

C<sup>14</sup>-acetate Incorporation into Carcass and Liver Fatty Acids in Hypothalamic Obese Mice and Controls

| Nutritional Status  | Type *   | Body Weight<br>g | Liver Weight<br>g | C <sup>14</sup> -Incorporation |          |          |
|---------------------|----------|------------------|-------------------|--------------------------------|----------|----------|
|                     |          |                  |                   | Total                          | Carcass  | Liver    |
| Nonfasted . . . . . | Obese    | 54.7 ± 5.7       | 2.228 ± 0.78      | 1266 ± 236                     | 930 ± 32 | 384 ± 43 |
| Nonfasted . . . . . | Nonobese | 34.0 ± 1.3       | 1.875 ± 0.06      | 3705 ± 561                     | 318 ± 17 | 52 ± 17  |
| Fasted . . . . .    | Obese    | 59.8 ± 6.6       | 2.965 ± 0.40      | 231 ± 69                       | 205 ± 28 | 42 ± 13  |
| Fasted . . . . .    | Nonobese | 28.1 ± 2.0       | 1.810 ± 0.11      | 249 ± 23                       | 187 ± 42 | 27 ± 6   |

\* 8 animals of each type. Incorporation is expressed as percentage counts retained × 10<sup>3</sup>.

thalamic obesity has since been achieved in mice<sup>1</sup>. It was therefore logical to repeat the most informative lipogenesis experiment using hypothalamic hyperphagic mice rather than rats, to check that the characteristics previously described were typical of the syndrome itself and not limited to one species.

Sixteen 4 month old female mice were used. The experimental animals were 8 hypothalamic obese swiss mice, weighing from 50 to 65 g and their unoperated controls, weighing 27 to 36 g. The obese animals had been operated according to the procedure described previously<sup>1</sup>. The obese mice used in the "non-fasted" experiment had been operated 4 months previously and were putting weight on slowly. The obese mice used in the "fasted" (16 h fast) experiment had been operated 1 month previously and were still putting on weight rapidly. (Thus, the demonstrated failure to demonstrate an increased acetate incorporation in the fasted state, contrasting with the picture in the fed state could not be attributed to the fasted animals being in a less "dynamic" form of obesity<sup>2</sup>.) All mice were maintained in individual cages, in an air-conditioned room and were fed Purina Laboratory Chow *ad libitum*. The animals were injected with 0.5 cm<sup>3</sup> of saline solution containing 0.075 mg of C<sup>14</sup>-carboxyl-labeled acetate containing 1500 000 cpm in the case of the obese animals, 150 000 cpm in the case of the nonobese. They were killed half an hour later and the procedure previously described<sup>3</sup> was followed to isolate the liver and carcass fatty acids and count the radioactivity. Results were expressed in percent counts retained multiplied by 10<sup>3</sup>.

From the data in the table, it is readily apparent that the fed hypothalamic obese mice incorporated considerably more acetate into fatty acid than the nonobese (approximately 4 times as much). Lipogenesis was greater both in the carcass (3 times) and in the liver (over 7 times). On the other hand, in the fasted state, total incorporations were not significantly different between obese and nonobese mice. Carcass lipogenesis was similar in obese and nonobese mice. There was some difference between liver incorporation in the two types of animals, of borderline significance ( $p \leq 0.05$ ) as had been observed in the hypothalamic obese rats. The significance of this slight residual difference, not demonstrated by isolated liver slices<sup>4</sup> is obscure, but is most probably related to the differences in liver weights between obese and nonobese animals. Actually, if liver incorporation is expressed on the basis of counts per gram, the counts in the obese mice are identical to those in the nonobese.

<sup>1</sup> R. G. FRENCH, C. Y. ZIGHERA, and J. MAYER, Fed. Proc. 14, 433 (1955). – J. MAYER, R. G. FRENCH, C. Y. ZIGHERA, and R. J. BARNETT, Amer. J. Physiol. (in press, July 1955).

<sup>2</sup> J. MAYER, Physiol. Revs. 33, 472 (1953).

<sup>3</sup> M. W. BATES, C. ZOMZELY, and J. MAYER, Amer. J. Physiol. 181, 187 (1955).

