

ON THE ELECTRON MICROSCOPY OF MEMBRANE STRUCTURES OF CELLS

I. B. TOKIN

(Received July 3, 1960)

In the early years of fine structure studies with the aid of the electron microscope the existence of clearly defined cell surface membranes were convincingly demonstrated (SJÖSTRAND & RHODIN, 1953; RHODIN, 1954 etc.). These structures were rarely analysed; in those years the authors mentioned only their presence and only in some instances did they refer to their thickness. The ultrastructure of these membranes was completely neglected, mainly owing to technical difficulties. To reveal the structural details, very thin sections are needed which must be cut exactly perpendicular to the membrane.

ZETTERQVIST (1956) was one of the first to study the intimate ultrastructure of cell membranes. He demonstrated a three-layered structure in the plasma membrane covering the apical free surface of epithelial cells in the mouse intestine. Somewhat later similar structures were found also in other cells, e. g. the nerve tissue of mammals (ROBERTSON, 1957, 1958; SCHMIDT & GESCHWIND, 1957), germ-cells (ROTHSCHILD, 1958), helminths (TOKIN, 1959) and bacteria (KELLENBERGER & RYTER, 1958; TOKUYASU & YAMADA, 1959).

The present paper summarises the results of our electron microscopic studies in the years 1958 and 1959 concerning the ultrastructure of different protoplasmic membranes in the somatic and germ-cells of *Parascaris equorum* GOEZE.

Material and methods

Small pieces of ascaris testis, ovary and intestine were fixed in 1 per cent osmic acid (PALADE, 1952), dehydrated in butanol, infiltrated and embedded in a 4:1 mixture of butyl and methyl methacrylate (NEWMAN, BORYSKO & SWERDLOW, 1949; BORYSKO, 1956). Butanol gives superior results in embedding without the use of strong organic solvents. Thin sections were cut with glass knives on a SJÖSTRAND (1953) ultramicrotome and examined with an UEM-100 (УЭМ-100) electron microscope using a 60 kV beam.

Cell membranes

The cell membranes of the intestinal cells were found to be three-layered over all regions of the cells and not only over the free surface and the desmosomal region. The membrane is composed of two external, electron dense

(osmiophilic) layer and an internal, less dense one (Figs. 1 and 2). The germ-cells in different stages of development have surface membranes similar in structure. It is difficult to demonstrate this structure in the cell membranes of germ-cells, owing to their uneven borders. Statistical elaboration of the measurement data showed some variation in the thickness of the intestinal cell membrane. The thickness was found to be $70 \pm 4 \text{ \AA}$ in the apical, $187 \pm 8 \text{ \AA}$ in the desmosomal, and $74 \pm 5 \text{ \AA}$ in the basal region. The thickness of the germ-cell membrane changes during the development of the gametes; in the course of spermiogenesis this value increases from $82 \pm 4 \text{ \AA}$ (spermatogonia) to $97 \pm 8 \text{ \AA}$ (spermatids).

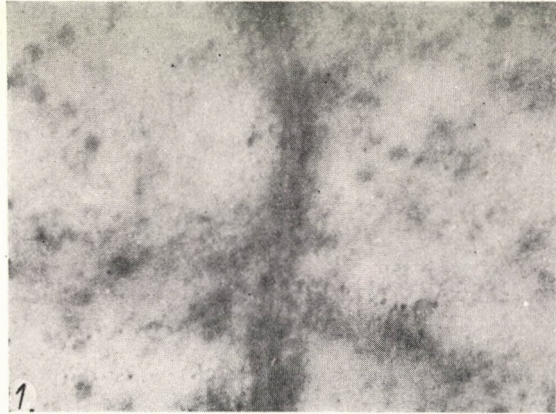


Fig. 1. Lateral surface membranes of ascaris intestinal cells. "Desmosomal" region. $\times 110\,000$

On sections of all studied cells, cut exactly perpendicular through the membrane, it was very conspicuous that the membranes retain their individuality and never coalesce however close they are to one another. Highly characteristic minimal cell distances could be established amounting to 55—94 \AA in the intestinal epithelium, to 66 \AA between the spermatogonia, and 82 \AA between the oogonia. This consistency of the intracellular spaces points to an active relationship of the individual cells and gives no support to their being conceived as passive, purely mechanical structures.

The chemical composition of the cell membranes is still far from being completely elucidated. All authors agree, however, that they contain phospholipids and proteins, in full agreement with the view of the biochemists and physiologists (*e. g.* DANIELLI, 1935, 1936; HÖBER, 1945; PARPART & DZIEMIAN, 1940) who accept the classical membrane theory of permeability, dating back to the end of the last century (PFEFFER, 1877; DE VRIES, 1884, etc.).

The general physico-chemical processes during fixation and dehydration have not been sufficiently studied. Even less is known about the interaction



Fig. 2. The same as in Fig. 1. Area below the "desmosomal" region. $\times 140\ 000$

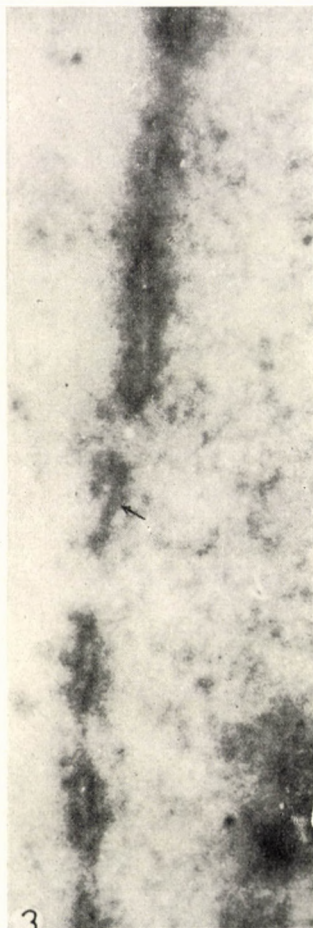


Fig. 3. Nuclear envelope membranes in ascaris intestinal cell. $\times 140\ 000$

of osmic acid with different cytoplasmic structures, and of the effect of potassium permanganate fixation, which has lately become widely used, we know the least. Owing to the scarcity of such facts several hypotheses have been proposed explaining differently the exact topochemistry of the cell membranes. Several authors (ROBERTSON, 1957, 1958; SCHMIDT & GESCHWIND, 1957, SJÖSTRAND, 1956) identify the electron dense layers with the proteins and the light layer with the lipids.

