliche Basophilie ihres Zytoplasmas und durch die rhythmische Kernlagerung, die keinerlei Beziehungen zu der für das Endothel charakteristischen Polarität mehr erkennen läßt, nicht nur vom Endothel der Kontrollgefäße, sondern auch von dem der unmittelbaren Umgebung deutlich ab. Die Regeneration der zelligen Gefäßauskleidung geht, wie dies auch nach anderen Schädigungen des Endothels überzeugend belegt werden konnte, einzig und allein vom überlebenden Endothel aus [10, 17], genauso wie die Endothelisierung einer Gefäßprothese aus Kunststoff per continuitatem vom Endothel des Wirtsgefäßes her erfolgt [9, 16, 20, 23]. Dabei scheint die Vermehrung der Endothelzellen zumindest unter den hier diskutierten pathologischen Bedingungen auf dem Wege indirekter Kernteilungen vonstatten zu gehen [10, 15, 16, 28, 29, 34]. Die Proliferationsherde erinnern weitgehend an den Aufbau der Wachstumszone in Endothelkulturen bzw. in Kunststoffprothesen [9, 16, 18], sie unterscheiden sich qualitativ von den als »pathologische Regeneration« aufgefaßten herdförmigen Zellveränderungen nach Bestrahlung [17].

Die dritte Phase, die ihren Abschluß nach 4 Wochen oder später, jedenfalls erst mit der Obliteration des Gefäßes findet, kann gekennzeichnet werden durch eine gewisse Ausgewogenheit von degenerativen und regenerativen

Prozessen, wobei allerdings die mit der nun einsetzenden lumeneinengenden »Intimaproliferation«verbundene zunehmende Beschränkung des einer Endothelproliferation zur Verfügung stehenden Platzes mit bedacht werden muß.

Morphologisch wird das Endothelflächenbild wieder etwas »ruhiger«. Die Zahl der von der Idealform abweichenden Kerne geht etwas zurück. Die durchschnittliche Nukleolenzahl sinkt. Ja, selbst die Zahl der Präparate mit Proliferationsherden scheint 5 und 6 Wochen nach Versuchsbeginn wieder abzunehmen. (Sollte sich der zuletzt erwähnte Befund auch in größeren Versuchreihen und unter Bezugnahme auf die in späteren Stadien absolut herabgesetzte Endothelfläche bestätigen lassen, so müßte man daran denken, daß das proliferierte Endothel im weiteren Verlauf des Geschehens sich als besonders anfällig erweist und bald wieder dem Untergange verfällt.)

In allen 3 Phasen des Geschehens nach doppelter Arterienligatur sieht man in das Zelloidinhäutehen Entzündungszellen, meist segmentierte Leukozyten, hineinprojiziert. Wie aus Schnittpräparaten ersichtlich, liegen diese Leukozyten zumindest zum Teil subendothelial. Gleiche Befunde konnten nach Röntgen-, Betatron- und Mobaltronbestrahlung erhoben werden [17]. Wie FLOREY u. GRANT [11] in einer elektronenmikroskopischen Untersuchung zeigen konnten, kommt es auch nach UV-Einwirkung (»transparent chamber«-Technik) anfangs zu einem Haftenbleiben der Leukozyten am Endothel, später zu einer aktiven Durchwanderung der Deckzellschicht bis in die subendotheliale Intima. Neben diesem Mechanismus muß in unseren Experimenten auch die Möglichkeit eines Vordringens von Leukozyten, die aus Vasa vasorum ausgetreten sind, erwogen werden.

Die Veränderungen der extraendothelialen Wandschichten zeigen zu den Phasen der Vorgänge im Niveau des Endothels folgende Korrelationen: Das Volumen der Media liegt zur Zeit der 1. Phase gering über dem der Vergleichsgefäße, was wohl auf ein Ödem der Wand zurückzuführen ist [15]. Während der 2. und 3. Phase kommt es zu einer schleichenden Atrophie, die sich in einem allmählichen Absinken der entsprechenden Meßwerte ausdrückt [15]. Die subendotheliale Intima ist in den ersten Tagen nach der Ligatur gering ödematös verbreitert [15]. Die in Ligaturnähe bereits in der 2., in den zentralen Anteilen unserer Versuchsgefäße erst in der 3. Phase einsetzende zellige Verdickung der normalerweise zellfreien »Intima« ist nicht auf eine Wucherung von Endothelzellen [21, 22] - auch nicht unter anderem auf das Endothel [31] - sondern ausschließlich auf eine Proliferation von Gefäßwandmuskelzellen zurückzuführen, die nach Zerbrechen der Lamina elastica interna in die Intima austreten [7, 15]. Die spezifischen Zellen der Media sind auch für andersartige »intimale« Prozesse [13] und für den Aufbau einer »Neointima« in homologen Transplantaten [14] und in Kunststoffprothesen [9, 12, 16, 26] verantwortlich zu machen.

374

LITERATUR

1. ALTSCHUL, R.: (1957) Über eine eigenartige Reaktion der Endothelzellen. Virchows Arch. nath. Anat. 330, 357-364. - 2. ALTSCHUL, R., FAUL-BOEHMLER, E.: (1963) Endothelium in Contracted Arteries. Virchows Arch. path. Anat. 336, 383-388 (1963). - 3. AUER-BACH, B.: (1877) Über die Obliteration der Arterien nach Ligatur. Inaug. -Diss., Bonn. - 4. BAUMGARTEN, P.: (1876). Über die sog. Organisation des Thrombus. Chl. med. Wiss. 14, 593-597. - 5. BENEKE, R.: (1890) Die Ursachen der Thrombusorganisation. Beitr. path. Anat. 7. 95-158. - 6. BÖTTCHER, G.: (1888) Untersuchungen über die histologischen Vorgänge und das Verhalten des Blutes in doppelt unterbundenen Gefässen. Beitr. path. Anat. 2, 199-219. - 7. BUCK, R. C.: (1961) Intimal Thickening After Ligature of Arteries. An Electron-Microscopic Study, Circulat, Res. 9, 418-426, - 8, BURDACH, F.: (1885) Über den Senftleben'schen Versuch die Bindegewebsbildung in todten doppelt unterbundenen Gefässen betreffend. Virchows Arch. path. Anat. 100, 217-235. - 9. DAVID, H., H. A. HACKENSELLNER. W. WOLF: (1963) Submikroskopische Untersuchungen an der Neointima in Kunststoffprothesen beim Hund. Frankfurt. Z. Path. 72, 548-556. - 10. EFSKIND, L.: (1941) Die Regenerationsverhältnisse im Intimaepithel nach Gefäß-Sutur. Acta chir. scand. 89, 283-309, - 11. FLOREY, H. W., L. H. GRANT: (1961) Leucocyte Migration from Small Blood Vessels Stimulated with Ultraviolet Light: An Electronmicroscope Study. J. Path. Bact. 82, 13-17. - 12. FLOREY. H. W., S. J. GREER, J. C. F. POOLE, N. T. WERTHESSEN: (1961) The Pseudo-Intima Lining Fabric Grafts of the Aorta. Brit. J. exp. Path. 42, 236-246. - 13. GEER, J. C., H. C. MCGILL JR., J. P. STRONG: (1961) The Fine Structure of Human Atherosclerotic Lesions. Amer. J. Path. 38, 263-287. - 14. HACKENSELLNER, H. A.: (1960) Morphologie konservierter und transplantierter Blutgefäße. Vortrag. Ungarische Chirurgentagung Budapest. 3.-5. Nov. - 15. HACKENSELLNER, H. A., H. DAVID, I. UERLINGS: Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an doppelt ligierten Arterien (A. carotis des Kaninchens). Acta biol. med. germ.; im Druck. - 16. HACKENSELLNER, H. A., H. DAVID, W. WOLF: (1952) Das elektronenmikroskopische Bild der Neointima in Kunststoffprothesen beim Hund. Vortrag. Intern. Symposion f. Gefäßchirurgie, Leipzig 13.-15. Dez. - 17. HACKENSELLNER, H. A., J. KUNZ, W. DEGNER: (1964) Morphologische Veränderungen am Endothel der großen arteriellen Gefäßstämme des Thorax nach lokaler Röntgen-, Betatron- und Mobaltronbestrahlung. Radiobiol. Radiother. (Berl.) 5, 321-331. - 18. HACKENSELLNER, H. A., R. MEYER, K. HENZE: (1963) Das Verhalten des Endothels der Aorta und der Arteria pulmonalis in der Gewebekultur. Vortrag, 3. Tagung der Arbeitsgemeinschaft Mcrphologie der DDR, Rostock, 7. u. 5. Oktober .-19. KOTSCHETOW. N.: (1908/9) Untersuchungen über das Pigment Epithel der Retina im Zusammenhang mit der Frage über die Teilung der Zellen. Arb. Kaiserl. Ges. Naturforsch. Petersburg 39, 134-145. – 20. MACKENZIE, D. C., J. LOEWENTHAL: (1960) Endothelial Growth in Nylon Vascular Grafts. Brit. J. Surg. 48, 212-217. – 21. MALYSCHEW, B. F.: (1929) Über die Reaktion des Endothels der Arteria carotis des Kaninchens bei doppelter Unterbindung. Virchows Arch. path. Anat. 272, 727-752. - 22. MEHROTRA, R. M. L.: (1953) An Experimental Study of the Changes Which Occur in Ligated Arteries and Veins. J. Path. Bact. 65, 307–313. – 23. MEIJNE, N. G.: (1959) Endothelial Growth in Nylon Vascular Protheses. Arch. chir. neerl. 11, 41-56. - 24. MERKEL, H.: (1903) Die Beteiligung der Gefäßwand an der Thrombenorganisation mit besonderer Berücksichtigung des Endothels. Eine experimentelle Studie zugleich als Beitrag zur Endothelfrage. Sitzungsber. physikal.medicin. Societät, Erlangen, **34**, 92–187. – **25.** PEKELHARING, C. A.: (1890) Ueber Endothel-wucherung in Arterien. Beitr. path. Anat. **8**, 245–262. – **26.** PETRY, G., G. HEBERER: (1957) Die Neubildung der Gefäßwand auf der Grundlage synthetischer Arterienprothesen. Langenbecks Arch. klin. Chir. 286, 249-290. - 27. РІСК, Е.: (1885) Ueber die Rolle der Endothelien bei der Endarteriitis post ligaturam. Z. Heilk. 6, 459-466. - 28. POOLE, J. C. F., A. G. SANDERS, H. W. FLOREY: (1958) The Regeneration of Aortic Endothelium. J. Path. 75, 133-143. - 29. POOLE, J. C. F., A. G. SANDERS, H. W. FLOREY: (1959) Further Observations on the Regeneration of Aortic Endothelium in the Rabbit. J. Path. 77, 637. - 30. RAMSEY, E. M., D. W. GAISER, G. A. GARDEN JR., PH. M. LECOMPTE, R. TENNANT: (1936/37) Studies in the Pathology of Vascular Disease. Yale J. Biol. Med. 9, 13-64. - 31. SCHAEFFER, J. P., H. E. RADASCH: (1924) On the Obliteration of the Lumen of Blood Vessels. IV. The Origin and Nature of the Mass Which Comes to Occupy the Lumen of an Artery Segment Between Two Ligatures. Amer. J. Anat. 33, 219-241. - 32. SCHMIDT-DIEDRICHS, A., F. C. COURTICE: (1963) The Removal of Various Lipoproteins From Doubly-Ligated Segments of Artery and Vein in the Rabbit. Brit. J. exp. Path. 44, 345-350. - 33. SENFTLEBEN: (1879) Ueber den Verschluss der Blutgefässe nach der Unterbindung. Virchows Arch. path. Anat. 77, 421–454. – 34. SIEGMUND, H.: (1925) Über einige Reaktionen der Gefäßwände und des Endokards bei experimentellen und menschlichen Allgemeininfektionen. Verh. dtsch. path.

Ges. 20, 260-271. - 35. SINAPIUS, D.: (1952) Über das Aortenendothel. Virchows Arch. path. Anat. 322, 662-694. - 36. SOKOLOFF, A.: (1893) Ueber die Bedingungen der Bindegewebeneubildung in der Intima doppelt unterbundener Arterien. Beitr. path. Anat. 14, 11-32. - 37. WILLIAMS, G.: (1956) Experimental Studies in Arterial Ligation. J. Path. 72, 569-574.

ENDOTHELIAL CHANGES IN THE DOUBLY LIGATED CAROTID ARTERY

H. A. HACKENSELLNER and I. TÖPELMANN

After double ligation of the carotid artery of rabbits changes in the endothelial surface occur in three phases. In the first (between the 1st and the 3rd day), degeneration and sometimes necrosis of the cells can be seen side by side with symptoms of activation. The second phase (from the 5th day to the end of the 3rd week) is dominated by reparative processes. Numerous mitoses (5th to 7th day) and an increasing number of proliferative foci are to be found. The third phase (from the 4th week) is characterized by a certain equilibrium between degenerative and regenerative phenomena and terminates with the obliteration of the isolated vascular segment.

ПОВЕРХНОСТНАЯ КАРТИНА ЭНДОТЕЛИЯ ДВОЯКОЛИГИРОВАННОЙ СОННОЙ АРТЕРИИ У КРОЛИКА

Х. А. ХАҚҚЕНСЕЛЬНЕР и И. ТЁПЕЛМАН.

Изменения поверхности эндотелия двояколигированной сонной артерии кролика происходят в трех фазах. В первой фазе (1—3-го дня опыта) параллельно наблюдаются дегенеративные, доходящие до некроза изменения клеток, а также изменения, рассматриваемые как активация. Во второй фазе (от 5-го дня до конца 3-ей недели) господствуют репаративные процессы. Можно выявлять множество митозов, достигающих своего максимума от 5—7-го дня, и все больше очагов пролиферации. Третья фаза (с четвертой недели опыта) характеризуется определенным выравниванием дегенеративных и регенеративных процессов. Эта фаза заканчивается облитерацией изолированного сосудистого сегмента.