<sup>4</sup> J. MAYER, N. C. HAGMAN, N. B. MARSHALL, and A. J. STOOPS, Amer. J. Physiol. (in press, June 1955).

Incidentally, it is of interest to note that the livers of the obese mice used in the "fasting" experiment were larger than those of the group used in the "nonfasted" experiment. The former had been in a state of "dynamic" obesity (rapid weight gains), while the latter had gained weight more slowly. The animals of both groups were of similar over-all size. Furthermore, liver weight is very sensitive to the nutritional status and was most probably decreased somewhat by the 16 h fast. This finding would tend to indicate that the increase in liver weight encountered in various forms of experimental obesity<sup>1</sup> is probably related, at least in part, to the hyperphagia rather than to the excess weight as such.

The results presented here on lipogenesis confirm that the results previously obtained on hypothalamic hyperphagic rats are generally valid for hypothalamic hyperphagia in other species. They thus confirm the suggestion that this syndrome is of "regulatory" rather than "metabolic" nature.

J. MAYER and CLAUDINE Y. ZIGHERA

Department of Nutrition, Harvard School of Public Health, Boston, Mass., April 18, 1955.

Zusammenfassung

Bei Mäusen und Ratten mit hypothalamischer Fettsucht beobachtet man bei Fütterung *ad libitum* vermehrte Fettbildung, die zurückgeht, wenn man die Tiere hungern lässt. Diese Befunde lassen auf einen «regulatorischen» und nicht «metabolischen» Charakter dieser Fettsucht schliessen.

<sup>1</sup> J. MAYER, Proc. IIIrd Internat. Nutrition Congr., Voeding 16, 62 (1955). – N. B. MARSHALL and J. MAYER (to be published).

Paléontologie et expérimentation

Contre les hypothèses voulant expliquer par des actions mécaniques la morphogénie dentaire, il était facile de trouver des arguments; en particulier, l'existence de dents de forme normale, bien qu'hétéropiques ou qu'implantées de travers, pouvait être invoquée. Des faits de même ordre ont pu être provoqués grâce à des cultures de tissus. Déjà, GLASSTONE<sup>1</sup>, en explantant des germes de dents de Rat, avait prouvé que la formation, la forme et le nombre des cuspides n'étaient déterminés que par des facteurs endogènes<sup>2</sup>. VERNE<sup>3</sup> a montré que des germes dentaires, prélevés sur des embryons, évoluaient avec

<sup>1</sup> A. H. GLASSTONE, Dent. Rec. 1938.

<sup>2</sup> En 1940, A. G. LAPCHINSKY et A. A. MALINOVSKY<sup>4</sup> réussissaient également à obtenir des molaires ou des incisives, d'apparence normale, en prélevant des germes de rat ou de chien et en les insérant, soit dans une autre région des mâchoires, soit à la surface du fémur.

<sup>3</sup> J. VERNE, Rev. odontol. 64, 55 (1942).

<sup>4</sup> A. G. LAPCHINSKY et A. A. MALINOVSKY, C. r. Acad. Sci. U.R.S.S. 26, 722 (1940); 29, 268 (1940).

formation de cuspides normales en forme, nombre et arrangement. Cela démontrait que la morphogénèse des dents n'était pas réglée par des actions mécaniques; cela démontrait, de plus, le pouvoir inducteur, différenciateur, des adamantoblastes.

D'autre part, une observation de PETIT et BUDKER montre que le système nerveux, qui, ailleurs, joue le rôle d'inducteur (expériences de LOCATELLI), peut influencer sur la morphologie dentaire; elle est relative aux «dents cutanées» visibles sur la peau des embryons de certains sélaciens (*Carcharinus* etc.); ces dents sont des spicules différenciant, par leur forme et leur taille, de ceux qui constituent le revêtement du corps; or elles se trouvent exclusivement au niveau de dépressions épithéliales dont le fond est occupé par un organe sensoriel.

Le rôle du système nerveux paraît ici comparable à celui qu'il joue aussi dans le cas des écailles de la ligne latérale des poissons.