MERRIAM (1958), however, assumes that osmic acid is bound by the membrane phospholipids. Cell membrane models were constructed exclusively of protein free phospholipids. The electron microscopic study of such models gave a decisive support to the latter view (REVEL, ITO & FAWCETT, 1958).

The presence of proteins (together with phospholipids) in the osmiophile layer of genuine cell membranes cannot, however, be ruled out. In this connection the work of STOECKENIUS (1959) is of considerable interest, who studied ultra-thin sections of myeline formations from brain phospholipids with and without added protein (globin).

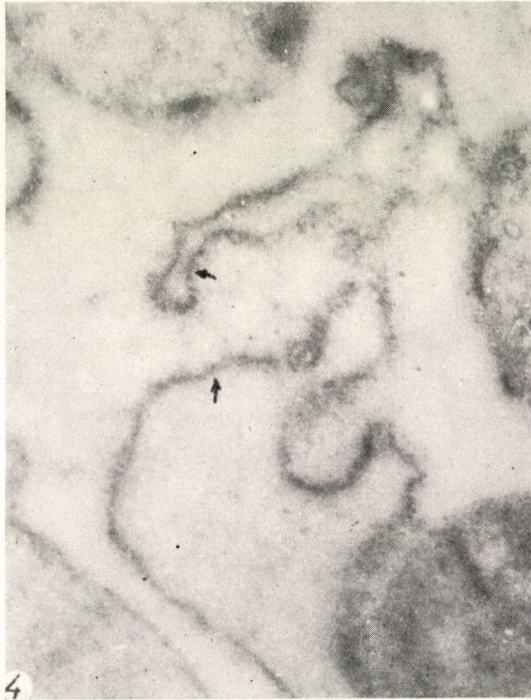


Fig. 4. Walls of the Porter-Palade elements in ascaris intestinal cell. $\times 53\ 000$

Nuclear envelope membranes

In different parts of the external and internal membranes constituting the nuclear envelope of interkinetic nuclei a substructure of three layers can be shown (Fig. 3). The outer layers are osmiophilic and the inner one is less dense, as in the case of cell membranes.

Membranes of the Porter-Palade complex*

In the year 1958 we succeeded in demonstrating the three layers composing the membrane of the ergastoplasmic structures in ascaris ovocytes. Later

*The Porter-Palade complex (a name proposed by the author in 1959) or ergastoplasmic complex is composed of the individual structures described earlier as „endoplasmic reticulum”, „ergastoplasm”, „*a*-cytomembranes”, etc. The proposed name, according to our

studies have shown this structure (Fig. 5) of the Porter-Palade complexes in the ascaris intestinal cells (Fig. 4) and germ-cells in different developmental stages. The ribonucleoprotein granules adhere to the outer layer of the membrane. Similar micrographs showing the three-layered wall of the ergastoplasm units have been published by several authors (BRADBURY & MEEK, 1958, SCHOENBERG, 1958) but remained undescribed. It is a noteworthy fact that parallel adjacent canalicular (= lamellar) components of the ergastoplasm have their limiting membranes in a fixed distance (SJÖSTRAND, 1955; EPSTEIN, 1957 etc.). The fact may point to a definite (molecular?) interaction between the membranes.

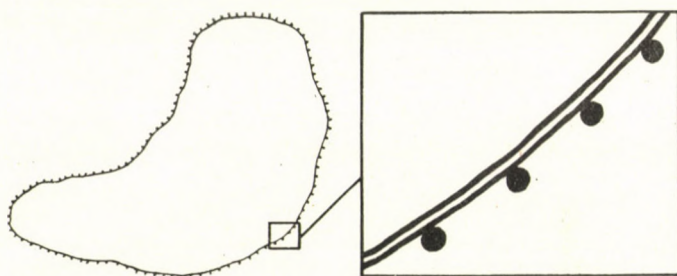


Fig. 5. Schematic drawing of the structure of the wall of the Porter-Palade elements

Membranes limiting the elements of the Golgi complex

The thickness of the membranes is similar (82 Å) both in different parts of the same Golgi complex and in different cells of the ascaris (Fig. 6). The membranes have three layers. The distance between individual Golgi canalicules depends on their arrangement but has a minimal value of 152 Å.

Our data are in good agreement with the recent views concerning the intimate relationship between nuclear and ergastoplasmic membranes (PALADE, 1955; WATSON, 1955; EPSTEIN, 1957). A similar relationship has been shown to exist between the ergastoplasmic and cell surface membranes (PALADE, 1956; HAY, 1958). The continuity of the agranular and endoplasmic reticulum has been firmly established (PALADE & SIEKEWITZ, 1956). Many authors point to the agranular reticulum and the Golgi complex membranes (PALADE & SIEKEWITZ, 1956; SAGER & PALADE, 1957 etc.) having a similar ultrastructure.

Dealing with the structure of protoplasmic membranes one must not leave unconsidered the three-layered wall of mitochondria (FREEMAN, 1956).

view, corresponds fairly to their structural diversity, and at the same time stresses their unquestionable role in the synthetic processes and points to their physiological and morphological interdependence. It also refers to the fundamental contributions by PORTER and PALADE to the formation of recent views on the structure and function of the ergastoplasmic particles

The morphological studies by means of the electron microscope thus reveal the universality of a three-layered structure of the different protoplasmic membranes. Their having a common chemical composition is likewise highly probable. The elucidation of the molecular architectonics of the membranes is hoped to lead to clearer concept of the physiological significance of the phenomenon discussed in this paper.