Dr. med. H. A. HACKENSELLNER: | Berlin N 4. Schumannstraße 20/21, Dr. med. I. TÖPELMANN: | DDR

Neuroendocrinologic Laboratory, — Institute of Pathology and Experimental Medicine — Medical Faculty, Montevideo, Uruguay

ADENOHYPOPHYSIS AND BRAIN STEM

BASOPHILIA AND "CASTRATION CELLS" IN THE ADENOHYPOPHYSIS OF THE MALE RAT BEARING BRAIN STEM LESIONS*

J. SAS, E. GRINO, W. L. BENEDETTI, L. C. APPELTAUER and R. DOMINGUEZ

(Received October 27, 1964)

The participation of extrahypothalamic areas in the nervous regulation of pituitary function is strongly supported by anatomical evidence. In this study the ability of the periaqueductal gray matter to intervene in adenohypophyseal regulation has been examined in male albino rats bearing small electrolytic lesions in the mesencephalon. Animals with lesions in the periaqueductal gray matter were compared with castrated animals without lesions in the nervous system with the following results: a) the rate of basophile cells in the adenohypophysis was doubled in lesion-bearing

- animals as well as in castrated ones.
- b) numerous "castration cells" were observed in the pituitaries of lesion-bearing animals and of castrated animals. In animals with lesions in the periaqueductal gray matter the rate of "castration cells" decreased after a long evolution, while it increased progressively in castrated animals.
- c) hypophyseal acidophile cells were increased in number in animals with brain stem lesions and in long term castrates.
- d) the weights of the testes were increased in animals with mesencephalic lesions while the weight of the ventral prostate was normal. The histological picture of Leydig's cells was also normal. A quantitative study of the spermatogenic wave revealed a slight shift. These animals were fertile.

Based on these results and on anatomical considerations, the periaqueductal gray matter is proposed as participating in the regulation of gonadotrophins.

Introduction

The fact that the hypothalamus intervenes in the regulation of the anterior pituitary is supported by a great deal of evidence. However, little is known of cytologic alterations in the adenohypophysis after brain lesions. It has been reported [1] that vacuolated basophil cells appeared in the adenohypophysis of the rat after lesions in the lateral hypothalamus. When lesions were placed in the suprachiasmatic region of the hypothalamus [2], pituitary hypertrophy, basophilia and degranulated basophils were found in female rats with constant oestrus.

Neuroanatomical investigations suggest that extrahypothalamic areas, particularly the mesencephalic periaqueductal system may participate in the nervous regulation of the hypophysis [3, 4, 5, 6, 7]. Physiologists have found that stimulation of the mesencephalon, the mesencephalon-pons borderline

* Supported by a grant from the Comisión Central de Investigaciones Científicas de la Universidad de la República Oriental del Uruguay.

and the habenular region of the rabbit evokes stages of the sexual behaviour and its electroencephalographic pattern [8]. Besides, it had been demonstrated [9] that large lesions involving the ventromedial part of the mesodiencephalic junction prevented ovulation in comatose rats through an alleged blockade of the release of ovulating hormone. In animals in a comatose condition by lesions in other areas, ovulation was possible.

In this paper the effect of lesions in the periaqueductal gray matter of the mesencephalon on the pituitary-gonadal axis is described.



Fig. 1. Section of the mesencephalon depicting localization and size of lesions. HE

Material and methods

91 white male rats 35-115 days old were used. They were fed a balanced diet and drank tap water ad libitum. Animals were separated into three groups: normal, castrated, and animals with brain lesions. In the last group brain lesions were placed. With a stereotaxic instrument specially designed by us [10] for small animals, destructions were made bilaterally in the periaqueductal gray matter of the mesencephalon by electrolysis with a DC source set at 3 mAmp during 5 to 10 seconds. The electrode was a fine glass insulated Nichrome wire with a bare tip which permitted to make small lesions about 1 mm in diameter. In this group fertility was tested by placing each animal with two receptive females. Animals were sacrificed by bleeding under petobarbital anaesthesia 30, 60 and 250 days after operation. In order to ascertain the precise localization and size of lesions, brains were fixed in 10 per cent formalin and serial sections were stained with haematoxylin-eosin (Fig. 1). Pituitaries were weighed, fixed in *Heidenhain*'s Susa mixture, paraffin embedded and 5 serial sections were stained with the Kres-azan technique [11]. Sometimes ELFIMAN's [12] chromealum fixative was used. The quantitative cytological examinations were made according to the method of RASMUSSEN and HERRICK [13]. The terms "castration cell" [14] and "signet ring cell" [15] are used in the original sense given by their authors and therefore they must be considered as synonyms. They are depicted in Fig. 2. Basophile cells with a negative image of the Golgi apparatus (Fig. 3), which are sometimes called "castration" or "signet ring cells" [16] were counted as ordinary basophils. The testicles, ventral prostate and seminal vesicles were stained with PAS-haemalum or with iron haematoxylin. The spermatogenic wave was evaluated with a quantitative method [17].



Fig. 2. Adenohypophysis of animal with lesions in the periaqueductal gray matter showing many typical "castration cells". Susa fixation. Romeis's Kres-azan × 400



Fig. 3. Similar case with many hypertrophied basophil cells exhibiting marked "Golgi negative" zones. These cells were not counted as "castration cells" during the quantitative evaluation. Elftman's fixation. Romeis's Kres-azan $\times 400$

Results

Animals recovered well after operation, feeding and looking after themselves normally. The lesions did not cause coma, the sleep-wakefulness pattern was unaffected.

The pituitary weights of peripuberal (60 day course) and adult animals (30 day course) either castrated or with lesions in the periaqueductal gray matter were increased (Table I). The histological study revealed a similar picture in the pituitaries of castrated and lesion-bearing animals with an increase in the number and size of basophile cells. Some of them showed migration of the nucleus to the periphery, degranulation and cytoplasmic vacuolation resulting in "signet ring cells" (Fig. 2). In some control animals of old age (390 days) a few "castration cells" were found.

The quantitative study (Table II) in animals with lesions in the periaqueductal gray matter revealed an increase in the number of pituitary basophile cells from 8.2 per cent (controls) to about 15 per cent, irrespective of postoperative course. Castrated animals behaved similarly, with a hypophyseal basophilia that was slightly more intense in animals operated near puberty or in animals with a long post-operative course.

Table I

No Initial Final Evolu-Pituitary Testicles Prostate Adrenal of body body tion weight weight (mg) (mg) ani-(mg) (mg) (days) mals (g) (g) Group I Control A 16 205 6.3 + 0.42560 + 45168 + 15 37 ± 1.6 (SE)3022 + 98**Control B** 9 350 9.6 ± 0.5 357 + 3849 + 2.8Grup II PGM-30 38 ± 1.8 15 195 212 30 $8.6 \pm 0.6^{**}$ 3639 ± 68 179 ± 16 **PGM**-60 254 7.3 ± 0.3 $2737\pm50^{***}$ 150 ± 20 37 ± 3.5 16 73 60 $317 \pm 35^{**}$ PGM-250 250 374 250 9.8 ± 0.4 2600 + 185 50 ± 4.3 7 Group III 40 + 2.3CAS - 3010 195 205 30 9.5 + 0.8 * *32 + 610 + 243 + 2.5**** CAS-60 10 79 167 60 10.0 + 0.5*226 49 ± 2.8 CAS-250 274 250 11.0 + 1.024 + 78

Effects of Lesions in the Brain Stem and of Castration on Body and Endocrine Organ Weights

SE: Standard error

Control A: control corresponding to PGM 30, 60 and CAS 30, 60. (95-115 days old) Control B: control corresponding to PGM 250 and CAS 250. (390 days old) PGM: animals with lesions in the periaqueductal gray matter CAS: castrated animals

 $\begin{array}{c} {}^{****} {}^{*} {}^{p} < 0.05 \\ {}^{***} {}^{p} < 0.02 \\ {}^{**} {}^{p} < 0.01 \\ \end{array}$

* p < 0.001

The vacuolation of basophile cells turning into "castration cells" followed different courses: after a 30 day evolution they were of the same order in animals with lesions in the mesencephalic gray matter and in castrated animals. After a 60 day evolution (group of animals operated near puberty), "signet ring cells" showed a small increase in animals with lesions in the periaqueductal gray matter against a large increase in castrated animals. After 250 days, »castration cells« decreased in animals with brain stem lesions while they continued their increase in castrated animals.

The number of acidophile cells rose in animals with lesions in the periaqueductal gray matter from 30 per cent (controls) to 40 per cent. In castrated animals this increase was apparent only 60 days after gonadectomy (Table II).

In animals with lesions in the mesencephalic gray matter and a 30 day post-operative course there was a trend towards an increase of testicular weight which reached significant levels in animals with a 60 day evolution (animals operated around puberty). In animals with a long post-operative evolution (250 days) the weights of the testes diminished; these animals were however, fertile.

		Acidophils (per cent)	Basophils (per cent)	Chromophobes (per cent)	"SRC"
Group I			0.0.1.0.0	(1	
	Control A	$30.1 \pm 0.6(SE)$	8.2 ± 0.3	61.7 ± 0.7	0.1
	Control B	31.7 ± 0.3	8.2 ± 0.1	00.1±0.3	0.1
Group II					
1	PGM-30	40.9 ± 0.8	15.9 ± 0.4	43.3 ± 0.6	7.9 ± 0.6
	PGM -60	41.0 ± 1.4	15.7 ± 0.4	43.0 + 1.0	10.3 ± 0.9
	PGM-250	37.9 ± 1.2	15.1 ± 1.5	47.7 ± 0.6	5.3 ± 0.9
Group III					
r	CAS-30	31.0 ± 0.9	15.9 ± 0.3	52.9 ± 0.9	9.0 + 0.9
	CAS-60	37.8 ± 0.8	19.2 ± 1.1	43.1 ± 0.8	32.8 + = .0
	CAS-250	37.8 ± 0.8	16.8 ± 0.3	45.4 ± 0.8	44.2 ± 2.0

Table II

Quantitative Study of Pituitaries

SRC: "signet ring cells", "castration cells", in per cent of all basophils SE: Standard error

Histological examination of the testes did not reveal qualitative changes, *i.e.*, seminiferous tubules appeared normal without any pathologic cell types, and basement membranes were not thickened. The quantitative study of the spermatogenic wave with the phase counting method of ROOSEN-RUNGE and GIESEL [17] revealed some shift. Phases VII and VIII, which correspond to the final stages of spermiogenesis and the onset of spermatozoal release into the lumen of the tubuli, were increased from 13.7 per cent (average for phase VII in our animals) to 19.0 per cent and from 15.7 per cent (phase VIII) to 24.8 per cent. This shift of the wave was accompanied by a noteworthy decrease of phase VI from 27.3 per cent to 14.1 per cent. This phase represents the relatively long period of close relation of the heads of immature spermatozoa with the Sertoli cell with the appearance of "fan"-like bundles.

Leydig's cells did not show morphological changes. Their function may be supposed to be normal since the weight of the ventral prostate of lesion bearing animals was similar to that of their controls. Adrenal and thyroid weights were not affected.

Discussion

The normal performance of pituitary gonadotrophic function requires the integrity of the central nervous system. In young animals the nervous system seems to restrain the release of gonadotrophins. Some brain lesions in female rats induce precocious sexual development [18, 19, 20, 21, 22]. On the contrary, in immature male rats sexual maturation could not be accelerated by brain lesions. In fully developed male rats, the evidence for an increase of gonadotrophin secretion after brain lesions [23, 24] is inconvincing.

In our experiments a paradoxical situation was accomplished: while the adenohypophysis showed a "castration-like" picture, the testicles were hypertrophied. Testicular hypertrophy has been obtained in rats by treatment with purified FSH preparations; this treatment did not induce changes in Leydig's cells [25, 26]. In peripuberal animals a lower threshold to exogenous gonadotrophins has been reported [27].

Pituitary basophilia and "castration cells" are usually associated with increased levels of circulating gonadotrophins. We believe this to be the case in animals with brain stem lesions since hypertrophy of the testicles was observed. The normal weight of the ventral prostate and the histologically unchanged Leydig cells suggest that the circulating levels of ICSH are physiological. If gonadotrophin secretion in the male rat is continuous [28], testicular hypertrophy must be due to augmented levels of circulating FSH.

Our results suggest that brain structures which act negatively on FSH liberating mechanisms were destroyed. Two working hypotheses may be considered, viz.

(i) That this region is "directly" sensitive to sexual steroids in a manner similar to some hypothalamic regions. When the periaqueductal gray matter is partially removed, the inhibiting effects of steroids of FSH secretion cannot take place.

(ii) The second hypothesis is more plausible. The caudal pole of the "limbic" region of the midbrain lies in a nodal point where ascending and descending pathways converge. Thus the periaqueductal gray matter might modify the pattern of hypothalamic activity through a nervous mechanism.