Cela ne contredit pas ce fait indiqué par RABAUD<sup>1</sup>, à savoir que la genèse et la localisation des zones de calcification sont liées à la répartition du réseau vasculaire (suivant un principe bien exposé par LERICHE).

Tout cela montre l'importance des organisateurs, des inducteurs, en morphogénèse dentaire, ce qui permet d'interpréter de façon simple certains faits paléontologiques ou anatomiques<sup>2</sup>.

On sait que les carnivores se distinguent non seulement par la forme de leurs carnassières mais encore par leur place dans la série dentaire; parmi les créodontes, les *Acreodi* (*Arctocyon*, *Pachyaena*) n'avaient pas de carnassières, les *Pseudocreodi* avaient des carnassières de formule  $K = M_2/M_3$  (*Hyaenodon*, *Proiverra*) ou  $K = M_1/M_2$  (*Oxyaena*, *Palaeonictis*) et les *Eucreodi* (*Viverravus*, *Miacis*) réalisaient déjà la disposition des carnivores actuels,  $K = P_4/M_1$ . Pour cette raison, on a dit que seuls les *Eucreodi* avaient pu donner naissance à ces derniers. Il paraît, au contraire, possible d'expliquer le glissement de la carnassière vers l'avant par une modification du champ d'action d'un inducteur. De même pourrait s'expliquer pourquoi la carnassière elle-même, qui typiquement est mi-coupante, mi-broyeuse, perd, dans certains cas, soit sa partie tranchante, soit sa partie tuberculée.

Les primates fournissent d'autres exemples. Chez les anthropomorphes, la prémolaire antérieure tend à ressembler tantôt à une canine, tantôt à une molaire. Au sein même d'une espèce, il y a des variantes, ainsi le jeune néanderthalien du Moustier a une canine supérieure qui tend à ressembler à une prémolaire et des prémolaires qui tendent à être molariformes. Ces exemples de convergences morphologiques entre dents voisines sont nombreux: canines incisiformes des lémurins et des ruminants, canines prémolariformes des *Saghattherium*, molarisation des prémolaires de nombreux types. Les actions inductrices permettent d'envisager aisément la réversibilité de l'évolution de certains détails.

La possession de techniques récentes permettant des cultures d'organes<sup>4</sup>, et non plus de simples cultures in-

coordonnées comme celles de CARREL, permet d'espérer la reproduction expérimentale de faits de cet ordre. Il est classique qu'il y a, chez le jeune veau, des germes des incisives supérieures qui n'aboutissent pas et manquent chez l'adulte, qu'il y a, chez les embryons de mystacocètes, des rudiments de dents, partiellement calcifiés, qui disparaissent avant la naissance, que, chez les édentés (*Orycteropus* etc.), il y a avortement des dents de lait, que celles-ci ne sont jamais fonctionnelles chez les insectivores et les chéiroptères, tandis que la seconde dentition avorte chez les odontocètes qui conservent toute la vie leurs dents lactéales. Il serait très intéressant si, par la culture de germes voués à l'atrophie, l'on reconnaissait qu'un tel facteur peut activer leur développement. D'autres essais seraient à faire en modifiant, soit *in vivo* l'induction nerveuse ou l'irrigation sanguine (dont on sait les relations avec la calcification), soit, *in vivo*, l'apport d'hormones (comme l'a fait, même *in utero*, VERA DANTCHAKOFF).

On sait quel peut être le rôle inducteur d'une hormone, celle-ci pouvant être l'inducteur de sa propre glande sécrétrice (WOLFF) ou inhiber le développement d'un organe (action de l'hormone mâle sur le canal de MÜLLER). On sait, d'autre part leur rôle morphogénétique; l'influence des hormones mâles est responsable des caractères sexuels secondaires tels que la puissante canine des grands anthropomorphes.

Or il y a là une question capitale relativement aux origines de l'homme. Celui-ci peut-il ou non descendre d'un ancêtre à canines saillantes du type des anthropomorphes actuels. Il semble que, les hormones ne pouvant agir qu'à partir d'un certain seuil, une simple variation endocrinienne ait pu entraîner une évolution en sens inverse de celle qui avait abouti au type à grandes canines; autant que les données paléontologiques, très fragmentaires, du Fayoum peuvent être invoquées, les premiers anthropomorphes avaient des canines non saillantes.