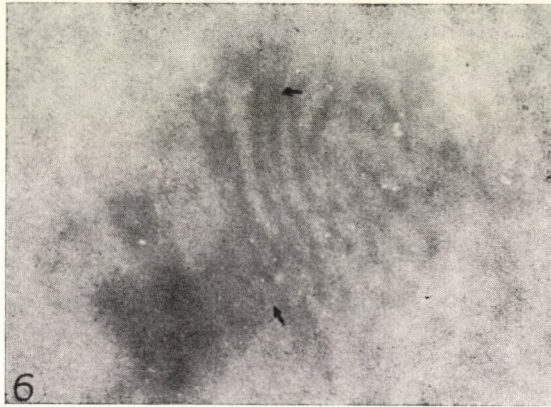


Fig. 6. Walls of the Golgi elements in ascaris intestinal cell. $\times 140\ 000$

Summary

An electron microscopical study of different membranes (cell membrane, nuclear envelope, walls of the Golgi and Porter-Palade complexes) in the somatic and germ-cells of *Parascaris equorum* GOEZE has been performed. All studied membranes were found to be composed of three layers.

In all cells they have a similar ultrastructure. The two external layers are electron dense (osmiophile), the internal one is lighter. The results obtained have been discussed with regard to the recent views on the chemical composition of cell membranes.

REFERENCES

1. BORYSKO, E. (1956): Recent developments in methacrylate embedding. I. A study of the polymerization damage phenomenon by phase contrast microscopy. *J. Biophys. a. Biochem. Cytol.* 2 (Suppl.) 3-14. — 2. BRADBURY, S.—MEEK, G. A. (1958): The fine structure of the adipose cell of the leech of *Glossosiphonia complanata*. *J. Biophys. a. Biochem. Cytol.* 4, 603-608. — 3. DANIELLI, J. (1935): The thickness of the wall of the red blood corpuscle. *J. Gen. Physiol.* 19, 19-22. — 4. DANIELLI, J. (1936): Some properties of lipid films in relation to the structure of the plasma membrane. *J. Cell Comp. Physiol.* 7, 393-408. — 5. VRIES, H. DE (1884): Eine Methode zur Analyse der Turgorkraft. *Jahrb. wiss. Bot.* 14, 427-601. — 6. EPSTEIN, M. A. (1957): The fine structure of the cells in mouse sarcoma 37 ascitic fluids. *J. Biophys. a. Biochem. Cytol.* 3, 567-576. — 7. FREEMAN, J. A. (1956): The ultrastructure of the double membrane systems of mitochondria. *J. Biophys. a. Biochem. Cytol.* 2, 37-48.

chem. Cytol. 2 (Suppl.) 353—354. — 8. HAY, E. D. (1958): The fine structure of blastema cells and differentiating cartilage cells in regenerating limbs of *Amblystoma* larvae. *J. Biophys. a. Biochem. Cytol.* 4, 583—592. — 9. HÖBER, R. (1945): Physical chemistry of cells and plasmic membrane of *Escherichia coli*. *J. Biophys. a. Biochem. Cytol.* 4, 323—326. — 11. MERRIAM, R. W. (1958): The contribution of lower oxides of osmium to the density of biological specimens in electron microscopy. *J. Biophys. a. Biochem. Cytol.* 4, 579—582. — tissues, Philadelphia. — 10. KELLENBERGER, E.—RYTER, A. (1958): Cell wall and cyto-12. NEWMAN, S. B.—BORYSKO, E.—SWERDLOW, M. (1949): New sectioning techniques for light and electron microscopy. *Science*, 110, 66—68. — 13. PALADE, G. E. (1952): A study of fixation for electron microscopy. *J. Exp. Med.* 95, 285—298. — 14. PALADE, G. E. (1955): A small particulate component of the cytoplasm. *J. Biophys. a. Biochem. Cytol.* 1, 59—68. — 15. PALADE, G. E. (1956): The endoplasmic reticulum. *J. Biophys. a. Biochem. Cytol.* 2 (Suppl.) 85—98. — 16. PALADE, G. E.—SIEKEVITZ, P. (1956): Liver microsomes. *J. Biophys. a. Biochem. Cytol.* 2, 171—200. — 17. PARPART, A.—DZIEMIAN, A. (1940): The chemical composition of the red cell membrane. *Cold Sp. H. Symp. Q. Biol.* 8, 17—22. — 18. PFEFFER, W. (1887): *Osmotische Untersuchungen*. Leipzig. — 19. REVEL, J. R.—ITO, S.—FAWCETT, D. W. (1958): Electron micrographs of myelin figures of phospholipide simulating intracellular membranes. *J. Biophys. a. Biochem. Cytol.* 4, 495—498. — 20. RHODIN, J. (1954): Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changes proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney. Thesis: Stockholm. — 21. ROBERTSON, J. D. (1957): Some aspects of the ultrastructure of double membranes. *Ultrastructure and Cellular Chemistry of Neural Tissue* (H. Waelsch-editor), New York, Paul Hacker. — 22. ROBERTSON, J. D. (1958): Structural alterations in nerve fibers produced by hypotonic and hypertonic solutions. *J. Biophys. a. Biochem. Cytol.* 4, 349—364. — 23. ROTSCHILD, L. (1958): The surface of the sea urchin egg. *Quart. J. Microsc. Sci.* 99, 1—3. — 24. SAGER, R.—PALADE, G. E. (1957): Structure and development of the chloroplast in *Chlamydomonas*. I. The normal green cell. *J. Biophys. a. Biochem. Cytol.* 3, 463—488. — 25. SCHMIDT, F. O.—GESCHWIND, N. (1957): The axon surface. *Progress in Biophysics and Biophysical Chemistry* (J. A. Butter a. B. Katz, editors), New York, Pergamon Press 8. — 26. SHOENBERG, C. F. (1958): An electron microscope study of smooth in pregnant uterus of the rabbit. *J. Biophys. a. Biochem. Cytol.* 4, 609—614. — 27. SJÖSTRAND, F. S. (1953): A new microtome for ultrathin sectioning for high resolution electron microscopy. *Experientia* (Basel), 114. — 28. SJÖSTRAND, F. S. (1955): The ultrastructure of the ground substance of the cytoplasm. *Symp. VIIIth Congr. Cell. Biol.*, Leiden 1954; Ser. B. 21, 222—228. — 29. SJÖSTRAND, F. S. (1956): The ultrastructure of cells as revealed by the electron microscope, *International Reviews of Cytology* (G. H. Bourne and J. E. Danielli, editors), New York, Academic Press, Inc. — 30. SJÖSTRAND, F. S.—RHODIN, J. (1953): The ultrastructure of the proximal convoluted tubules of the mouse kidney as revealed by high resolution electron microscopy. *Exp. Cell Res.* 4, 426—456. — 31. STÖCKENIUS, W. (1959): An electron microscope study of myelin figures. *J. Biophys. a. Biochem. Cytol.* 5, 491—500. — 32. ТОКИН, И. Б.: (1958) Ультраструктура протоплазмы ооцитов *Parascaris equorum*. *Архив Анатомии, Гистологии и Эмбриологии*, 35 (2) 79—87. — 33. ТОКИН, И. Б.: (1959) Электронно-микроскопические исследования половых и соматических клеток *Parascaris equorum*. Thesis, Moscow. — 34. TOKUYASU, K.—YAMADA, E. (1959): The fine structure of *Bacillus subtilis*. I. Fixation. *J. Biophys. a. Biochem. Cytol.* 5, 123—128. — 35. ZETTERQVIST, H. (1956): The ultrastructural organization of the columnar absorbing cells of the mouse jejunum. Thesis, Stockholm.