REFERENCES

1. DESCLAUX, P.: (1954) Arch. Anat. micr. Morph. exp. 43, 1. – 2. FLERKÓ, B., BÁRDOS, V.: (1960) Acta endocr. (Kbh.), 35, 375. – 3. PAPEZ, J. W.: (1937) Arch. Neurol. Psychist. (Chic.) 38, 725. – 4. NAUTA, W. J. H.: (1958) Brain 81, 319. – 5. NAUTA, W. J. H., KUYPERS, H. G. J. M.: (1957) in JASPER, H. H., PROCTOR, L. D., KNIGHTON, R. S., NOSHAY, W. C., COSTELLO, R. T. (eds): Reticular Formation of the Brain. 3. Little, Brown et Co., Boston – Toronto. – 6. CRAGG, B. P.: (1961) Exp. Neurol., 3, 388. – 7. SZENTÁGOTHAI, J., FLERKÓ, B., MESS, B., HALÁSZ, B.: (1962) Hypothalamic Control of the Anterior Pituitary. Akadémiai Kiadó, Budapest. – 8. FAURE, J., BENSCH, C.: (1962) Rev. neurol., 106, 197. – 9. CRITCHLOW, V.: (1958) Endocrinology 63, 596.–10. SAS, J., ESTABLE, J. F., Grino, E.: (1960) Acta Neurol. lat. -amer. 6, 395. – 11. ROMEIS, B.: (1940) in Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. Vol. VI., Part 3. Hypophyse. Springer, Berlin. – 12. ELFTMAN, H.: (1957) Stain Technol., 32, 25. – 13. RASMUSSEN, A. T., HERRICK, R.: (1922) Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 19, 416. – 14. BIEDL & ZACHERL: cit.: 11. P. 520. – 15. SCHLEIDT, J.: (1914) Zbl. Physiol., 27, 1170. – 16. MAXIMOW, A. A., BLOOM, W.: (1957) Textbook of Histology. P. 353. – Saunders, Philadelphia. – 17. ROOSEN-RUNGE, E. C., GIESEL, L. O.:: (1950) Amer. J. Anat., 87, 1. – 18. DONOVAN, B. T., VAN DER WERFF TEN BOSCH, J.: (1959) J. Physioi. (Lond.) 147, 78. – 19. BOGDANOVE, M., SCHOEN, H. C.: (1959) Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 100, 664. – 20. GELLERT, R. J., GANONG, W. F.: (1960) Acta endocr. (Kbh.), 33,

569. — 21. Elwers, M., CRITCHLOW, V.: (1960) Amer. J. Physiol. 198, 381. — 22. Elwers, M., CRITCHLOW, V.: (1961) Amer. J. Physiol., 201, 281. — 23. Вобданоve, М.: (1957) Anat. Rec., 127, 398. — 24. ВЕLЕNEV, Y. N., КАВАК, Y. М.: (1961) Проблеми Ендокринологии и Гормонтерапии (Москва) 1, 3. — 25. GREEP, R. O., FEVOLD, H. L., НІЗАЖ, F. L.: (1936) Anat. Rec., 65, 261. — 26. GREEP, R. O., van Dyke, H. B., Chow, D. F.: (1940) Anat. Rec., 78, 88. — 27. CASTEX, M. R., Schteingart, M.: (1945) Pren. méd. argent., 32, 265. — 28. YAZAKI, I.: (1959) Jap. J. Zool., 12, 267.

ADENOHYPOPHYSE UND GEHIRNSTAMM. BASOPHILIE UND »KASTRATIONSZELLEN« IN DER ADENOHYPOPHYSE VON MÄNNLICHEN RATTEN NACH HIRNSTAMMLÄSIONEN

J. SAS, E. GRINO, W. L. BENEDETTI, L. C. APPELTAUER und R. DOMINGUEZ

Die Beteiligung der extrahypothalamischen Zentren an der neuralen Steuerung der Hypophysenfunktion ist durch anatomische Untersuchungen bewiesen. In der vorliegenden Arbeit wurde an männlichen Ratten nach geringfügigen elektrischen Läsionen des Mittelhirns die Frage untersucht, ob der periaquäduktalen grauen Substanz in der Steuerung der Adenohypophyse eine Rolle zukommt. Tiere mit Schädigungen in der periaquäduktalen grauen Substanz wurden mit kastrierten Ratten ohne Läsionen des Nervensystems verglichen und folgende Resultate erzielt:

a) Die Zahl der basophilen Zellen war in der Adenohypophyse von lädierten Ratten ebenso wie bei den kastrierten Tieren auf das Zweifache erhöht.

b) Zahlreiche »Kastrationszellen« konnten in der Hypophyse sowohl der lädierten als auch der kastrierten Tiere beobachtet werden. Bei den lädierten Tieren verminderte sich nach längerer Evolution die Zahl der »Kastrationszellen«, während sie bei den kastrierten Tieren progressiv zunahm.

c) Die Zahl der acidophilen Zellen der Hypophyse war sowohl bei den Tieren mit Hirnstammläsionen, als auch bei den kastrierten erhöht.

 d) Das Gewicht der Hoden war bei den Tieren mit geschädigtem Mittelhirn erhöht,
 während das Gewicht der ventralen Vorsteherdrüse normal blieb. Das histologische Bild der Leydigschen Zellen war normal. Die quantitative Untersuchung der spermatogenen Welle zeigte eine leichte Erhöhung. Diese Tiere waren befruchtungsfähig. Auf Grund der obigen Ergebnisse und anatomischer Erwägungen wird angenommen,

Auf Grund der obigen Ergebnisse und anatomischer Erwägungen wird angenommen, daß die periaquäduktale graue Substanz an der Steuerung der Gonadotrophormonerzeugung beteiligt ist.

АДЕНОГИПОФИЗ И МОЗГОВОЙ СТВОЛ. БАЗОФИЛИЯ И «КАСТРАЦИОННЫЕ КЛЕТКИ» В АДЕНОГИПОФИЗЕ КРЫС-САМЦОВ С ПОВРЕЖДЕНИЯМИ В МОЗГОВОМ СТВОЛЕ

Й. ШАШ, Е. ГРИНО, В. Л. БЕНЕДЕТТИ, Л. Ц. АППЕЛЬТАУЕР и Р. ДОМИНГЕЗ

Участие экстрагипоталамических областей в нервной регуляции функции гипофиза доказывается анатомическими исследованиями. В настоящей статье авторы рассматривают способность серого вещества около водопровода повлиять на регуляцию аденогипофиза у крыс-самцов альбиносов, после нанесения незначительных электрических повреждений в среднем мозге. Животные с повреждениями в сером веществе около водопровода были сравнены с кастрированными животными с неповрежденной нервной системой; получались следующие результаты:

а) Число базофильных клеток в аденогипофизе составляло у животных с повреждениями, так же как и у кастрированных животных двоекратное величины в норме.

б) В гипофизе наблюдались многочисленные «кастрационные клетки», как у животных с повреждениями, так и у кастрированных крыс. У животных с повреждениями в сером веществе около водопровода число «кастрационных клеток» после продолжительной эволюции уменьшалось, в то время как у кастрированных животных число этих клеток прогрессивно повышалось. в) Число ацидофильных клеток в гипофизе было повышено как у животных с повреждениями в мозговом стволе, так и у кастратов.

г) У животных с повреждениями в среднем мозге вес яичек был повышен, в то время как вес брюшной предстательной железы остался нормальным. Гистологическая картина клеток Лейдига также была нормальной. Количественное исследование сперматогенетической волны показало незначительное повышение. Эти животные обладали способностью к оплодотворению.

На основании полученных результатов и анатомических соображений авторы полагают, что серое вещество около водопровода участвует в регулировании гонадотропинов.

J. SAS: E. GRIÑÓ: W. L. BENEDETTI: BONTEVIDEO, Neuroendocrinologic Laboratory, Uruguay

L. C. APPELTAUER: | Montevideo, Experimental Medicine Medical Faculty, R. DOMÍNGUEZ: | Uruguay

First Institute of Pathological Anatomy and Experimental Cancer Research (Director: Prof. J. BALÓ), University Medical School, Budapest, Department of Chemistry and Physics (Head: Dr. W. A. LOEVEN), Netherlands Institute for Preventive Medicine, Leiden, Institute of Pathological Anatomy (Director: Prof. Gy. ROMHÁNYI), University Medical School, Pécs

HISTOCHEMICAL STUDIES OF ELASTIC FIBRES BY THE USE OF ELASTOLYTIC ENZYMES SEPARATED BY CHROMATOGRAPHY ON DEAE-SEPHADEX COLUMN

ILONA BANGA, W. A. LOEVEN and GY. ROMHÁNYI

(Received November 11, 1964)

(i) Two components of the elastolytic enzymes: the mucolytic E_t and the proteolytic E_2 could be isolated with a high degree of purity, making it possible to study histochemically the mode of action of the two enzymes.

(ii) Using polarisation optical methods permitting indirect insight into the submicroscopic structure of elastic fibres, the mode of action of two relatively pure fractions (E_1, E_2) of the elastase complex have been studied in sections of human aorta and bovine nuchal ligament fixed in formalin and embedded in paraffin. The topochemical phenol and aniline reactions and anisotropic toluidine blue staining demonstrated the submicroscopic filamentosus structural component of the elastic fibres, whereas the amorphous ground substance was represented by the matrix staining with resorcinfuchsin.

It has been found that during elastolysis E_1 and E_2 acted differently on the matrix and on the filamentous component. Leaving the matrix relatively intact, E_1 abolished sooner the submicroscopic filamentous component of the elastic fibres, while under the effect of E_2 first the staining of the ground substance disappeared and this was followed, presumably secondarily, by a structural disintegration of the fibrillar substance. The results indicate that the modes of action of E_1 and E_2 and the two structural components of elastic fibres are different, and, also, that the two structural components are interrelated as regards stability.

On the basis of electron microscopic studies HALL et al. [10], as well as LANSING et al. [13] arrived at the conclusion that the elastic fibres were composed of two components: cementum and the fibres in it. These studies had been conducted on isolated elastin, by the use of the enzyme elastase. It was found that both the cementing material and the fibres were identical chemically, being equally digested by elastase. In contrast DETTMER [6], as well as SCHWARZ and DETTMER [20], using tissue sections containing native elastic fibres instead of isolated elastin, found that the cementum and the fibres in it were lysed differently by elastase, and concluded that these structures were different not only morphologically, but also chemically. ROMHÁNYI [16] concluded from polarisation studies, that the elastic fibres of the aorta contained a spirally arranged submicroscopic micellary substance. This was confirmed by JENSEN [11] and JENSEN and BERTELSEN [12], who found a micellary structure in spiral arrangement in the elastic fibres of the human foetal aorta. GOTTE and SERAFINI-FRACASSINI [7] observed in the elastic fibres of the aorta and of the nuchal ligament subjected to ultrasonic degradation 15 Å thick filaments in parallel arrangement embedded in the amorphous

ground substance. These data offer sufficient proof of the existence of morphological differences, but supply no information as to the identity or difference of chemical structure.

According to the investigations of BANGA and BALÓ [3], the elastase preparations contain mucolytic enzymes; therefore, the enzyme produced by the preparative method of BAGDY and BANGA [1] has been termed by them the elastase enzyme complex. Purer preparations not having been available, none of them was suitable for elucidation of the above problem. LOEVEN [15] then succeeded in separating by chromatography on DEAE-Sephadex column the two components of the elastolytic enzyme, the E1 (mucolytic enzyme or elastomucoproteinase) and the E_2 (proteolytic enzyme or elastase) from each other and from other contaminations. BANGA and LOEVEN (unpublished experiments) modified the original method of LOEVEN [15], and their pure and homogeneous E1 and E2 preparations were used for studying the complex nature of elastic fibres in the present investigations. With these enzymes it has become possible to decide whether the amorphous cementing material and the fibres in it were identical or different chemically. If the two enzymes digested differently the two components of elastin, it is namely justified to assume that they are different also chemically.

Materials and methods

Polarisation optical methods permitting insight into the submicroscopic structure of elastic fibres were used in the present investigations. The quantitative results thus obtained were compared with the changes in the specific histological staining (resorcin-fuchsin) of the elastic fibres during the enzymatic reaction.

The polarisation optical methods employed were:

1. Toluidine blue ferricyanide anisotropic staining at pH 4.0. In previous studies [17,18] the elastic fibres of the human adult aorta showed intensive birefrigence by this anisotropic staining method, as a result of the toluidine blue molecules being oriented transversally to the longitudinal axis of the fibres. This anisotropic staining is an indirect proof of the presence in the substance of elastic fibres of a submicroscopically oriented component (acid mucoid) characterised by acid side groups. The quantitative changes of the anisotropic staining during the enzymatic process allowed insight into the microstructural changes or degradation of the acid structural component.

2. Phenol reaction (Ebner). The positive birefringence of collagen fibres turns into negative in phenol. This topochemical reaction is due to an orientation of the phenol molecules toward the specific micellary ground structure of collagen. The phenol reaction can be considered to be one of the highly specific microstructural reactions of collagen. The elastic fibres of the human aorta give a moderately positive phenol reaction, indicating that they contain a longitudinal micellary component giving the specific microstructural reaction of collagen. In the following, this structural component will be termed phenol elastoid. The phenol positive elastic fibres are sheathed by morphologically distinct collagen fibres. Due to its acid mucoid component, collagen is strongly metachromatic and correspondingly shows an intense metachromatic anisotropy with toluidine blue. This mucoid collagen, to be called in the following sheath mucoid, is hyaluronidase-sensitive, its metachromatic anisotropy disappears completely on hyaluronidase treatment.

A Leitz Ortholux microscope was used in the polarisation optical studies. The changes in anisotropy are expressed in $m\mu$.

For enzyme treatment a ring of paraffin was placed around the deparaffinated section, 3 drops of the diluted enzyme were placed on it then it was covered with a coverslip to protect it

from drying out. In this way the experiments could be carried out under standard conditions for as long as 24 hours, even with small amounts of enzyme.

Enzyme incubations. E_2 is understood to mean the proteolytic component of the elastolytic enzyme. It was applied as a solution a pH 8.6, M/20 Na₂CO₃-HCl buffer at the concentrations specified in the Tables, after incubation for different periods at 37°C. The mucolytic component of the elastolytic-enzyme complex, E_1 , exerts according to BANGA and BALÓ [4], a mucolipolytic effect on the aorta. It was used at the optimum pH 7.4, in M/20 Na₂CO₃-HCl buffer.

The changes of the anisotropic toluidine blue staining were measured in monochromatic red light. The toluidine blue reaction was carried out as described [17]. For the phenol reaction the enzyme-digested or undigested sections were dehydrated with 96 per cent alcohol, rinsed, blotted, treated with terpineol for 1 to 2 minutes, and covered with a phenol solution to which an equal part of Canada balsam had been added.

The mode of action of the two enzymes has been studied histochemically on specimens of human aorta from newborns and adults, 3 months old human embryos, human intervertebral discs and bovine nuchal ligaments. The results obtained in extensive studies on aorta and nuchal igament specimens are presented below.