VAN WAGENEN et HURME<sup>1</sup>, à l'aide de propionate de testostérone, ont avancé d'un an l'éruption de la canine d'un macaque; or, agissant à un stade différent, le même facteur pourrait fort bien entraîner un changement de taille.

D'autres espoirs sont permis. En effet, spontanément, sous l'influence de facteurs non encore analysés, les ébauches pentadactyles embryonnaires (palettes) des membres du cheval peuvent donner les doigts II et IV que possédait son ancêtre tridactyle (type *Hipparion* ou mieux *Protohippus*)<sup>2</sup>; on peut donc espérer obtenir systématiquement, grâce à un stimulant approprié, le développement de tels doigts. Et la remarque vaut pour tout organe dont l'ébauche embryonnaire est conservée. On n'oubliera, d'ailleurs, pas que, si parfois un membre tridactyle de type hipparion se développe, parfois aussi les phalanges ou métapodiales surnuméraires ne correspondent nullement au type ancestral. BOAS<sup>3</sup> (1917) a figuré des exemples où la polydactylie du cheval est absolument monstrueuse.

E. PATTE

<sup>1</sup> ET. RABAUD, Rev. odontol. Sept. Oct. 59, 611 (1937).

<sup>2</sup> Dans le cas des anomalies dentaires, DIEULAFÉ et HERPIN<sup>3</sup> observent qu'elles peuvent être soit isolées, soit paires et symétriques, soit même représentées au niveau des dents homologues des 2 mâchoires; ces auteurs ont expliqué le fait par une action simultanée sur plusieurs ébauches à un moment donné du développement; on peut imaginer, avec autant de vraisemblance, l'influence d'inducteurs.

<sup>3</sup> DIEULAFÉ et HERPIN, *Anatomie de la bouche et des dents* (Paris, Baillière 1928).

<sup>4</sup> Travaux du Professeur ETIENNE WOLFF, de Strasbourg.

*Institut de Géologie et d'Anthropologie préhistorique, Poitiers, le 7 juin 1955.*

<sup>1</sup> M. VAN WAGENEN et G. HURME, Proc. Soc. exper. Biol. Med. U.S.A. 73, 296 (1950).

<sup>2</sup> Des faits analogues sont signalés chez les artiodactyles (mouton, porc).

<sup>3</sup> J. E. V. BOAS, Zool. Jb., Abt. Anat. Ontogenie 40, 49 (1917); Kgl. Veterinaer og Landbohøjskole, Aarskrift 1922, 66.

### Summary

Since the morphogenesis of teeth is ruled by organizers (inductors) the change of position of one of them could have brought about an evolution of the denture such as is found in the *Creodontia* and Carnivores. Modern techniques of organ cultivation will perhaps solve some other paleontological problems (reappearance of teeth whose germs miscarry, modification of the size of the canines, which would permit us to suppose a certain reversibility).

## PRO EXPERIMENTIS

### Sharpening of Knives for Ultramicrotomy

Ultrathin tissue sectioning for electron microscopy demands among other things a cutting edge of very high quality. The best edges are up to the present undoubtedly obtained by handpolishing razor blades<sup>1</sup>, but this method has some definite drawbacks. In order to obtain better and more reproducible sharpening results we have investigated several kinds of knife-steel and, furthermore, worked out a special sharpening method.

The steel in ordinary microtome knives and razor blades is not particularly suitable for ultramicrotome knives. The reason for this is firstly the richness in very hard iron carbide particles which sometimes are wrenched out of the martensite during the sharpening and thus spoiling the edge. Secondly, the lack of corrosion resistance makes it impossible to use a knife for sectioning for more than a couple of hours.

Testing several kinds of steel we have found that a special steel containing 0.5% carbon and 13% chromium is very suitable for our purpose. The low carbon percentage makes it possible to obtain a steel composed mainly of martensite with very few or no carbide particles. By a special hardening process and by cautious tempering the steel is given a high hardness (about 800 Vicker units). The corrosion resistance is very good which is of vital importance. (This steel is produced by the Steel Company of Uddeholm.)

