

method described earlier<sup>2</sup>. When sectioning, a small plastic trough, in which the sections are collected on a liquid surface, is attached to the knife.

When operated the microtome axle has a speed of 74 rpm. As the specimen is mounted about 35 mm from the centre of the axle the cutting speed is about 0.27 m/s. The intensity of the heating current is 1.0 amp. At this amperage the expansion rod elongates 1.5 micron per min from the second till the eleventh minute after closing the circuit. Thus the theoretical section thickness is about 200 Å.

Provided that the knife edge is of high quality the microtome displays very satisfactory operating properties. The cutting starts about 30 s after the circuit is closed and goes on regularly for about 12 min. By continuous control of a great number of cutting series it has proved that a section is produced every time the specimen passes the edge for periods of 1.5–3 min. Between these periods there is a miss of one or two sections. In the electron microscope the sections prove to be of very

<sup>2</sup> R. EKHLOM, O. HALLÉN, and T. ZELANDER, Exper. 11, 361 (1955).

uniform thickness. On the basis of the regular cutting and the uniformity of the sections in the electron microscope, we are justified in taking for granted that the divergence from the theoretically calculated section thickness of 200 Å is very slight.

It is a pleasure to acknowledge the interest and skillful workmanship of Mr. V. KUIKKA during the building of the prototype of this microtome.

R. EKHLOM and T. ZELANDER

Department of Anatomy, University of Gothenburg,  
December 5, 1955.

#### Zusammenfassung

Die prinzipielle Konstruktion eines neuen Ultramikrotoms wird beschrieben. In diesem Mikrotom wird das Präparat durch Montieren auf eine konisch gelagerte, motorgetriebene Achse in einer zirkulären Bahn fortbewegt. Die gewünschte Schnittdicke erhält man durch das Ausnutzen der thermischen Verlängerung eines Metallstabes, auf dem das Mikrotommesser befestigt ist. Mit diesem Mikrotom können routinemässig Schnitte von etwa 200 Å Dicke hergestellt werden.

## Informations – Informationen – Informazioni – Notes

### STUDIORUM PROGRESSUS

#### Elektronenmikroskopische Untersuchung der phäochromen (chromaffinen) Granula in den Markzellen der Nebenniere<sup>1</sup>

Von F. S. SJÖSTRAND\* und R. WETZSTEIN\*\*  
Stockholm und München

Die bekannten Farbreaktionen an den Markzellen der Nebenniere, zum Beispiel mit Chromsalzen, Osmiumtetroxyd, Eisenchlorid, ammoniakalischem Silbernitrat beruhen übereinstimmend auf der reduzierenden Fähigkeit der im Cytoplasma gespeicherten Brenzcatechamine («catechol amines»): Adrenalin, Noradrenalin bzw. deren Vorstufen. In älteren und neueren Arbeiten<sup>2</sup> wurde nachgewiesen, dass diese Stoffe im Cytoplasma in granulären Gebilden, den chromaffinen oder phäochromen Granula, lokalisiert sind, die neuerdings nach

Homogenisierung des Gewebes durch Zentrifugieren weitgehend isoliert und biochemisch studiert wurden<sup>3</sup>. Nähere morphologische Angaben über diese Granula liegen bisher nicht vor.

Für elektronenmikroskopische Dünnschnittuntersuchungen des Nebennierenmarks, die an anderer Stelle ausführlich mitgeteilt werden<sup>4</sup>, wurden die Nebennieren der Maus (ferner auch von Meerschweinchen und Katze) in zwei (bzw. mehrere) Stücke zerteilt, in gepufferter isotonischer Osmiumtetroxydösung fixiert, in bestimmter Orientierung<sup>5</sup> in Methacrylat eingebettet und mit dem von SJÖSTRAND<sup>6</sup> entwickelten Ultra-Mikrotom geschnitten. Die etwa 200 Å dicken Schnitte wurden ohne Entfernung des Einbettungsmittels in Elektronenmikroskopen verschiedener Typen untersucht.

Bei der Maus erscheinen die phäochromen Granula im Schnitt als annähernd kreisrunde Scheiben von unterschiedlicher Größe (siehe unten) und hoher elektronenmikroskopischer Dichte (Abb. 1 und 2). Beim normalen Tier reduzieren die gespeicherten Brenzcatechamine soviel Osmiumtetroxyd, dass die meisten Granula ein

\* Anatomisches Institut des Karolinska Instituts Stockholm.