Results

Adult human aorta

On staining with resorcin-fuchsin and treatment with E_2 , the elastic fibres of the aorta were suddenly lysed, even at an enzyme concentration of 0.05 mg/ml, after a latency of about 30 minutes duration. After 60 minutes no trace of the elastic fibres was demonstrable; what had remained was a minute quantity of swollen tissue, containing vacuoles and staining weakly with arcein. As opposed to this, on incubation with a l mg/ml solution of E_1 the elastic fibres showed merely 20 to 30 per cent lysis even at 3 hours. This indicates that E_1 exerts no specific lytic action on the staining of elastin with resorcin-fuchsin, whereas E_2 does. According to the investigations of HALL [9] and LOEVEN [14] E_1 enhances synergistically the activity of E_2 . We have attempted to confirm this histochemically. For this purpose we had to use E_2 at such a minimal concentration which produced no change in the resorcinfuchsin staining of elastic fibres in 3 hours. This concentration was 0.005 mg/ml of E_2 . If E_1 was added to this at a concentration of 1 mg/ml, complete lysis ensued in 3 hours, as indicated by the data in Table I.

Т	19	ь	le	T
	્ય			

Synergistic action of E_1 on E_2 on resorcinfuchs in staining

${ m E_1} { m mg/ml}$	E2 mg/ml	Duration of incubation, hours	Disappearance of resorc.n-fuchsin staining, per cent
1	_	3	20
	0.005	3	0.0
1	0.005	3	90
_	0.05	3	100

The studies of the elastolysis on toluidine blue staining yielded the interesting information that E_1 abolished the anisotropy, without influencing the resorcin-fuchsin staining of the fibres (Fig. 1/a and Fig. 1/b). In Table II are shown the intensities of resorcin-fuchsin staining in per cent after different incubating periods. Toluidine blue anisotropy is given in the differences of retardation in m μ . The data prove that the E_1 effect is responsible for the disappearance of toluidine blue anisotropy, whereas in response to elastase (E_2) anisotropy ceases only when the resorcin-fuchsin staining of the cementing material has been completely digested. It is assumed that in this case the anisotropy disappears because after the cementing material has been digested the stability and submicroscopic orientation of the fibrils embedded in it are abolished.

Table II

Enzyme	Duration of incuba- tion, hours	Intensity of resorcin-fuchsin staining per cent	Toluidine blue anisotropic staining. Retardation mµ
$E_1 \ 1 \ mg/ml$	1	100	-22
$E_1 1 mg/ml$	2	90	— 8
$E_1 1 mg/ml$	3	80	0.0
Buffer control	3	100	-24

Effect of E_1 on toluidine blue anisotropy staining of the aorta

Table III contains the data for the combined effect of E_1 and E_2 on human aorta, under experimental conditions when none of the two enzymes by itself abolished the toluidine blue anisotropy, but when acting together they reduce the initial way difference by about 50 per cent.

Table III

Combined action of E_1 and E_2 on toluidine blue anisotropic staining

Enzyme	Duration of incubation hours	Toluidine blue anisotropic staining	
		retardation in $m\mu$	decrease, per cent
$E_1 0.5 mg/ml$	1	-22	0.0
$\rm E_2~0.005~mg/ml$	1	-20	0.0
${f E_1\ 0.5\ +\ E_2\ 0.005\ mg/ml}$	1		50
Control	1	-22	0.0

a



b

Fig. 1. Toluidine blue anisotropic staining of adult human aorta: a) Without treatment. b) Folloving digestion with E₁. Here the light bands are empty and mark the site of dissolved elastic fibres.



Fig. 2. Section of adult human aorta. Phenol reaction using polarisation microscope. a) The elastic fibres are surrounded transversally by collagen fibres, showing similarly negative birefringence. b) The same after digestion with E_1

Whereas the embedded fibrils are lysed specifically by E_1 and secondarily by E_2 , and the two together cause complete lysis and abolish the anisotropic and histological stainings, the metachromatic anisotropic staining of the colla-

gen around the elastic fibre remains unchanged (Table IV). As at pH 4 toluidine blue reacts with the mucoid components of both elastin and collagen, in this case we speak about elastin-mucoid and collagen or sheath mucoid, to distinguish the two from each other. Table IV shows the effects of E_1 and E_2 on the two kinds of fibre mucoid.

Table IV

Enzymes	Duration of incubation hours	Toluidin blue aniso- tropic staining. Retardation in mµ	
		Elastin- mucoid	Collagen mucoid
Buffer control	1	-20	-20
$\mathrm{E}_2~0.005~\mathrm{mg/ml}$	1	-19	-19
$E_1 \ 1 \ mg/ml$	2	— 7	-19
$\mathrm{E_2~0.005~mg/ml} + \mathrm{E_1} \ \mathrm{1~mg/ml}$	3	0.0	—19

Toluidine blue anisotropic staining of elastin-mucoid and collagen sheath mucoid in adult huma aorta

Beside the collagen the filaments embedded in the elastic fibres also react with phenol (Fig. 2/a and Fig. 3/a). This material is called phenol elastoid, in contrast to the spiral circular sheath mucoid, which is composed of collagen. In response to E_1 the phenol elastoid disintegrates completely and an empty space remains in the place of the light or dark bands (Fig. 2/b and Fig. 3/b). On the other hand, the sheath mucoid remains unchanged and shows the same negative birefringence after as before enzyme treatment.

This reaction has proved to be highly suitable for demonstrating the specific effect of E_1 , because whereas the resorcin-fuchsin staining did not change on treatment with 1 mg/ml of E_1 for 1 hour, the phenol reaction of the elastic fibres disappeared completely. On treatment with E_2 reaction is abolished only when the elastic fibres have lost their resorcin-fuchsin staining. The effect of E_2 is explained by the same mechanism as in the case of toluidine blue anisotropy.

The newborn aorta shows even more clearly that E_2 acts on the components staining with resorcin-fuchsin, whereas E_1 disintegrates the phenol elastoid component and this loses its ability to combine with phenol. The results are presented in Table V. Even at high concentrations when E_2 abolishes the resorcin-fuchsin staining already in 2 hours, it exerts no action on the phenol elastoid, the intensity of the reaction being unaffected by enzyme treatment. In response to E_1 the resorcin-fuchsin staining diminishes only by about 10 per cent, whereas the negative birefringence of the phenol elastoid drops at the



Fig. 3. Section of adult human aorta. Phenol reaction. Polarization microscopic appearance. a) The elastic fibres, running straight and compensated black are sheathed transversally and circularly by collagen fibres, showing negative birefringence



b) The same after digestion with E_1

same time to one-fourth of the original. None of the enzymes diminishes the negative birefringence of the collagen sheath mucoid. This material as compared to the phenol elastoid, shows a stronger negative birefringence, which is another proof of the difference of the two materials (Table V).

Table V

Effect of E_1 and E_2 on sections of newborn human aorta

Duration of incubation, hours	Resorcin- fuchsin staining per cent	Retardation in $m\mu$	
		Phenol elastoid	Collagen sheath mucoid
2	100	-13	-19
2	0.0	-12	-19
3	90	— 3	-19
	Duration of incubation, hours 2 2 3	Duration of incubation, hoursResorcin- fuchsin staining per cent210020.0390	Duration of incubation, hoursResorcin- fuchsin staining per centRetardat2100-1320.0-12390-3

Calf nuchal ligament

These experiments served to study the differences in the effects of elastase (E_2) and elastomucoproteinase (E_1) on the various submicroscopic components of the nuchal ligament. The sections of nuchal ligament had to be incubated with the enzymes for 17 hours to be able to demonstrate their activities. E_2 has been found to cause complete disappearance of the resorcin-fuchsin staining of the elastic fibres, whereas it does not affect the toluidine blue anisotropic staining, which is correlated with the structure of the elastin-mucoid. This component disappears from the sections of adult aorta on treatment with E_2 , but only when the resorcin-fuchsin staining of the fibres has ceased. It seems, however, that the elastin-mucoid is much more stable in the nuchal ligament than in the aorta, because when the matrix staining with resorcin-fuchsin is completely disintegrated, the elastin-mucoid reacting with toluidine blue still retains its submicroscopic arrangement.

In the nuchal ligament, too, E_1 acted in the opposite direction as E_2 did. On protracted incubation with 1 mg/ml of E_1 , resorcin-fuchsin staining showed merely a transversal breaking up [2], but the particles retained their staining. On the other hand, toluidine blue anisotropy disappeared, which means that E_1 lyses specifically the elastin-mucoid of the nuchal ligament, causing thus the transversal breaking up.

Discussion

It has not been possible to demonstrate histologically or enzymatically chemical differences between the cementing material of elastin and the fibres embedded in it. HALL [8,9] surmised that at least two enzymes were involved

in the degradation of elastic fibres, exerting their actions specifically on different components of elastin. Yet, there has been no morphological proof that the two enzymes would differently act histochemically and enzymologically. We have succeeded in overcoming one of the greatest difficulties in this respect by using elastase (E_2)-free E_1 and elastomucoproteinase (E_1)-free E_2 in our experiments. This has made it possible to prove by histoenzymatic methods that the two components of the elastolytic enzyme, viz. the proteolytic enzyme elastase and the mucolytic component called elastomucoproteinase, would act on two different morphological units of elastin. It has been proved that the fibres embedded in the cementing material have a mucopolysaccharide component reacting with toluidine blue and this is lysed in the first place by E_1 , which has been shown also by biochemical studies to act on the mucoid or mucolipoprotein [4] component of elastin. On the other hand, the real elastase (E_2) acts on the cementing material or matrix, digesting rapidly, whereas E_2 exerts no, or merely a minimal, effect on the fibrils.

In connection with the effect of E_1 histochemical kinetics allow some distinction between the component reacting with toluidine blue and the so-called phenol elastoid. In sections of adult aorta the latter reaction disappears in 1 hour at an E_1 concentration of 1 mg/ml, whereas at the same concentration 3 hours are required for the total disappearance of toluidine blue anisotropy. From this it may be concluded that two different chemical groups are involved in the two reactions and even two different E_1 components might participate in the splitting off of the two groups. These E_1 components are so closely related chemically that by the method employed by us no distinction can be made between them.

In the light of the evidence derived from these experiments we believe that DETTMER [6] as well as SCHWARZ and DETTMER [20] worked with such elastase preparations which contained mainly E_2 . As a result, in their experiments only the cementing material was digested, whereas the filaments embedded in it remained intact. There are two factors to indicate that this assumption is realistic. One of them is that according to the investigations of CZERKAWSKI and HALL [5] and LOEVEN [14] the E_1 component is much less stable and therefore destroyed sooner during isolation than the E_2 component. The other factor is that while E_2 produces a clearly observable effect even at a very low concentration (0.05 mg/ml), of E_1 relatively high concentrations (1 mg/ml) must be used in every case. This means that the digestion of the mucoid component (elastin-mucoid) of the filaments embedded in the elastin matrix requires 20 times as much of E_1 as of E_2 , which latter digests the cementing material.

REFERENCES

1. BAGDY, D., BANGA, I.: (1957) Acta physiol. Acad. Sci. hung. 11, 371. – 2. BALÓ, J., BANGA, I., SCHULER, D.: (1954) Acta morph. Acad. Sci. hung. 4, 141. – 3. BANGA, I., BALÓ, J.: (1956) Nature (Lond.) 178, 310. – 4. BANGA, I., BALÓ, J.: (1962) Acta physiol. Acad. Sci. hung. 21, 301. – 5. CZERKAWSKI, I. W., HALL, D. A.: (1958) Biochem. J. 70, 6. – 6. DETTMER, N.: (1952) Z. Zellforsch. 37, 89. – 7. GOTTE, L., SERAFINI-FRACASSINI, A.: (1963) J. Atheroscler. Res. 3, 247. – 8. HALL, D. A.: (1953) Biochem. J. 55, 35. – 9. HALL, D. A.: (1955) Biochem. J. 59, 459. – 10. HALL, D. A., REED, R., TUNBRIDGE, R. E.: (1952) Nature (Lond.) 170, 264. – 11. JENSEN, J. G.: (1962) Acta path. microbiol. scand. 56, 388. – 12. JENSEN, J. G., BERTELSEN, S. V.: (1961) Acta path. microbiol. scand. 51, 241. –13. LANSING, A. I., ROSENTHAL, T. B., ALEX, M., DEMPSEY, E. W.: (1952) Anat. Rec. 114, 555. – 14. LOEVEN, W. A.: (1960) Acta physiol. pharmacol. neerl. 9, 473. – 15. LOEVEN, W. A.: (1963) Acta physiol. pharmacol. neerl. 12, 57. – 16. ROMHÁNYI, GY.: (1955) Acta morph. Acad. Sci. hung. 5, 311. – 17. ROM-HÁNYI, GY.: (1958) Nature (Lond.) 182, 929. – 18. ROMHÁNYI, GY.: (1959) Acta histochem. (Jena) 8, 340. – 19. ROMHÁNYI, GY. (1962) Morph. és Ig. Orv. Szemle. (Budapest) 2, 161. – 20. Schwarz, W., DETTMER, N.: (1953) Virchow's Arch. path. Anat. 323, 243.

HISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG DER ELASTISCHEN FASERN MIT DURCH DEAE-SEPHADEX-SÄULENCHROMATOGRAPHIE GETRENNTEN ELASTOLYTISCHEN ENZYMEN

ILONA BANGA, W. A. LOEVEN und GY. ROMHÁNYI

1. Zwei Komponenten der elastolytischen Enzyme: die mukolytische Komponente E_1 und die proteolytische Komponente E_2 konnten mit hohem Reinheitsgrad getrennt werden; dies ermöglichte die histochemische Untersuchung des Wirkungsmechanismus der beiden Enzyme.

2. An in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Schnitten von menschlichen Aorten und von Nackenbändern vom Rind wurde mit polarisationsoptischen Methoden, die einen indirekten Einblick in die submikroskopische Struktur der elastischen Fasern gewähren, der Wirkungsmechanismus der relativ rein hergestellten zwei Fraktionen (E_1 , E_2) des Elastasekomplexes untersucht. Die topochemischen Reaktionen (Phenol-, Anilin- und anisotrope Toluidinblaufärbung) zeigen die submikroskopische faserige Strukturkomponente der elastischen Fasern, während die amorphe Grundsubstanz von der mit Resorcin-Fuchsin reagierenden Matrix vertreten wird.