О ТОНКОМ СТРОЕНИИ МЕМБРАННЫХ ОБРАЗОВАНИЙ КЛЕТКИ

И. Б. ТОКИН

Проводились электронно-микроскопические исследования строения мембранных образований половых и соматических клеток *Parascaris equorum* GOEZE (клеточные и ядерные мембраны; стенки компонентов комплексов Гольджи и Портера—Паладе). Обнаружено, что все эти различные мембранные образования являются трехслойными.

Во всех изучавшихся клетках они имеют весьма сходную субмикроскопическую структуру и состоят из наружных осмиофильных и внутренних электронно-оптически менее плотных слоев. Полученные данные сопоставляются с современными представлениями о химическом строении клеточных мембран.

ÜBER DIE ELEKTRONENMIKROSKOPIE DER MEMBRANEN DER ZELLE

I. B. TOKIN

Elektronenmikroskopische Untersuchungen des Aufbaus von Membranen der Keim- und somatischen Zellen des *Parascaris equorum* GOEZE wurden durchgeführt (Zellen- und Kernmembranen: die Wände der Komponenten des Golgi und Porter-Palade-Komplexes). Es wurde festgestellt, daß alle diese Membranbildungen dreischichtig sind.

In allen untersuchten Zellen weisen sie eine vollkommen ähnliche submikroskopische Struktur auf, und sie bestehen aus äußeren osmiophilen und inneren, elektronenoptisch weniger dichten Schichten. Die Befunde werden mit den gegenwärtigen Vorstellungen über die chemische Struktur der Zellmembranen verglichen.

И. Б. Токин, Ленинград В. О. Менделеевская 5, СССР

TRANSSEKTIONSEXPERIMENTE AM 12-SOMITEN HÜHNEREMBRYO

B. MENKES

(Eingegangen am 12. Juli, 1960)

Während der embryonalen Entwicklung bilden sich zwischen den Teilen des Embryokörpers verschiedenartige Beziehungen aus, mit denen der Entwicklungsvorgang selbst, insofern er ein epigenetisches Phänomen ist, innig verbunden ist. Diese Beziehungen entstehen und werden aufrechterhalten teilweise durch humorale Faktoren auf dem Wege der Diffusion und des Blutkreislaufes, teilweise durch direkten Kontakt. Eine bedeutende morphologische Rolle spielen hier auch Wanderungen von Zellkomplexen, Verschiebungen, Auswachsen embryonaler Organe mit Einwanderung in — von ihrem Ursprungsort entfernte — Gebiete, Vorwachsen von Nervenstämmen, Kanälen usw. Eine der Methoden, die in der experimentellen Embryologie zur Analyse dieser verwickelten Vorgänge benützt wird, ist die Transsektion der gesamten Embryonalanlage in verschiedenen Höhen. Solche Transsektionsversuche wurden am Hühnerembryo von WETZEL, WADDINGTON, WOLFF, LUTZ, SPRATT und noch einer Reihe von anderen Autoren in ovo oder an explantierten Keimscheiben, die auf besonderen Kulturmedien wachsen, zwecks Analyse der längs der axialen Organanlagen vorhandenen Entwicklungspotenzen in den verschiedensten Varianten durchgeführt. Es handelt sich bei der Mehrzahl der zitierten Arbeiten um transversale oder schräge Durchschneidungen (totale oder partielle) an jungen, sogar unbebrüteten Keimscheiben, und solchen des ersten Entwicklungstages. Meistens wurde die Operation im Stadium der vollausgebildeten Primitivlinie, Primitivlinie und Kopffortsatz und im Stadium der ersten Somiten (entsprechend Stadium 5—7 nach Hamburger—Hamilton) vorgenommen.

Seltener wurden etwas ältere Embryonen im Stadium von 12—15 Somiten von etwa 38 Stunden Inkubationsdauer (Stadium Hamburger—Hamilton 10—11) mit der Durchschneidungsmethode untersucht. Solche Untersuchungen sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Es handelt sich hier um die Untersuchung des Entwicklungsvorganges in zwei voneinander frühzeitig operativ getrennten Hälften des Embryokörpers, die miteinander nur durch gemeinsame Blutzirkulation und gemeinsames Eiweißdotter und subembryonale Flüssigkeit in Verbindung geblieben sind.