\*\* Institut für Histologie und experimentelle Biologie der Universität München.

<sup>1</sup> Ausgeführt mit Unterstützung der Friedrich-Baur-Stiftung und der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

<sup>2</sup> R. BACHMANN, *Die Nebenniere*, Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Bd. 6, 5. Teil (Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg 1954). – N.-Å. HILLARP und B. NILSON, Kungl. fysiogr. Sällsk. Föhr., Lund 23, 29 (1953). – N.-Å. HILLARP und B. NILSON, Kungl. fysiogr. Sällsk. Föhr., Lund 23, 29 (1953). – N.-Å. HILLARP, B. HÖKFELT und B. NILSON, Acta anat. 21, 155 (1954). – H. BLASCHKO und A. D. WELCH, Arch. exper. Path. Pharmak. 219, 17 (1953). – N.-Å. HILLARP und B. NILSON, Acta physiol. Scand. 31, Suppl. 113, 79 (1954); 32, 11 (1954). – H. BLASCHKO, P. HAGEN und A. D. WELCH, J. Physiol. 129, 27 (1955).

<sup>3</sup> N.-Å. HILLARP und B. NILSON, Kungl. fysiogr. Sällsk. Föhr., Lund 23, 29 (1953). – N.-Å. HILLARP, B. HÖKFELT und B. NILSON, Acta anat. 21, 155 (1954). – H. BLASCHKO und A. D. WELCH, Arch. exper. Path. Pharmak. 219, 17 (1953). – N.-Å. HILLARP und B. NILSON, Acta physiol. Scand. 31, Suppl. 113, 79 (1954); 32, 11 (1954). – H. BLASCHKO, P. HAGEN und A. D. WELCH, J. Physiol. 129, 27 (1955).

<sup>4</sup> R. WETZSTEIN (in Vorbereitung).

<sup>5</sup> R. WETZSTEIN, Mikroskopie (Wien 10, Heft 9/10 (1955) (im Druck).

<sup>6</sup> F. S. SJÖSTRAND, Exper. 9, 114 (1953).

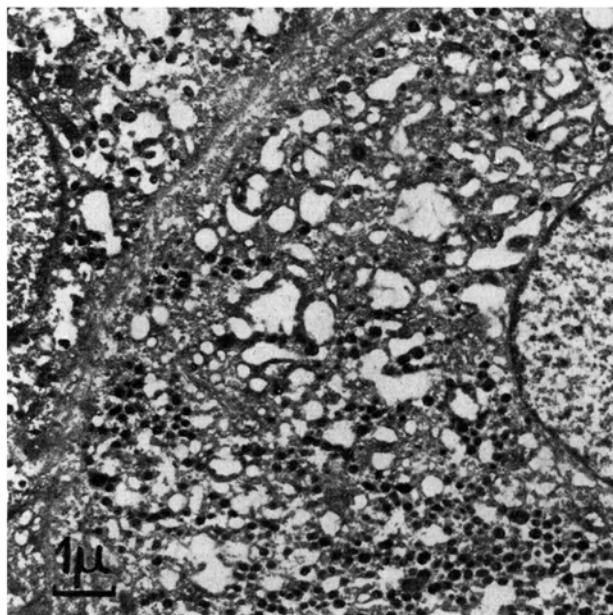


Abb. 1. Nebennierenmark Maus, Übersichtsbild. Zwei benachbarte Markzellen mit angeschnittenen Kernen (seitliche Ränder); Interzellularraum. Phäochrome Granula schwarz. Links oben Mitochondrien. AEG-ZEISS EM 8 (Dr. H. MAHL). Vergrössert 7500×.