Es wurde festgestellt, daß der Abbau der mit Resorcin-Fuchsin reagierenden Grundsubstanz der elastischen Fasern und der Abbau der anisotrope Reaktionen gebenden faserigen Komponente der elastischen Fasern im Laufe der Elastolyse auf Wirkung von E_1 und E_2 ein jeweils anderes Verhalten zeigte. Die Fraktion E_1 baute zunächst die submikroskopische fibrilläre Komponente der elastischen Fasern ab, die Struktur der Grundsubstanz blieb relativ erhalten. Unter der Wirkung der Fraktion E_2 verschwand zuerst die Färbung der Grundsubstanz, wonach, vermutlich sekundär, die strukturelle Auflösung der fibrillären Substanz folgte. Die Untersuchungsergebnisse weisen auf die Unterschiedlichkeit des Wirkungsmechanismus der Fraktionen E_1 und E_2 sowie der beiden Strukturkomponenten der elastischen Fasern hin. Es wird angenommen, daß die beiden Strukturkomponenten in bezug auf ihre Stabilität wechselseitig voneinander abhängen.

ГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЛАСТИЧЕСКИХ ВОЛОКОН ПРИ ПОМОЩИ ЭЛАСТОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ, ИЗОЛИРОВАННЫХ МЕТОДОМ ХРОМАТОГРАФИИ НА СТОЛБЕ ДЭАЕ-СЕФАДЕКС

И. БАНГА, В. А. ЛЕВЕН и Д. РОМХАНЬИ

1. Авторам удалось сравнительно чисто получить два компонента эластолитических энзимов: муколитический компонент E_1 и протеолитический компонент E_2 . Это предоставляло возможность также для гистохимического исследования механизма действия двух энзимов.

2. На срезах человеческой аорты и затылочной связки крупного рогатого скота, фиксированных в формалине и заложенных в парафин, механизм действия двух сравнительно чисто полученных фракций (E_1 , E_2) эластазного комплекса исследовался в тканевых условиях при помощи поляризационного микроскопа, позволяющего косвенный взгляд в субмикроскопическую структуру эластических волокон. Примененные топохимические реакции (реакции с фенолом, анилином и реакция анизотропного окрашивания толуидиновой синькой) выявляли субмикроскопический волокнистый структурный компонент эластических волокон, в то время как аморфное основное вещество представляет матрикс, окрашивающийся резорцин-фуксином.

Авторы установили, что расщепление основного вещества эластических волокон, окрашиваемого резорцин-фуксином, и расщепление их волокнистого компонента, дающего анизотропные реакции, при эластолизе фракциями E_1 и E_2 показывает различное поведение. Фракция E_1 расщепляет сперва фибриллярный субмикроскопический структурный компонент эластических волокон, при относительном щажении основного вещества, в то время как при действии фракции E_2 сперва прекращается окрашивание основного вещества, а затем происходит, вероятно вторично, разложение структуры фибриллярного вещества. Исследования авторов указывают на тот факт, что механизм действия фракций E_1 и E_2 , и два структурных компонента эластических волокон неодинаковы. На основании полученных данных можно предполагать также и то, что два структурных компонента в отношении стабильности зависят друг от друга.

Dr. Ilona BANGA: Budapest VIII. Üllői út 26., Hungary Prof. Dr. W. A. LOEVEN: Leiden, Nederlands Institute for Preventive Medicine, Department of Chemistry and Physics, Nederland

Prof. Dr. György Romhányi: Pécs, Dischka Győző u. 5., Hungary



Institute of Pathological Anatomy (Director: Prof. Dr. Gy. Romhányi), University Medical School, Pécs

ON THE SUBMICROSCOPIC STRUCTURE OF THE ELASTIC FIBRES OF THE BOVINE LIGAMENTUM NUCHAE AS REVEALED BY THE POLARIZATION MICROSCOPE

Gy. Romhányi

(Received November 15, 1964)

The elastic fibres of the bovine ligamentum nuchae show a characteristic threebanded anisotropic pattern with two negative intrinsic birefringent outer zones and a positive intrinsic birefringent axial band, separated by two isotopic paramedian bands. On the fibre cross-sections the optical sign of a spheritic texture can be recognized. The optical findings indicate the elastic fibres to be built up of two more or less separate micellar textures: an outer zone with annular micellar arrangement and an axial core with an elongated spiral texture. The positive birefringence of the axial core overcompensates the negative birefringence of the overlying outer zone. Thus on the borderline zones between the two opposite micellar textures there arise two isotropic bands producing the three-banded anisotropic pattern.

Characteristic differences in anisotropic toluidine blue staining of the axial band and the outer zone have been found and are interpreted to result from differences in structural density between the outer zone and the axial band.

The elastic fibres of young cattles lack the three-banded anisotropic pattern, indicating an underdeveloped state of the outer zone.

In continuation of previous polarization microscopic studies on the ultrastructure of the elastic fibres [19, 20, 22] similar investigations have been made on the elastic fibres of the bovine ligamentum nuchae. In aniline they have been found to present a characteristic three-banded anisotropic pattern which was considered to be indicative of a low-pitched submicroscopic spiral texture [21]. The present studies have shown that the fibres in question have a complex structure and are made up of a central core with a longitudinal micellar arrangement corresponding either to a fibroid texture or to an elongated spiral texture surrounded by an outer zone with circular micellar arrangement corresponding to a ring texture.

Material and methods

Investigations were carried out on frozen and on paraffin sections of formol-fixed ligamentum nuchae of cattle of various ages. In addition, fresh specimens were treated with 0.1 N NaOH at 98° C for $\frac{1}{2}$ hr and then either fixed in formol and investigated in paraffin sections, or homogenized to obtain isolated fibres free of collagenous structures. The fibre homogenates were fixed in formalin and used for polarization microscopic studies. For visualization of the fine anisotropy, topochemical and anisotropic staining reactions (aniline and phenol reaction, anisotropic toluidine-blue-ferricyanide staining) as described previously [19, 20, 25] were applied.

A Leitz Ortholux II. polarization microscope equipped with rotating Leitz compensators (of 18 and 58 m μ retardation), and for observations in monochromatic light at different wavelengths, a Leitz monochromator and a Zeiss interference filter were used. Refractive indices of the mounting media were measured with a Leitz mikrorefractometer according to JELLEY.



Fig. 1. Elastic fibres of bovine ligamentum nuchae at crossed polaroids. a) Unstained paraffin section mounted in aniline. The elastic fibres show a three-banded anisotropic pattern. Since the birefringence of the collagenous fibres is depressed by aniline to isotropy, they are not visible. b) Fibre of ligamentum homogenate mounted in gum arabic shows the characteristic three-banded pattern. c) The same at $4 \text{ m}\mu$ subtractive and d) additive compensation. The axial and lateral bands show opposite optical behaviour. In c) the positive axial band is compensated to black while the negative lateral bands show increased brightness. The opposite effect is seen in d)

Polarization optical findings in the length of the elastic fibres

Fig. 1/a demonstrates the characteristic three-banded anisotropic pattern of the fibres of the ligamentum nuchae as seen in aniline. In each elastic fibre three anisotropic bands, separated by two dark paramenian isotropic bands,


Fig. 2. Congo-red stained elastic fibres at crossed polaroids, a) in paraffin section, b) in homogenate. The birefringence of the bands is markedly increased: retardation of the lateral bands 14 mµ (-), that of the axial band 22-24 mµ (+), c) The same fibres as in b) at 22 mµ compensation. In the vertically oriented fibres the negative lateral bands, in the horizontally oriented fibres the positive axial bands are compensated to dark. d) Elastic fibres in homogenate, stained with toluidine blue-ferricyanide at pH 4,0 and photographed in red light at the same compensation as in c). The fibres do not show the three-banded optical pattern and appear as cylinders of uniform optical character resulting from a selective inversive anisotropic staining of the axial core. $\times 250$

are visible. The two lateral bands were negatively birefringent with respect to fibre length, showing a transversally oriented slow axis of transmission. The central anisotropic band, however, proved to be optically positive, showing the slow axis of transmission to be parallel to the fibre length. Table I shows the retardations in $m\mu$ and the sign of birefringence of the axial and lateral bands of the unstained elastic fibres of ligamentum nuchae homogenates mounted in different media with varying refractive indices and of fibres stained

with Congo-red and toluidine blue. It is seen that the optical character of the birefringence of the bands of the unstained fibres was the same in a number of mounting media with refractive indices up to n 1.60 indicating a positive intrinsic birefringence of the axial band and a negative intrinsic birefringence of the lateral bands with respect to fibre length (Fig. 1/b, c, d). Congo-red staining markedly enhanced the birefringence of the bands without changing





Fig. 3. Frozen section of formol-fixed bovine ligamentum nuchae a) unstained and mounted in anisate oil. The cross sections of the elastic fibres show up in the form of weak anisotropic spherites with retardation of about 1.8 m μ , b) stained with toluidine blue ferricyanide at pH 4.0, after pretreatment with hyaluronidase and pretreatment with potassium permanganate. The strongly increased birefringence of the spherites is apparent. Each spherite is surrounded by a narrow dark nearly isotropic zone on the fibre cross section which is more clearly seen at greater magnification of the next fibre. $\times 250$

their optical character (Table I and Fig. 2/a, b, c). On the other hand, toluidine blue—ferricyanide staining produced a different anisotropic reaction of the bands, viz. (i) it moderately enhanced the birefringence of the lateral bands without changing their optical character, and (ii) it caused the positive optical character of the central band to turn into a negative one. As a result of this selective inversive anisotropic staining reaction of the axial core, the threebanded optical pattern of the fibres had disappeared since the central as well as the lateral bands were now of the same optical character and no isotropic compensation bands were seen (Fig. 2/d). The fibres now showed a uniform optical behaviour. They were negatively birefringent in light of wavelengths over λ 510 m μ and optically positive in light under λ 500 m μ , and showed anomalous colours changing from red to blue, characteristic of an oriented binding of toluidine blue molecules on an oriented array as first described by



Fig. 4. Paraffin section of ligamentum nuchae treated as in Fig. 3/b, Fig. 4/a. Under the light microscope a lighter stained central area is seen in cross section of the fibres surrounded by a more basophilic outer zone. There are also several composite fibres with a few cores surrounded by a common outer zone. Cell nuclei are seen between the fibres. b) The same field at crossed polaroids. The strongly anisotropic spherites are confined to the cores of the fibres. The more basophilic outer zones appear as weakly birefringent dark zones. Compressed and more or less deformed spherites can also be seen in the composite fibres. c) At 22 m μ compensation, two corresponding quadrants of the spherites are compensated to dark



Fig. 5. Frozen section of ligamentum nuchae of two-months old calf. Staining procedure as in Fig. 5/b. The cross-sections of the fibres appear as strongly anisotropic spherites. In a) the same field is seen under the light microscope and in c) at crossed polaroids and at 10 m μ compensation. Two corresponding quadrants of the spherites are compensated to dark

Table I

	Axial band	Outer bands	
Unstained and mounted in gum arabic (after drying: n 1.502)	5.8-6 (+)		
Canada balsam (n 1.514)	5.0 (+)	4.5 ()	
Phenol canada (n 1.541)	2.0 (+)	1.8 (-)	
Aniline (n 1.584)	6-6.5 (+)	5.0 (-)	
Anisate oil (n 1.530)	4.2 (+)	4.1 (-)	
Cinnamon oil (n 1.60)	6.0 (+)	5.5 (-)	
Stained with Congo-red and mounted in gum arabic	24-26 (+)	10-14 ()	
Toluidine blue-ferricyanide	9-11 (-)	5.5 (-)	
Potassium permanganate toluidine blue-ferricyanide	22-24 ()	20-22 (-)	

Retardations in $m\mu$ and sign of birefringence of the bands of the elastic fibres in bovine ligamentum nuchae homogenates

BREWER in collagen fibres, and studied by us in detail in connection with the submicroscopic structure of the metachromatic reaction [25]. The toluidine blue stained elastic fibres showed a very weak negative dichroism, with maximal absorption for light of λ 520 m μ polarized at right angles to the fibres.

Polarization optical findings on the cross-sections of the elastic fibres

On the cross-sections of the unstained elastic fibres of the ligamentum nuchae a very weak anisotropy in the form of spherites was found, suggesting the presence of a circular microstructural organisation throughout the cross section of the fibre. In unstained sections mounted in gum arabic, Canada balsam, terpineol or anisate oil, the cross-sections displayed very weak optically negative spherites with retardations of about $1.8-2 \text{ m}\mu$ (Fig. 3/a). Congo-red staining enhanced moderately the anisotropy of the elastic fibre cross-sections (with retardations of $5-6 \text{ m}\mu$) without indicating a difference between an outer and an inner zone. Toluidine blue-ferricyanide staining following hyaluronidase pretreatment of the sections to decrease the metachromatic anisotropic staining of the connective tissue fibres, and potassium permanganate pretreatment to increase the anisotropy of the elastic fibres [20, 22] caused however a marked increase in the anisotropy of the spherites showing

retardations up to $22-24 \text{ m}\mu$ (Fig. 3/b). In addition, this staining procedure produced a selective difference between an outer zone and an inner core of the cross-sections (Fig. 4/a). Under the light microscope the cross-sections of the fibres showed two clearly discernible areas: a lighter staining round area in the centre of the fibres, surrounded by a more basophilic outer zone. At crossed polaroids the lighter central cores revealed strong anisotropy in the form of negative spherites with tangentially oriented slow axis of transmission (Fig. 4/b, c). In spite of their more basophilic staining the outer zones revealed only weak anisotropy with retardations of about $10-12 \text{ m}\mu$.

Special mention should be made of a finding concerning the nuchal fibres of young cattle of about one to two months of age. These fibres did not show the characteristic three-banded anisotropic pattern. They appeared as uniformly birefringent cylinders of positive optical character and no isotropic bands could be observed either visually or in microphotographs. On the crosssections however, they showed the typical anisotropic spherites of the central cores (Fig. 5).