Material und Methode

Verwendet wurden Leghorn-Embryonen, welche im Stadium von 12—15 Somiten im Alter von 38—40 Stunden operiert wurden. In diesem Bebrütungsalter steht der Embryo dicht vor Beginn der Blutzirkulation und befindet sich in einer für verschiedenartigste Operationen ausserordentlich günstigen Periode. Nach Fensterung des Eies und einer leichten Vitalfärbung mit Neutralrot wird der Embryokörper unter der 12. Somite mit Hilfe einer Glasnadel transversal durchgeschnitten. Der Schnitt geht durch die ganze Dicke der Embryoanlage und reicht zu beiden Seiten bis an die Area pellucida, darf aber nicht ihren äusseren Rand, also die Area opaca erreichen. Um die Wiedervereinigung der Schnitttränder zu verhindern, kann ein Zellophan-Keil in die Schnittwunde eingeführt werden.

Resultate

An einem Teil der so operierten Embryonen ist die Ausbildung der Arteriae vitellinae gestört, so dass es nicht zur Bildung einer normalen Blutzirkulation kommen kann. (Diese Fälle sind natürlich für die weiteren Untersuchun-

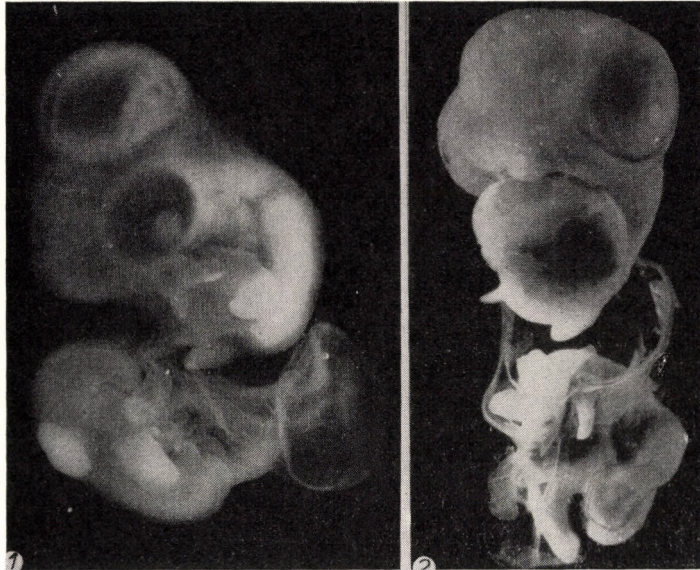


Abb. 1. Transsektion im 12-Somiten-Stadium unterhalb des 12. Somitenpaares. Fixation am 7. Bebrütungstag

Der Embryo besteht aus 2 völlig getrennten Körperteilen. Die obere Extremität ist in 2 Gebilde aufgeteilt, ein oberes stummelförmiges, von konischer Form, und ein unteres, grösseres, der Norm ähnlicheres. Der untere Körperteil hat eine Allantoisblase ausgebildet

Abb. 2. Operiert wie bei Abb. 1. Fixiert nach 8-tägiger Bebrütung Obere Extremität in je 2 spitze, stummelförmige Gebilde aufgeteilt

gen verloren.) In etwa 60% der operierten Fälle bildet sich die Blutzirkulation normal aus und wir erhalten Embryonen die aus zwei voneinander völlig getrennten Teilen, einem kranialen und einem kaudalen, bestehen (Abb. 1,