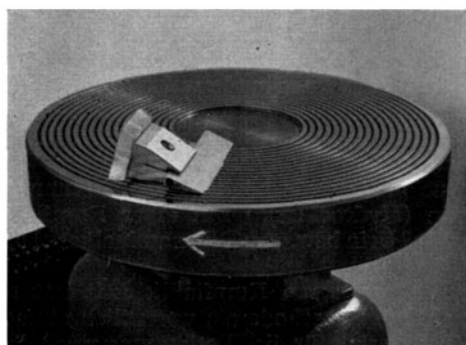


Fig. 1.

The knives of this special steel are sharpened by a lapping technique<sup>2</sup>, carried out in two phases on a lapping machine. This consists of a cast iron plate fixed on a vertical axis and rotatable at variable speeds. In the first phase of lapping a special lapping disc of cast iron is used, the surface of which is extremely even and smooth and provided with circular grooves in order to

prevent suction of the knife (Fig. 1). In the second phase of lapping this cast iron disc is exchanged for a mirror grade glass plate.

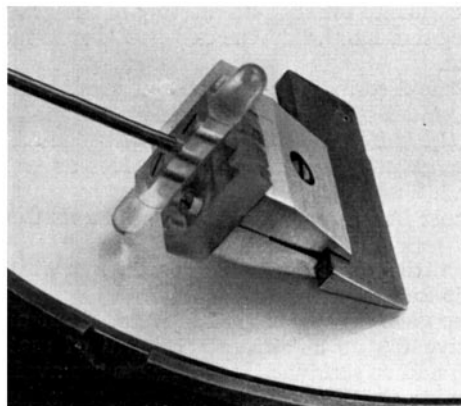


Fig. 2.

While sharpening the knife is mounted in a special fixture that always holds the knife in the same position. The fixture is provided with a perspex back that is resting on the lapping disc during the sharpening and so determines the bevel angle (see Fig. 1). For lapping against cast iron the fixture gives a bevel angle of 30°. While lapping against glass the knife is moved to a fixture the back of which is resting with one point on the glass and giving a bevel angle of 50° (Fig. 2.)

Before lapping against cast iron a thin layer of a paste, consisting of chromium oxide in oil is carefully rubbed into the lapping disc. The disc is rotating at about 40 r.p.m. The knife in its fixture is placed with the edge against the direction of rotation and moved to and fro in radial direction. The knife is turned over at intervals of about 15 s. The facet surfaces obtained have a high evenness and smoothness.

If the knife has big scratches on its facets or if it has not previously been used for ultramicrotomy we carry out an additional lapping against cast iron before the phase just described. We then use a lapping disc of the above kind and the same fixture (i.e. the bevel angle is 30°). To this disc we apply a paste consisting of carborundum which gives a higher rate of material removal but a coarser facet surface.

After having cleaned the knife in white spirits and mounted it in the second fixture the lapping against glass is carried out<sup>1</sup>. For this no abrasive is used, on the contrary it is carried out in a 3% sodium bicarbonate solution containing one drop of detergent per 25 ml. The rotation velocity of the glass disc is about 10 r.p.m. No pressure is exercised on the knife during sharpening as the fixture is so balanced that its weight gives the adequate pressure.

Lapping against glass for 2–3 min gives facet surfaces of extreme evenness and smoothness and a continuous edge line that is perfectly straight and uniform. The width of these final facet surfaces is 10–15  $\mu$ , which is quite sufficient. (The inspection of the sharpening results is made in a darkfield microscope with a resolving power of about 0.7  $\mu$  and magnification of 700 times.)

<sup>1</sup> "Lapping" is probably not the adequate term for this part of the sharpening since "lapping" signifies a removal of material and the glass phase implies very likely a smoothing out of the facets without any significant removal. However, the term "lapping" is used here for the sake of simplicity.

<sup>1</sup> F. SJÖSTRAND, J. Cell. Comp. Physiol. 42, 15 (1953).

<sup>2</sup> O. HALLÉN, Lab. Invest. (in press).