Ultrastructural interpretation of the polarization optical findings

Our findings concerning the optical character of the anisotropic bands of the unstained fibres of the bovine ligamentum nuchae thus corresponded to the early finding of SCHMIDT, who first noticed this three-banded anisotropic pattern on isolated fibres mounted in clove oil, without however, making any comment on the ultrastructural implication of this optical phenomenon. In this respect our results disagree with the more recent finding of KRETSCH-MANN, who in a study on the autofluorescence and birefringence of the elastic fibres also observed a three-banded anisotropic pattern on the bovine ligamentum fibres and stated that the axial band as well as the lateral ones were of positive optical character. Also concerning the fibre cross-sections, his findings disagree with ours. Investigating in glycerin unstained frozen sections of the bovine ligamentum he found the cross-sections to be isotropic and covered with a thin birefringent surface layer with tangentially oriented slow axis of transmission. Based on this finding KRETSCHMANN developed a concept of the submicroscopic structural organisation of the elastic tissue in general, which thus cannot be considered as valid. The discrepancy between KRETSCHMANN's findings and ours may probably be attributed to the fact that, in order to be able to examine both autofluorescence and birefringence on the same fibre, he investigated frozen sections of ligamentum nuchae in glycerin. This mounting medium, however, does not seem to be appropriate for the study of the weak birefringence of the elastic fibres, firstly because of the presence of disturbing phase boundary phenomena, clearly visible in KRETSCHMANN's polarization micrographs, due to the considerable difference between the refractive indices

403

of glycerin n 1.47 and the elastic fibres n 1.534 (16) and, secondly, because of the prevalence in this medium of the strong birefringence of the collagenous structures which may be a major disturbing factor in the analysis of the fine birefringency phenomena of the elastic fibres in tissue sections.

Such difficulties were already involved in our preliminary assumption [22] of a low-pitched spiral design as a possible explanation of the polarization optical pattern of the nuchal elastic fibres, supposing a longitudinal micellar arrangement in the lateral bands, and an oblique transversal arrangement in the axial band. This assumption was based on the belief that aniline caused an inversion of the optical character of these fibres as it did in the elastic fibres of the human aorta, but later it turned out that this was not the case. However, because of the strong birefringence of the collagen fibres surrounding the elastic fibres, this was recognized only later, especially conclusively in the collagen free homogenates of elastic fibres.

The negative intrinsic birefringence of the lateral bands and the positive birefringence of the axial band of the elastic fibres of the ligamentum nuchae is suggestive of the presence of a transversally oriented micellar texture in the lateral bands and a longitudinal micellar pattern in the axial band of the fibre. However, if this is the case, it is hard to imagine how any single structural pattern could have such a complex micellar arrangement. Therefore we were necessarily led to the assumption of two separate, more or less interconnected, micellar textures in the elastic fibres of the ligamentum nuchae: one in the fibre axis with longitudinal micellar orientation and a positive sign of birefringence with respect to the fibre length and another surrounding the former as an outer layer with annular micellar arrangement and giving rise to birefringence negative in respect to the fibre length in the lateral zone of the fibre (Fig. 6). In fact, if in such a composite fibre the positive birefringence of the axial core is strong enough to overcompensate the negative birefringence of the overlying outer zone then there will emerge a three-banded anisotropic pattern with a positively birefringent central band and two negatively birefringent lateral ones, separated by two optically isotropic bands. The latter must necessarily result from the mutual compensation of the opposite birefringences of the two micellar textures in their overlapping borderline zones.

In fact such a three-banded optical pattern can be demonstrated also in a model. A sheet of nylon is birefringent and the orientation of its slow and fast axes of transmission can easily be determined. A double-layered cylinder relatively small in diameter (1-2 mm) is prepared of a sheet of nylon so that the slow axis of transmission lies parallel to the cylinder axis. This cylinder is then introduced into another single layered cylinder having the small axis of transmission transversally oriented. Viewed between crossed polaroids this model produces a three-banded anisotropic pattern similar to that of the elastic fibres of the ligamentum nuchae with a positively birefringent axial band and two negatively birefringent lateral ones separated by two isotropic compensation bands.

Thus the polarization optical phenomena of the elastic fibres of the bovine ligamentum nuchae observed in their length as well as on their cross-sections

strongly support the view that they are made up two separate micellar textures of opposite arrangement, forming an axial core and an overlying outer zone. The outer zone of the elastic fibre is negative with respect to the fibre length indicating an annular micellar arrangement corresponding to a ring structure. The axial core is positively birefringent with respect to the fibre length, indicating the presence of a longitudinally oriented micellar texture; on its



Fig. 6. Diagrams of different complex micellar arrangements and their optics in fibre structures. In a) a fiber texture is surrounded by an annular micellar texture. The index ellipses indicate the character of the birefringence. The positive birefringence of the core overcompensates the negative birefringence of the overlying outer zone. In the borderline zones of the two opposite birefringences there arise two isotropic compensation bands leading to a threebanded anisotropic pattern in the length of the fibre, corresponding to that seen in the elastic fibres of the bovine ligament. On the cross-section the core appears isotropic, at variance with the spheritic texture seen on cross-sections of elastic fibres. In b) a central core of elongated spiral texture is surrounded by an annular micellar texture. The index ellipses indicate similar optics in the fibre length as in a). However, on cross-section, not only the outer zone, but also the core appears as a spheritic texture. The optics of this diagram correspond in all respects to those observed in the elastic fibres of the bovine ligament. c) A diagram of the suggested micellar texture of the elastic fibres of the ligamentum nuchae of young cattle with underdeveloped outer zone. The fibre appears uniformly positively birefringent with respect to the fibre length and shows a spheritic texture on the cross-section

cross-section, however, it is not isotropic as a fibre texture would be (Fig. 6/a) but appears as an optically negative spherite (Fig. 6/b). This optical behaviour is typical either of a fibroid texture [4] in which longitudinally oriented micellar strands scatter with respect to the fibre axis, or of an elongated spiral texture in which longitudinally oriented micellar strands are aligned in parallel but slightly twine round the fibre axis [4]. Although it could

405

GY. ROMHÁNYI

not be decided definitely which of these two closely related textures was present, the greater elasticity of a spiral texture would seem to argue for the latter as the core of the elastic fibre of the bovine ligamentum nuchae. The characteristic three-banded polarization optical pattern of the fibres can be explained to result from an overcompensation of the negative birefringence of the outer zone by the positive birefringence of the core in the central zone of the fibre. In the borderline zones between the two opposite micellar textures, two paramedian isotropic compensation bands arise.

The elastic fibres of the ligamentum nuchae of young cattle are characterized by a lack of the three-banded anisotropic pattern. Instead they reveal an uniform positive birefringence with respect to their length and negative spherites on their cross-sections (Fig. 5). These findings suggest an underdeveloped state of the outer zone in the elastic fibres of young cattle, which may explain why these fibres do not show the three-banded polarization optical pattern typical of the fibres of adult animals (Fig. 6/c).

Of special interest in our findings appears to be the selective inversive anisotropic toluidine blue ferricyanide staining of the axial core, since this may be regarded as a direct optical proof of a special microstructural organisation-difference in structural density, the outer zone being the denser structure.

This indirect conclusion is in agreement with early views on the structural organisation of the elastic fibres of the bovine ligamentum nuchae. From the greater refractiveness of the outer zone of the elasctic fibres of the bovine ligaments, SCHWALBE inferred its greater density; the more intense basophilic staining of the outer zone was interpreted in the same sense. More recently there have been data in the literature to indicate a possibility of differentiation between an outer zone and an axial core in the nuchal elastic fibres. Thus on the basis of histochemical and enzymatic evidence the presence of a central core has recently been inferred [12]. During elastolysis of alkali-treated homogenates of the ligamentum nuchae of the horse, LANSING et al. observed under the light microscope fibres with a more or less demarcated spirally contoured central core. We have seen such fibres in the homogenates also without enzymatic treatment, when viewed in water. The great majority of the fibres in the homogenates appeared homogenous under the light microscope, nevertheless showing the typical three-banded polarization optical pattern. Therefore, we may consider the light microscopic finding in the homogenates of such a spirally contoured central core a result of an alkali or enzyme induced early structural derangement which, nevertheless, points to the pre-existence of a central core in a masked form, regularly detected by polarization microscopy not only in the fibre homogenates but also in the fibres of fixed specimens.

A final point to be discussed is concerned with the question how the discussed ultrastructural pattern inferred from indirect polarization optical evidence can be correlated with the electron microscopical pattern of the same

fibres. In ultrathin sections a submicroscopic fibrillary structure consisting of non-striated microfibrils has been demonstrated in elastic fibres of different origin by several investigators [2, 3, 5, 7, 8, 11, 12, 13, 15, 17, 18]. Partial elastolysis, ultrasonic treatment of the tissues was often used to visualize more clearly the fibrillary elements embedded in a homogenous matrix. The microfibrils in the elastic fibres were often found to run longitudinally, although not infrequently they were found to be distributed at random. A system of higher order of this fibrillary component of the elastic fibres has not yet been recognized in ultrathin sections, except for the recent finding by JENSEN and BERTELSEN of a spirally twined ultrastructural pattern in the elastic fibres of the aorta of human foetuses as suggested previously in our polarization optical studies [19]. In osmium-fixed bovine ligamentum DETTMER [1956] observed a more homogenous electron microscopic appearance of the elastic fibres. However, after prolonged maceration in OsO4 of fresh material the elastic fibres disintegrated to a filamentous component and a granular amorphous matrix

In their more recent electron microscopic studies of the bovine ligamentum nuchae, KAWASE et al. found in the elastic fibres a rich network of beaded fibrils, which in longitudinal sections showed a tendency to run parallel to one another and to the fibre axis. On cross-sections such a tendency could not be observed and only a circular or polygonal arrangement of the network was noted. Such an arrangement of the fibrillary network would seem to correspond to the ultrastructural pattern suggested by our polarization optical findings. From the present evidence, however, no conclusion can be drawn in this respect. Only further studies of serial ultrathin sections may detect a definite form of a system in the fibrillary network of the elastic fibres of the bovine ligamentum nuchae, and thus provide a basis for a comparison of their polarization optical and the electron microscopical ultrastructural pattern.

REFERENCES

1. BREWER, D. G.: (1957) Differences in the Fine Structure of Collagen and Reticulin as Revealed by the Polarising Microscope. J. Path. Bact. 74, 371. -2. CHASE, W. H.: (1959) Distribution and Fine Structure of Elastic Fibres in Mouse Lung. Exp. Cell Res. 17, 121. -3. DETTMER, N.: (1956) Elektronmikroskopische Untersuchungen am elastischen Fasersystem des Ligamentum nuchae. Z. Zellforsch. 45, 265. -4. FREY-WISSLING, A.: Submicroscopic Morphology of Protoplasm. Elsevier, Amsterdam 1953, Pp 94–95. -5. GIESE, W. and GIESEKING, R.: (1957) Die submikroskopische Struktur des fibrillären Grundgerüstes der Alveolenwand. Beitr. path. Anat. 117, 17. -6. GILLMAN, T.: (1959) Reduplication, Remodelling, Regeneration, Repair and Degeneration of Arterial Elastic Membranes. Arch. Path. 67, 624. -7. GOTTE, L. and SERAFINO-FRACASSANI, A.: (1963) Electron Microscope Observations on the Structure of Elastin. J. Atheroscler. Res. 3, 247. -8. HALL, A. D., REED, R. and TUNBRIDGE, R. E.: (1955) Electron Microscope Studies of Elastic Tissue. Exp. Cell Res. 8, 35. -9. JENSEN, J. G. and BERTELSEN, S.: (1961) Histochemical Studies on Elastic Membranes of Foetal Human Aorta. Acta path. microbiol. scand. 51, 241. -10. JENSEN, J. C.: (1962) An Electron Microscopic Study on the Morphology of the Elastin in Foetal Human Aortas. Acta path. microbiol. Scand. 56, 388. -11. KARRER, H. E. and Cox: (1961) An Electron Microscope Study of the

Aorta in Young and Aging Mice. J. Ultrastr. Res. 5, 1. - 12. KAWASE, O.: (1959) Some Electron Microscopical Studies on the Connective Tissue. An Approach to the Basis of Constitutional Pathology, Bull, res. Inst. dieth. Med. Kumamoto Univ. IX. Suppl. 1. - 13. KEECH. M. K.: (1960) Electron Microscope Study of Elastase Digested Rat Aorta, Gerontologia (Basel) 4. 1. 14. KRETSCHMANN, H. J.: (1963) Fluorescens-Polarisationsmikroskopische Analyse der Ultrastruktur von elastischen Lamellen und elastischen Fasern. Z. Zellforsh. 60. 7. - 15. LAITINEN, E. A.: (1960) Über die Struktur elastischer Fasern und ihre Beziehungen zu den Kollagenfibrillen, Z. Anat. Entwickl. Gesch. 121, 388. - 16. LANSING, A. J., ROSENTHAL, F. B., ALEX. A. M. and DEMPSEY, E. W.: (1952) The Structure and Chemical Characterization of Elastic Fibres as Revealed by Elastase and by Electron Microscopy, Anat. Rec. 114, 555. - 17. MORE, R. H., BALIS, J., BENCOME, S. A., HAUST, M. D.: (1962) Electron Microscope Study of the Elastic Tissue in Human Aortas. Fed. Proc. 21/2 - 18. RHODIN, J. and DALHAMN, T.: (1955) Electron Microscopy of Collagen and Elastin in Lamina propria of the Tracheal Mucosa of Rat. Exp. Cell. Res. 9, 371. - 19. ROMHÁNYI, G.: (1955) Über die submikroskopische Struktur der elastischen Fasern. Acta morph. Acad. Sci. hung. 5, 311. - 20. ROMHÁNYI, G.: (1958) On the Submicroscopic Structure of the Elastic Fibres as Revealed by the Polarization Microsсоре. Nature (Lond.) 182, 929. — 21. Rомна́Nyi, G.: (1958) Über die submikroskopische Struktur der elastischen Fasern. Acta physiol. Acad. Sci. hung. 14. Suppl. 40. - 22. Rom-HÁNYI, G.: (1959) Histochemische Untersuchungen über die enzymatische Lösbarkeit der elastischen Fasern durch Elastase. Acta histochem. (Jepa) 8, 430. - 23. Romhányi G.: (1962) A polarisatios mikroszkópia szerepe a submikroszkópos szerkezetkutatásban. Morph. Ig. Orv. Szle (Budapest) 2/3, 161. – 24. Rомна́пул G., Kovács A.: (1962) A kollagen rostok submikroszkópos szerkezetyáltozása patkányok intracutan göbcséiben. Morph. Ig. Orv. Szle (Budapest) 2/3, 191. – 25. Romhányi, G.: (1963) Über die submikroskopische Struktur der metachromatischen Reaktion. Acta histochem. (Jena) 15, 201. - 26. SCHMIDT, W. J.: (1939) Einige Unterrichstsversuche zur Doppelbrechung. Kolloid Z. 89, 233. - 27. SCHWALBE, G.: (1877) Beiträge zur Kenntnis des elastischen Gewebes. Z. Anat. Entwickl. Gesch. 2, 236.