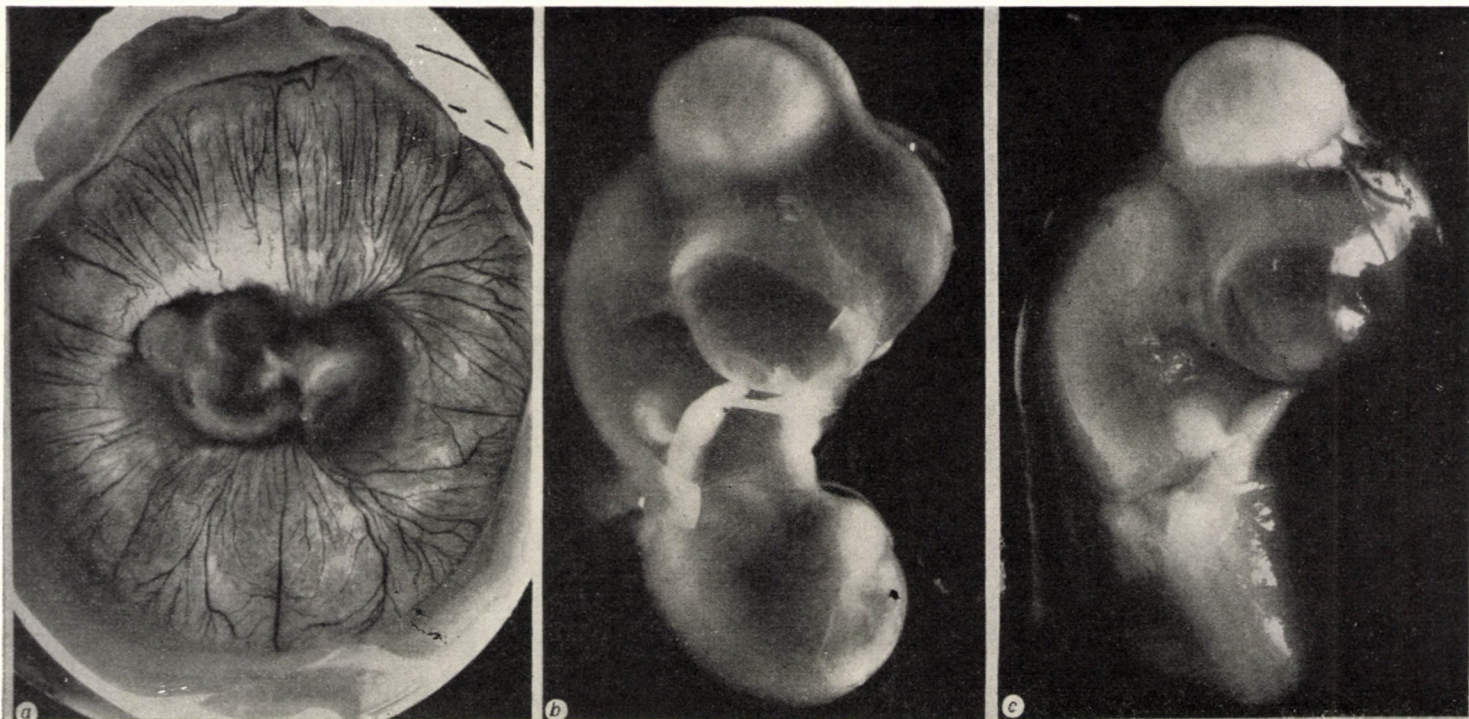


Abb. 3a. Operiert wie bei *Abb. 1* und *2*. Fixiert am 7. Bebrütungstag, nach Durchschneidung im 12-Somiten-Stadium unter dem 12. Somitenpaar, Totalansicht in ovo. Die beiden Teile des Embryonalkörpers werden von einem gemeinsamen Amnion zusammengehalten, aber voneinander völlig getrennt. Typisches Verhalten der oberen Extremität nach Halbierung ihrer Anlage: kranialer, konischer, nach unten gerichteter kleiner Stummel und langer, zugespitzter, nach oben gerichteter kaudaler Teil. *3b* und *c*: der Embryo isoliert

2 und 3). Ein Ast der Arteria vitellina dringt in den kaudalen Embryonalteil ein und nimmt dort den typischen Verlauf der Aorta. In den von uns beobachteten Fällen waren die mit Erfolg operierten Embryonen bis zum 8. Bebrütungstag lebensfähig. In einigen Fällen bildet der kaudale Teil eine typische Allantoisblase aus.

In folgendem beschreiben wir den Zustand der Plica urogenitalis im kaudalen Embryoteil und das Verhalten der geteilten Anlage der oberen Extremität.

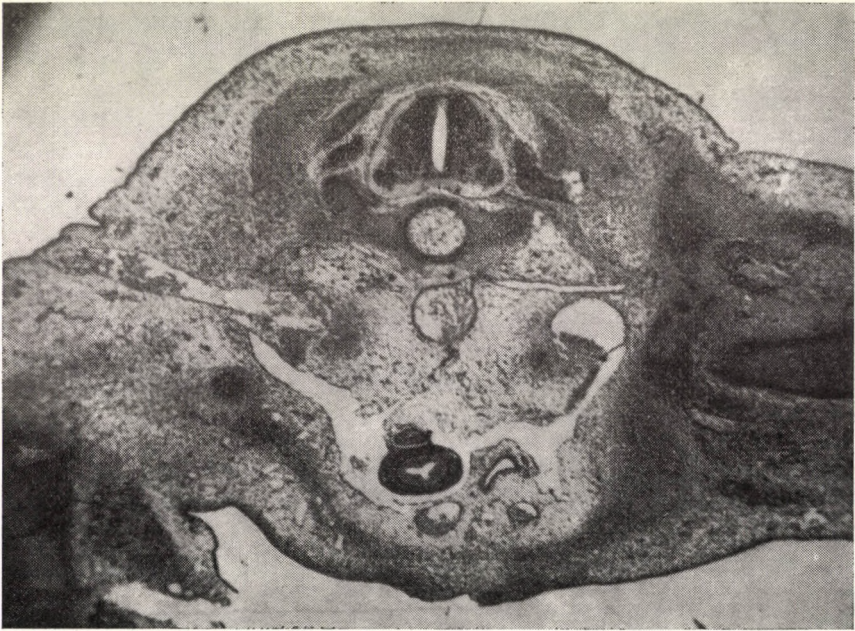


Abb. 4. Schnitt durch die untere Hälfte eines im 12-Somiten-Stadium operierten Embryos. Fixierung am 7. Bebrütungstag. Völliges Fehlen des Mesonephros. Breitbasige, leere Plica urogenitalis, kurzes Mesenterium.

1. Zustand der Plica urogenitalis

Es ist bekannt (WADDINGTON, GRÜNWARD), dass kaudal von Durchschneidungen oder andersartiger Behinderung des Vorwachsens des Wolff-Kanals ein Mesonephros (und später Metanephros) nicht zur Entwicklung kommen kann. Unsere kaudalen Embryohälften besitzen dementsprechend kein Mesonephros (Abb. 4). Es ist aber bemerkenswert, dass die mesenchymale Plica urogenitalis trotz Fehlens des grössten Teiles ihres normalen Inhaltes, wohl nicht im normalen Ausmass, aber deutlich ausgebildet ist und in die Zölohmöhle vorspringt. Sie enthält, ausser laxem Mesenchym, die Vena cardinalis posterior und Vena subcardinalis. Die Glandula suprarenalis bzw. interrenalis ist normal ausge-



Abb. 5a. 7. Bebrütungstag, kaudale Hälfte eines operierten Embryos. Plica urogenitalis ohne Mesonephros mit Inter- und Adrenal-Organ, Sympathicus, Gonade, kurzes Mesenterium, Darm- und Blinddarm-Anhänge. Interrenal-Organ scheint im ganzen hypertrophisch zu sein