ÜBER DIE IM POLARISATIONSMIKROSKOP WAHRNEHMBARE SUBMIKROSKOPI-SCHE STRUKTUR DER ELASTISCHEN FASERN DES NACKENBANDES VOM RIND

G. ROMHÁNYI

Die elastischen Fasern des Nackenbandes vom Rind lassen ein charakteristisches anisotropes Dreistreifenmuster erkennen, mit zwei negativen doppelbrechenden Außenzonen und einem positiven inneren doppelbrechenden axialen Streifen, die durch zwei isotrope paramediane Streifen voneinander getrennt sind. Am Fasernquerschnitt läßt sich das optische Zeichen einer sphärischen Struktur erkennen. Die optischen Befunde legen die Vermutung nahe, daß die elastischen Fasern aus zwei mehr oder minder abgesonderten Mizellarstrukturen bestehen: einer äußeren Zone mit ringförmiger Anordnung der Mizellen, und einer axialen Zone mit länglicher Spiralstruktur. Die positive Doppelbrechung der axialen Zone überkompensiert die negative Doppelbrechung der darüberliegenden Außenzone. Auf diese Weise entstehen an den Randzonen zwischen den beiden Mizellarstrukturen zwei isotrope Streifen, die das anisotrope Dreistreifenmuster hervorbringen.

Die charakteristischen Unterschiede, die sich in der anisotropen Toluidinblau-Färbung der axialen Struktur und der Außenzone feststellen lassen, werden als das Ergebnis der Unterschiede in der Dichte der beiden Strukturen interpretiert.

In den elastischen Fasern vom Jungvieh fehlt das anisotrope Dreistreifenmuster, was auf den unentwickelten Zustand der Außenzone hinweist.

СУБМИКРОСКОПИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ЭЛАСТИЧЕСКИХ ВОЛОКОН ЗАТЫЛОЧНОЙ СВЯЗКИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В ПОЛЯРИЗАЦИОННОМ МИКРОСКОПЕ

Г. РОМХАНЬИ

Элестические волокна затылочной связки крупного рогатого скота показывают характерный трехполосатый анизотропный узор с двумя отрицательными двоякопреломляющими внешними зонами и одной положительной внутренней двоякопреломляющей

осевой полосой, которые отделены друг от 'друга двумя изотропными парамедианными полосами. На поперечном сечении волокон можно видеть оптический знак сферического строения. Оптические данные указывают на то, что эластические волокна построены из двух более или менее изолированных мицеллярных структур: одной внешней зоны с кольцеобразным расположением мицелл и одного осевого цилиндра с продолговатой спиральной структурой. Положительное двойное преломление осевого цилиндра перекомпенсирует отрицательное двоякое преломление внешней зоны. Таким образом на пограничных зонах между двумя противоположными мицеллярными структурами возникают две изотропных полосы, образующих трехполосатый анизотропный узор.

Характерные отличия в анизотропном окрашивании толуидиновой синькой осевого цилиндра и внешней зоны авторы объясняют как результат различия, наблюдаемого между внешней зоной и внутренним цилиндром в отношении густоты структуры. Эластические волокна молодняка крупного рогатого скота трехполосатого и анизо-

тропного узора не имеют, что указывает на недоразвитость внешней зоны.

Prof. Dr. György Romhányi: Pécs, Dischka Győző u. 5., Hungary

Šikl Institute of Pathological Anatomy, Charles University Medical Faculty, Plzeň, Czechoslovakia

GRANULOMATA OF THE LIVER, PROBABLY OF ALLERGIC ORIGIN

J. VANĚK,

(Received June 30, 1964)

Granulomata of the liver with central necrosis, intensive eosinophilic infiltration and Charcot-Leyden crystals have been revealed at necropsy in a girl 16 years of age and three elderly women. The late stage of the granulomata is characterized by histiocytic and fibrous encapsulation. The genesis of the lesion is ascribed to allergy. The aetiology remains unclear. Parasites have not been found.

Granulomata of the liver, characterized initially by central necrosis and massive eosinophilic infiltration, is a rare finding. It has been observed in a few instances in children up to 3 years of age. Only 3 reports of its occurrence in adults are known to us (THOMSON et al., 1937, ATMAR, 1940; DIAZ et al., 1954). The present paper deals with 4 additional cases of such granulomata of the liver.

Case reports

Case 1. This 16-year-old girl was under institutional care in a psychiatric ward for two and a half years for imbecility and genuine epilepsy. The psychomotor unrest was found difficult to treat even with large doses of barbiturates. Temporary relief was achieved by sleep therapy which was continued by rectal administration of drugs. Her condition quickly deteriorated again, and the patient died of exhaustion in a severe epileptic fit. No allergic tendencies were noted either in the past or during her confinement in the psychiatric ward. A blood count 4 months before death showed no eosinophilia.

Autopsy disclosed old and recent superficial exoriations of the skin and essentially normal appearance of the brain and other internal organs except for the liver (see below).

Case 2. A. Š., a female aged 53, suffered from untreated hypertension when she suddenly died with signs of a pontine lesion shortly after admission to the hospital, blood counts were not done.

The cause of death was haemorrhage in the right cerebellar hemisphere with perforation into the fourth ventricle and internal haematocephalus. The left heart ventricle was hypertrophic.

Case 3. A. Š., a female aged 76, has had diabetes for the last 20 years and complained of lower back pain for a number of years. During the last 3 months she experienced dizziness, vomited occasionally, and shortly before death noted pain in the epigastrium. Jaundice appeared at that time. Apparently without cause she fell into a comatose state. Blood glucose which was increased was quickly brought down to normal by adequate treatment. The urine was negative



Fig. 1. Necrotic liver cell cords in the centre of a granuloma. At the periphery, loss of hepatic cells and massive infiltration with eosinophils. Haematoxylin and eosin, $\times 110$

for acetone. The patient failed to come out of the coma and died 13 hours later. No eosinophilia was found in peripheral blood, nor were there anamnestic data suggestive of allergy.

A bile stone obstructing the common bile duct was discovered at autopsy as the cause of jaundice. There was thrombosis of the deep veins of the left leg, slight cerebral oedema, and a number of minor findings, none of which in themselves provided a satisfactory answer as to the cause of death. Diabetic coma without keto-acidosis was therefore considered.

Case 4. Ž. Š., an 86 year old woman, was admitted to a psychiatric ward for senile dementia. She was deaf, and hence it was impossible to obtain her personal history. The white blood cell count was 10 200 with 23% of eosinophils. Erythrocyte sedimentation rate was 47/83 mm.

Shortly after admission the patient died of hypostatic pneumonia. Autopsy furthermore disclosed severe generalized arteriosclerosis, angiosclerotic encephalopathy, disseminated myocardial fibrosis with hypertrophy of the left ventricle, slight hydrops, and reactivated tuberculosis of the subtracheal lymph glands.



Fig. 2. Fresh granuloma of the liver with Charcot-Leyden crystals in the necrotic centre (at left). Haematoxylin and eosin, $\times 85$

Massive accumulation of eosinophils at the periphery of a granuloma and in the sinusoids of the adjacent liver parenchyma (at right). Haematoxylin and eosin, $\times 330$

Pathological findings in the liver

The liver of all the 4 patients showed numerous, pale-grey or yellowish foci, ranging in diameter up to several millimeters, and located in the subcapsular as well as deeper regions of the organ. The centre of larger foci was slightly prominent. In Case 2 with obstructive jaundice there was, moreover, fresh thrombosis of the vena portae and its tributaries in the left lobe.

Specimens excised from the liver for histological studies numbered 20, 50, 5 und 112 for the first, second, third and fourth patient, respectively. In the Case 4 a number of paraffin blocks were cut semi-serially. All the major organs were studied in the first, second and fourth patient. The liver sections were stained with hematoxylin-eosin. This was supplemented by staining after van Gieson, Goldner, Gomori, McManus, Gram, Ziehl-Neelsen and Giemsa.

In all the 4 patients' granulomata were observed in various stages of development, including the final stage of fibrosis. The process begins as focal necrosis of the liver cells (Fig. 1), near the portal area in some regions and in the intermediate zone elsewhere. Quite often necrosis is localized asymmetrically in the



Fig. 3. Encapsulating granuloma of the liver and obliterating phlebitis of a neighbouring hepatic vein with a multinucleated cell in the loose connective tissue. Haematoxylin and eosin, $\times 175$

central zone of the lobule. The necrotic cells are finely granular and structureless, sharply demarcated at first and less so later on. The nuclei gradually lose their staining property. Some cells contain structures commonly referred to as hyaline bodies. Very rarely the necrosis is of a coagulative character, the cells exhibiting a homogeneous acidophilic cytoplasm and pycnotic nucleus. Swollen Kupffer cells are present in the sinusoids, as also a few histiocytes and neutrophile leukocytes; the latter may be seen infiltrating the cytoplasm of the necrotic liver cells. Dissolution and disappearance of cells are more pronounced along the periphery of the necrotic foci. A heavy infiltration of eosinophils soon appears along the margin of the necrotic area and even fills up the dilated adjacent sinusoids enclosed between thinned cell rows (Fig. 2). If the lesions

are near the periportal area, there is massive eosinophilic infiltration of the fibrous tissue.

The vessels and bile ducts were normal in Cases 1, 2 and 3, while in case 4 there was deposition of amyloid in the arterial walls. In this latter case a deposition of proteinaceous material in the wall of one hepatic arteriole and its immediate neighbourhood may be seen in the periportal tract which is



Fig. 4. Cicatrizing granuloma of the liver with many multinucleated cells. Goldner's stain, $\times 340$



Fig. 5. A single multinucleated cell and sparsely dispersed red blood cells in the loose cont nective tissue in a healed granuloma of the liver; passive hyperaemia of the adjacenparenchyma was due to thrombosis of branches of hepatic veins. Goldner's stain, × 340

heavily infiltrated with eosinophils. In some areas there is eosinophilic infiltration of the smaller-sized hepatic veins in the vicinity of the lesions; the intima of one of these veins is covered by a rim of eosinophils.

The eosinophils infiltrate the necrotic foci and then disintegrate (Fig. 2). The liver cells are no longer discernible and in the centre of a few of the larger granulomata there are shadow-like remnants of the liver cords and karyorrhectic nuclei of eosinophils. In the reticular stromal network at the periphery of necrosis, sparsely dispersed histiocytes and multinucleated cells of various shapes make their appearance between the eosinophils, and give rise to sparse, fine collagen fibrils (Fig. 3).

In a later stage the centre of the granulomata is composed of an acidophilic granular debris surrounded by a rim of histiocytes and variable numbers of multinucleated cells (Fig. 4). The collagen fibrils are somewhat more dense in the peripheral areas and contain fibroblasts, some eosinophils, lymphocytes, and a few plasma cells. The granulomata are sharply delineated from the



Fig. 6. Centrozonally localized fresh granuloma; the reticular pattern of the central vein and of liver cell cords is well preserved. Gomori's stain, $\times 200$

liver tissue; the foci have a round or ovoid shape with scanty capillaries present only along the periphery of the granuloma.

With degeneration of the eosinophils, Charcot-Leyden crystals appear; they are especially numerous in some of the granulomata (Fig. 2), in the central necrosis as well in the rim of histiocytes, where they are occasionally phagocyted. Small and sparse Charcot-Leyden crystals are found also outside the necrotic area, in the eosinophilic infiltrate at the periphery of the foci and in the periportal area.

The final stage is a small round or ovoid scar containing loose connective tissue, a few capillaries, some multinuclear cells and a few lymphocytes (Fig. 5), and occasionally small Charcot-Leyden crystals in the fibrous tissue.

Reticulum staining reveals in the central necrosis of the granuloma a clearly discernible preserved stroma of the original parenchyma, with an architecture typical of hepatic sinusoids or central veins (Fig. 6). At the periphery of the granuloma the reticulum shows the structure of newly-formed connective tissue. In some of the larger granulomata the reticular network is disintegrated and only occasional traces of it persist.

In Case 3, recent thrombosis of the hepatic veins was present with consequential hyperaemia. In Cases 3 and 4 there was, in addition, recanalisation of the smaller branches of the hepatic vein (Fig. 3), sometimes with eosinophilic infiltration of the loose connective tissue. In these granulomata which were present in the liver only and in no other organ studied, neither microbes nor parasites or their eggs were to be found.

Discussion

Granulomata of the liver such as those observed in our 4 cases were first reported in an adult by THOMSON, WILSON and MCDONALD in 1937. The two other cases were reported by ATMAR in 1940 and DIAZ et al. in 1954. In all three instances the reports were based on biopsy studies which were undertaken in 2 patients for a vague clinical picture accompanied by marked eosinophilia and hepatomegaly; in the third patient, clinically diagnosed for familiar eosinophilia, a liver excision was undertaken during operation for umbilical hernia and uterine fixation (ATMAR, 1940). Granulomata with eosinophilic infiltration in liver biopsy of a child were first described by PERLINGIERO and GYÖRGY in 1947. To date, the only case of such granulomata in a child which was verified at autopsy was that of ZUELZER and APT in 1942. The child died of serum hepatitis. In 1949 ZUELZER and APT reported 3 other cases verified by biopsy and 4 cases studied clinically. Subsequently, there have been detailed reports about children from 18 months to three and a half year of age (J. Pediat. Clinical conference, 1951; DENT et al., 1956; BRUTON and JAFFURS, 1957; J. Pediat.-clinico-pathological conference, 1959). From this' short review of the literature it is apparent that this peculiar type of granuloma of the liver is a rare finding, especially in adults, and that the lesion is not fatal, provided the patients do not succumb to unrelated complications, as was the case in our 4 patients. LÖFFLER's eosinophilic infiltration of the lung, in which granulomatous foci have also been reported, has a similar clinical course (v. MEYENBURG, 1942; BAYLEY et al., 1945).

The genesis of hepatic granulomata with eosinophilic infiltration is generally ascribed to allergy. This concept is supported in many patients by the occurrence of hypersensitivity such as asthmatic attacks, urticaria, angioneurotic oedema, purpura, oedema of the joints, fleeting infiltrations of

the lungs, marked eosinophilia and hyperglobulinaemia. In our patients there was no anamnestic or clinical evidence of allergy, and in only one case was there eosinophilia, but the morphological findings in all our cases were identical to those reported in the literature.

In cases displaying eosinophilia one generally thinks of parasites. Granulomata of the liver and eosinophilia were first reported in 1947 by PERLINGIERO and GYÖRGY in connection with ascaridiasis. Their two-year old patient had repeatedly negative stools, but the ascaridiasis skin test was markedly positive. In the course of observation the patient vomited a full-grown male Ascaris lumbricoides. MERCER et al. (1950) were the first to report this nematode directly in hepatic granuloma. Aside from Ascaris (DA SILVA, HORTA and DELFIM, 1952) identical granulomata of the liver and other organs are caused by Toxocara canis and Toxocara cati (BIAVER et al., 1952; DENT et al., 1956), Microfilaria (WEBB et al., 1960), Fasciola hepatica (HABERICH, 1961) or undeterminable larvae (J. Pediat.-clinico-pathological conference, 1959). The pathogenesis of the liver granulomata, in which larvae of parasites have been demonstrated, is not difficult to reconstruct. The granulomata represent the passage of the migrating larva. A state of hypersensitivity develops in the continued presence of the parasite or on repeated re-infection. The liver parenchyma in the area of the larval passage undergoes destruction, and cosinophils accumulate in the resulting space. The eosinophils then disintegrate and are surrounded by an encapsulating reaction of histiocytes and giant cells.

In all adults and in some of the children careful clinical, laboratory and morphological studies have failed to reveal parasites as the cause of the hepatic granulomata. The possibilities of various allergens such as bacterial, drug, and others, have been considered. In our patients a direct statement as to the actiology cannot be made. The following points, however, appear to speak against a parasitic origin of the lesion. Nematodes or other parasites in the intestines and biliary tract were not found in spite of careful search which was undertaken in view of the unusual gross appearance of the liver. Several hundred granulomata were studied histologically with particular regard as to the presence of parasites, and none were found. Even though it is conceivable that the migrating larvae quickly dissolved and their demonstration is successful only in serial sections of the material, the possibility of a parasitic aetiology appears to be ruled out by the fact that no parasites could be discovered in a large number of fresh lesions in which there were still necrotic remnants of the liver cells. The morphological development of the granulomata, as we have been able to follow it also speaks against a parasitic origin. The process begins as a focal necrosis of the liver cells, in and around which eosinophils appear. Soon the lesion is encapsulated by histiocytes and multinuclear cells. The central necrosis is either absorbed or persists, and along its edge a rim of newly-

formed connective tissue develops. In the early and often also in the late stages the original reticulum network of the liver cords, sometimes their shadow-like remnants and rarely the collagen of the central veins are well-preserved. This finding appears to indicate that the early lesion is not a larval passage in the surroundings of which tissue destruction ensues upon migration of the larva.

Our pathogenetic interpretation of the liver granulomata with eosinophilic infiltration differs from that of ZUELZER and APT (1949), according to whom the process affects primarily the connective tissue of the periportal tract, and secondarily eventually the parenchyma. Liver biopsy reports do not deal with the morphogenesis of the granuloma and do not mention eosinophilic infiltration of the hepatic veins or recanalisation, as we have observed at necropsies.

The role of larvae is beyond question in the aetiology of granulomata with eosinophilic infiltration, but a parasitic aetiology is not the only possibility. Focal necrosis of the liver with eosinophilic infiltration has been described by FINGERLAND (1937) in neoarsphenamine allergy, and similar granulomata of the liver have been reported by BEDNÁŘ (1942) in allergy to sulphonamides. We have observed identical lesions in patients sensitive to sulphomethoxypyridazine, where the granulomata were mainly in the periportal areas and the walls of the hepatic veins, as well as in the liver parenchyma itself.

An analysis of our cases has allowed a reconstruction of the morphological development of the liver granulomata. The specific cause remains to be solved and while we believe that it was not parasitic in our cases, the possibility of an autoallergic origin could be taken in consideration. The granulomatous lesions were only revealed post mortem and in the absence of clinical symptoms, special laboratory investigations had not been carried out. The hypothesis of an autoallergic pathogenesis of liver lesions has met with much criticism and the morphologic pattern of granulomatous lesions with eosinophilic infiltration differs both experimentally and clinically from the lesions probably due to autoallergy (POPPER, PAROUETTO, RUBIN, 1962). As the morphology of autoallergic hepatic lesions is not exactly known, the possibility cannot be ruled out that granulomata of the liver represent a peculiar form of this mechanism.

The author is indebted to Docent Dr. Č. Dvořáček, Department of Pathology, Moravská Ostrava, and Dr. V. Holý, Department of Pathology, Dobřany, for permission to use Case 1 and Case 4, respectively.

REFERENCES

^{1.} ATMAR, R. C.: (1940) J. Amer. med. Ass., 115., 449. – 2. BAYLEY, E. C., LINDBERG, D. O. BAGGENSTOSS, A. H. (1945) Arch. Path. 40, 376. – 3. BEAVER, P. C., SNYDER, C. H., CARRERA, G. M., DEUT, S. H., LAFFERTY, J. W.: (1952) Pediatrics, 9, 7. – 4. BEDNÁŘ, B.: (1952) Čas. Lék. čes. 91, 286. – 5. BRUTON, O. C., JAFFURS, W. J.: (1957) U. S. armed Forces med. J., 8, 1022. – 6. DEUT, J. H., NICHOLS, R. L., BEAVER, P. C., CARRERA, G. M., STAGGERS, R. J.:

J. VANĚK

(1956) Amer. J. Path. 32, 777. – 7. DIAZ, C. J., PLEGUEZUELO, M. M., GARCIA, E. L., Y F. ARRIETA, J.P.: (1954) Rev. clin. espaň., 53, 33. – 8. FINGERLAND, A.: (1937) Čas. Lék. čes., 76, 359. – 9. HABERICH.: (1961) Zbl. Path., 102, 573. – J. PEDIAT. Clinical Conference: (1951) J. Pediat. 38, 635. J. PEDIAT. CLINICAL FATHOLOGICAL CONFERENCE: (1959) J. Pediat. 54. 707. – 10. MERCER, R. D., LUND, H. Z., BLOOMFIELD, R. A., CALDWELL, F. E.: (1950) Amer. J. Dis. Child., 80, 46. – 11. v. MEYENBURG, H.: (1942) Virchows Arch. path. Anat. 309, 258. – 12. PERLINGIERO, G. J., GYÖRGY, P.: (1947) Amer. J. Dis. Child. 73, 34. – 13. POPPER, H., PAROUETTO, F., RUBIN, E.: (1962) G. Thieme Verlag, Stuttgart. – 14. DA SILVA HORTA, J., DELFIM, J.: (1952) Gaz. méd. portug. 5, 581. – 15. THOMSON, A. P., WILSON, G. H., MCDONAD, S.: (1937) Lancet, 2, 9. – 16. WEBB, J. K., JOB, C. K., GAULT, E. W.: (1960) Lancet, 1, 835. – 17. ZUELZER, W. W., APT, L.: (1949) Amer. J. Dis. Child., 78, 153.

LEBERGRANULOME ALLERGISCHEN URSPRUNGS

J. VANĚK

Anläßlich der Nekropsie eines 16 jährigen Mädchens und dreier älterer Frauen wurden in der Leber Granulome mit zentraler Nekrose, intensiver eosinophiler Infiltration und Charcot-Leydensche Kristalle beobachtet. Die Spätphase der Granulome ist durch histiozytäre und fibröse Abkapselung gekennzeichnet. In der Genese der Schädigung wird der Allergie eine Rolle zugeschrieben. Die Ätiologie konnte nicht geklärt werden. Parasiten wurden nicht gefunden.

ПЕЧЕНОЧНЫЕ ГРАНУЛОМЫ, ПРЕДПОЛОЖИТЕЛЬНО АЛЛЕРГИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Й. ВАНЕК

При вскрытии трупов 16-летней девушки и трех пожилых женщин были обнаружены грануломы печени с центральным некрозом, интенсивной эозинофильной инфильтрацией и кристаллами Шаркот— Лейдена. Для поздней фазы гранулом характерно гистиоцитарное и фиброзное инкапсулирование. В генезе повреждения автор предполагает аллергию. Этиология изменения еще невыяснена. Паразитов обнаружено не было.

Prof. Dr. J. VANĚK: Plzeň, Marxova 13, ČSSR

MTA Kösyvtára Periodika 562919 65

RECENSIO

G. KISZELY, Z. PÓSALAKY:

Mikrotechnische und histologische Untersuchungsmethoden

Microtechnical and histochemical methods of investigation in German. Publishing House of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest 1964. 711 pages, 140 microphotographs, some of them coloured, 52 tables.

The microtechnical and histochemical methods of assay are described and a critical analysis of their application and value is given in this text-book; the procedures, the problems arising in connection with them and their solutions are presented and even the less important aspects are treated in detail.

In the first part the preparative histological microtechniques and the staining methods of proven practical value are dealt with. The subject matter, from the preparation of the specimens for study to the evalution of the stained preparation, is presented in such a way in the different chapters that the reader gets detailed information about all the pertinent questions. The underlying factors of the staining effects of the various tissue elements are explained and the physico-chemical processes involved are discussed in detail and an up-to-date fashion, dissipating the unfortunately still occurring view of "färberische Mystik". Beside the procedures used for staining cells and tissues the impregnation techniques (neurofibril, glia, etc.), the special components of tissues and cells (fibrin, hyalin, etc.) and their still unclarified fundamental principles are also discussed.

Part two is concerned with the theoretical and practical aspects of the histochemical methods. The special preparatory methods required by the different procedures are described in detail, discussing the latest techniques (cryostat, freeze-drying, etc.) and their field of application. The histochemical reactions of proteins, nucleoproteins, carbohydrates, lipids, lipoproteins and enzymes are dealt with according to the biochemical classifications within the subgroups. The histochemistry of pigments and of certain inorganic cell components (calcium, iron etc.) is discussed in brief.

The authors emphasize that the efficacy of the histochemical methods and the evaluability of the results depend upon a thorough knowledge of the microtechnical methods, on the one hand, and, on the other, upon chemical and biochemical knowledge. To make it easier for the reader to obtain or recapitulate such information, every description of the methods is preceded by a detailed discussion of the bio- and physicochemistry of the components involved in the reaction and of the process of the reaction (e. g. substrates, enzyme-substrate linkages).

In the part dealing with methods, the procedures of confirmed value, and their evaluability are dealt with, and on the basis of the authors own experience and the data in the literature attention is called to the methods which have proved the most reliable and the best. The eventual sources of error are pointed out, and suggestions are made as to how to eliminate them (pH, temperature, concentration etc.). This makes it possible to carry out the histochemical reactions properly and successfully.

Problems and theoretical principles of the quantitative histochemical methods are described in a separate chapter.

Both parts are adequately supplemented by ample bibliographies.

The electron microscopic, polarisation and fluorescence optical procedures not falling into the scope of the work are described in brief, mainly in connection with the pertaining methodological and histochemical problems.

Tol Jani

Printed in Hungary

A kiadásért felel az Akadémiai Kiadó igazgatója Műszaki szerkesztő: Farkas Sándor ∡kézirat nyomdába érkezett: 1965. VI. 10. — Terjedelem: 12,25 (A/5) ív, 116 ábra (25 színes), 9 melléklet

65.60937 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 "Kultúra" 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 destinés 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 «Kultúra» (Budapest I., Fő utca 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 «Kultúra» (Budapest I., Fő utca 32. Текущий счет № 43-790-057-181) или его заграничные представительства и уполномоченные.

INDEX

Morphologia Normalis et Experimentalis

Földes, IZs. Nagy, IBenkő, KLévai, GAry-Balogh, P.: Elektronenmikro- skopische Untersuchungen am postembryonalen Epiphysenknorpel der Albino- ratte	283
Jobst, K.: Quantitative Cytophotometric Determination of Nuclear Proteins after Alky- lation	301
Somogyi, ERózsa, GSótonyi, P.: Histochemische und fluoreszenzoptische Unter- suchungen der Strommarke	311
Faller, JUngváry, G.: Correlation between Portobiliary and Venous Lobes and the Shape of the Liver	317
Jonek, JOlkowski, Z.: Dihydronicotinamide-adenine Dinucleotide (NADH ₂) Diapho- rase, Thiamine Pyrophosphatase and Acid Phosphatase in the Spinal Cords of Rabbits with Chronic Manganese Poisoning	329
Vajda, JTömböl, T.: Die Lymphgefäßstruktur der Dünndarmwand	339
Vajda, JTömböl, T.: Beiträge zum mesenterialen Lymphkreislauf	349
Hackensellner, H. ATöpelmann, I.: Das Flächenbild des Endothels der doppelt ligier- ten Arteria carotis des Kaninchens	359
Sas, JGrino, EBenedetti, W. LAppeltauer, L. CDominguez, R.: Adenohypophy- sis and Brain Stem. Basophilia and "Castration Cells" in the Adenohypophysis of the Male Rat Bearing Brain Stem Lesions	377
Banga, ILoeven, W. ARomhányi, Gy.: Histochemical Studies of Elastic Fibres by the Use of Elastolytic Enzymes Separated by Chromatography on DEAE-Se- phadex Column	385
Romhányi, Gy.: On the Submicroscopic Structure of the Elastic Fibres of the Bovine Ligamentum Nuchae as Revealed by the Polarization Microscope	397

Pathologia

Vanek, J.:	Granulomata	of the Liver.	, Probably of Allergic	Origin	411
Recensio					421

Index: 26.017