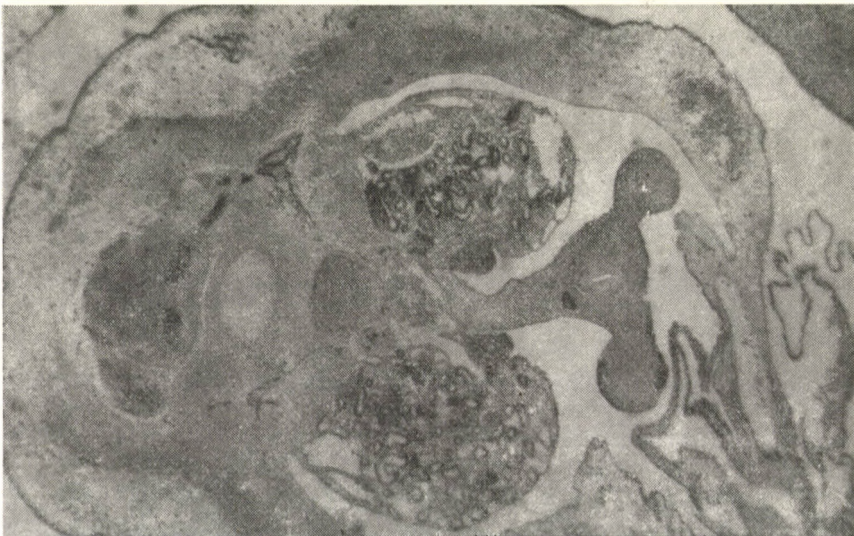


Abb. 5b. Normales Vergleichspräparat zu 5a. Silberimprägnation

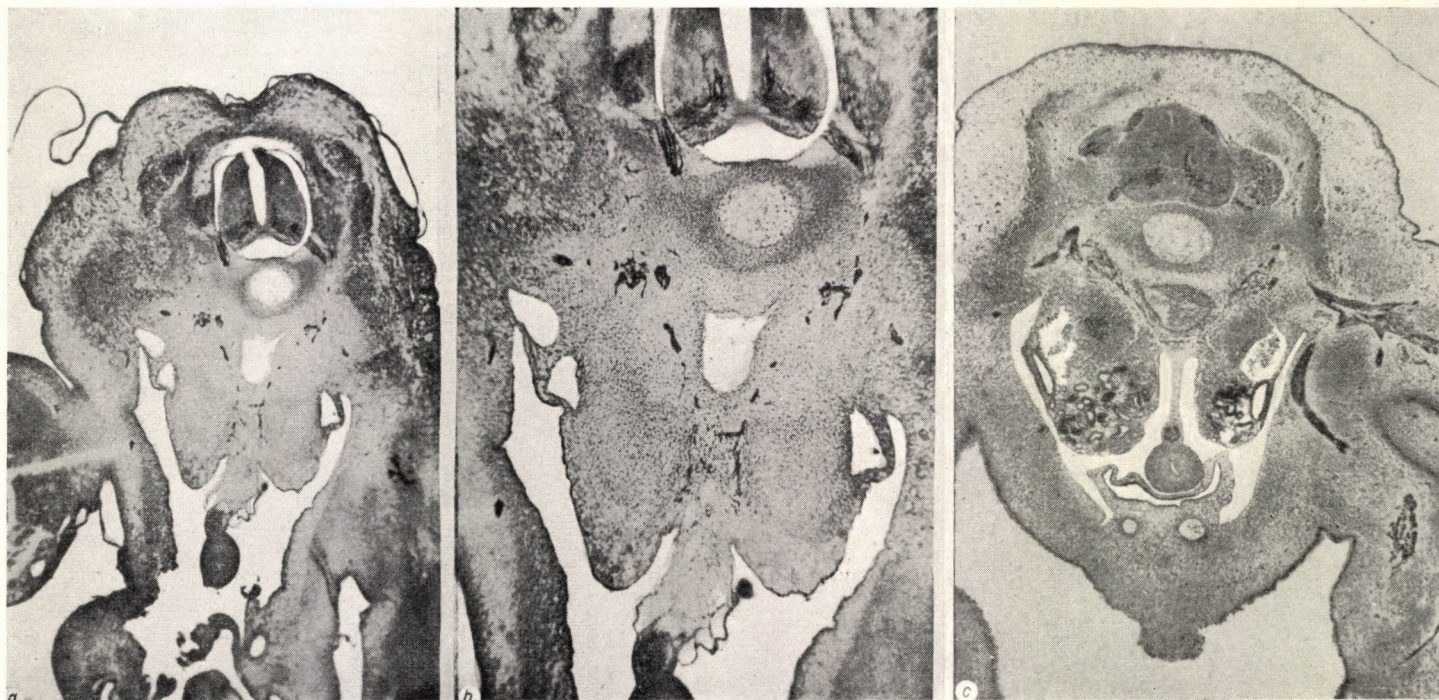


Abb. 6a. Kaudaler Teil eines operierten Embryos. Silberimprägnation. Leere Plica Urogenitalis. Kein Mesonephros, Sympathicus und Adrenal-Organ. 6b. Einzelheiten von 6a in stärkerer Vergrößerung. 6c. Normales Vergleichsbild, Silberimprägnation

bildet, ihre Zellstränge scheinen sogar hypertrophisch zu sein. (Abb. 5 bis 7). Es steht ihnen offenbar ein zu grosser Ausbreitungsplatz zur Verfügung. Die Gonade ist ebenfalls normal ausgebildet und normal gelagert. Sie enthält Gonozyten. Silberimprägnationen zeigen die normale Ausbildung des Sympathicus und der adrenalen Komponente. Auffallend ist auch das breitbasig aufsitzende Mesenterium. Die ganze Interrenal-Anlage scheint — wie gesagt — hypertrophisch und ventral vorgelagert zu sein. Es ist bemerkenswert, dass die mesenchymale

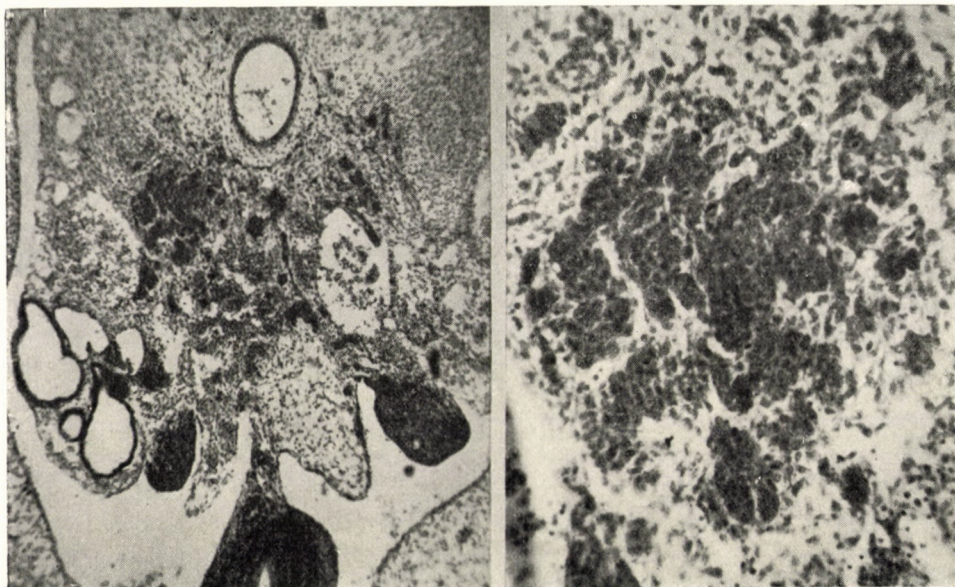


Abb. 7a. 7. Bebrütungstag, kaudaler Teil. Rechts zystischer Mesonephros-Rest. Gonaden Interrenal-Organ im ganzen hypertrophisch. 7b. Interrenal-Organ von 7a

Hülle, das »Bett« also auch in Abwesenheit seines parenchymatösen Hauptinhaltes, in unserem Falle des Mesonephros (siehe Vergleichsbilder mit normalen Embryonen) sich ausbildet. Zu dieser Beobachtung sei bemerkt, dass — wie eigene Beobachtungen zeigen — sich auch die Dura mater nach Exstirpation des Rückenmarkes ausbilden kann.

2. Anlage der oberen Extremität

Die Entwicklungspotenzen der Extremitäten-Anlagen beim Hühnerembryo waren Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. SAUNDERS stellt mittels Kohlenmarkierung eine proximokaudale Folge von Anlagebezirken fest. ZWILLING untersuchte die Beziehungen zwischen Ektoderm und Mesoderm in der Anlage.

Unser Operationsschnitt unterhalb des 12. Somitenpaares geht durch das Anlagematerial der oberen Extremität hindurch. Die meisten der von uns

operierten Embryonen zeigen dementsprechend eine verdoppelte Anlage der oberen Extremitäten und zwar eine im vorderen und eine im hinteren Embryonalteil. Interessant ist die Wachstumstendenz der beiden, jetzt getrennten Anlagen des Flügels. Die obere Anlage zeigt eine kaudale Wachstumstendenz, die untere wächst in kranialer Richtung. (Abb. 3.) Die Grösse der beiden Teilanlagen hängt offenbar vom Niveau des Operationsschnittes ab: liegt der Schnitt mehr kranial, so bildet sich eine kleine stummelförmige Anlage und eine grosse kaudale Anlage, die der normalen ganzen Anlage ähnlich ist. Die durch die Operation separierten Anlagemassen zeigen also, von ihren normalen Partnermassen befreit, — jede für sich — ein eigenes Verhalten.

Zusammenfassung

Nach Durchschneidung des Hühnerembryos im 12. Somitenstadium unter dem 12. Somitenpaar erhält man 2 getrennte Embryoteile, die bis zum 8. Bebrütungstag lebensfähig sind. Im kaudalen Teil bildet sich eine Plica urogenitalis ohne Mesonephros mit hypertrophischem Interrenal-Organ. Der Operationsschnitt geht durch die Anlage der oberen Extremitäten. Es bilden sich auf jeder Seite je 2 Flügelanlagen von ungewöhnlicher Wachstumsrichtung und Form.

LITERATUR

1. GRÜNWARD, P. (1943): Stimulation of Nephrogenic Tissue by Normal and Abnormal Induction. *Anat. Rec.* 86, 321. — 2. MENKES, B. (1958): Cercetari de Embryologie Experimentală. Ed. Ac. Rep. Pop. Rom. — 3. SAUNDERS, J. W. JR. (1948): The Proximo-distal Sequence of Origin of the Chick Wing and the Role of the Ectoderm. *J. exp. Zool.* 108, 363. — 4. SPRATT, N. T. (1955): Analysis of the Organizer Center in the Early Chick Embryo. *J. exp. Zool.* 123, 121. — 5. WADDINGTON, C. H. (1932): Experiments on the Development of Chick and Duck Embryos Cultivated in vitro. *Trans. roy. Soc. B* 221, 179. — 6. WADDINGTON, C. H. (1943): The Morphogenetic Function of a Vestigial Organ in the Chick. *J. exp. Zool.* 15, 371. — 7. WADDINGTON, C. H. (1952): *The Epigenetics of Birds*, Cambridge Univ. Press. — 8. WETZEL, R. (1936): Primitivstreifen und Urkörper nach Störungsversuchen am 1–2 Tage bebrüteten Hühnchen. *Arch. Entw. Mech. Org.* 134, 1936. — 9. WOLFF, E. J. KAHN (1947): La régulation de l'ébauche des membres chez les oiseaux. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* 141, 915. — 10. WOLFF, E.—H. LUTZ (1947): Sur une méthode permettant d'obtenir expérimentalement le doublement des embryos d'oiseaux. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* 141, 901. — 11. ZWILLING, E. (1949): The Role of Epithelial Components in the Developmental Origin of the "Wingless" Syndrome of Chick Embryo. *J. exp. Zool.* 111, 175.

ОПЫТЫ ПО ПЕРЕРЕЗКЕ ЗАРОДЫШЕЙ ЦЫПЛЯТ В СТАДИИ 12 СОМИТОВ

В. МЕНКЕШ

После перерезки зародышей цыплят в стадии 12-сомитов получают под 12. парой сомитов 2 обособленные эмбриональные части, которые способны доживать до 8 дня насиживания. В каудальной части образуется мочеполювая складка без мезонефроса с гипертрофическим интерренальным органом. Операционный разрез проходит через зачатки верхних конечностей. На обеих сторонах образуются по 2 зачатка крыльев необычной формы и необычного направления роста.

EXPERIMENTAL TRANSECTION OF 12-SOMITE CHICK EMBRYOS

B. MENKES

By a division of 12-somite chick embryos below the 12th segment two separate parts of the embryos are obtained which may survive until the 8th day of incubation. In the caudal portion an urogenital fold without mesonephros and with a hypertrophic interrenal organ is formed. The transection passes through the anlage of the upper extremities. Two primordial wings of unusual shape and direction develop on each side.

Prof. Dr. B. MENKES, Timișoara, Bul. Mihai Viteazul 24, Rumänien