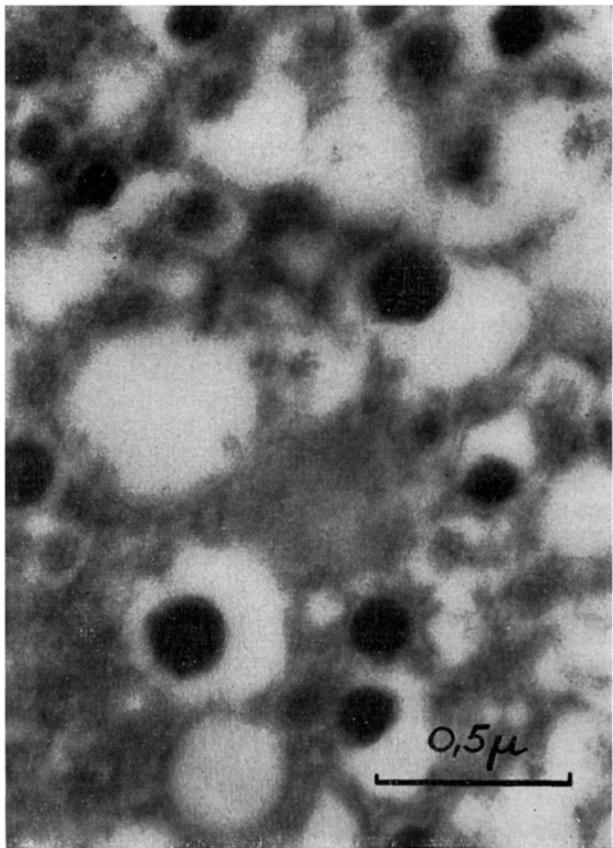


Abb. 2. Nebennierenmarkzelle Maus. Phäochrome Granula; an einigen ist die Membran sichtbar, einige zeigen das feingranuläre Grundgerüst. «Höfe» mit doppelt-lamellärer Begrenzung, zum Teil konfluierend. Elektronelektronenmikroskop Dr. E. KINDER. Vergrössert 50000×.

kompaktes Aussehen mit ziemlich gut konturiertem Rand erhalten. Häufig verläuft um diesen Rand noch eine etwas hellere Linie, um diese eine weitere dunkle Linie (Abb. 2 und 3). Die hellere Linie hat eine wechselnde Breite zwischen 60 und 200 Å. Die äussere dunkle Linie hat eine mittlere Breite von rund 100 Å; sie entspricht offensichtlich einer Membran, die das Granulum umgibt, aber, wie es scheint, bei der Präparation sehr leicht ganz oder teilweise beschädigt wird. HILLARP und NILSON<sup>7</sup> sowie BLASCHKO, HAGEN und WELCH<sup>8</sup> haben auf Grund des osmotischen Verhaltens isolierter Granulafraktionen die Vermutung ausgesprochen, dass die Granula eine Membran mit semipermeablen Eigenschaften besitzen; auch die protrahierte Adrenalinwirkung intravenös applizierter Granulafraktionen wurde in diesem Sinn gedeutet<sup>8</sup>.

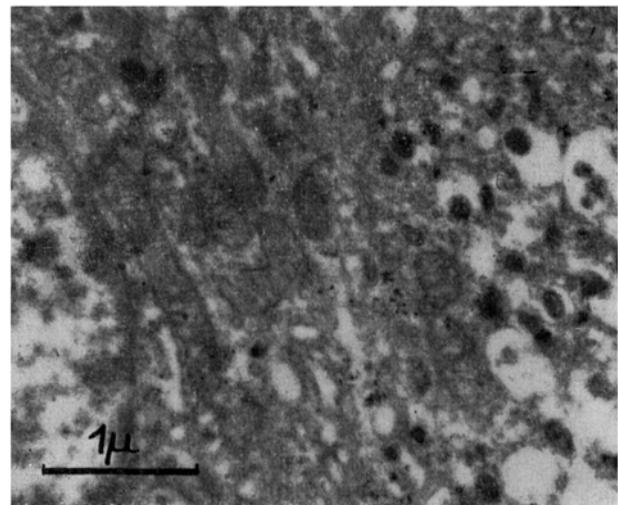


Abb. 3. Nebennierenmarkzelle Maus. Links Zellkern, daneben Mitochondrien. Rechts phäochrome Granula, an einigen Membran. «Höfe». Intrazelluläre Lamellen. RCA EMU 2c. Vergrössert 20000×.

Einzelne Durchschnitte durch Granula sind nicht wie die beschriebenen gleichmässig geschwärzt, sondern lassen – teilweise nur in der Randzone, teilweise auf der ganzen Fläche – eine körnige Feinstruktur erkennen: Körnchen von unterschiedlicher elektromikroskopischer Dichte füllen die Fläche aus (Abb. 2). Der mittlere Durchmesser dieser Körnchen liegt bei 175 Å; der mittlere Abstand ihrer Zentren beträgt ungefähr 250 Å. Ob (und in welcher Weise) diese Körnchen gesetzmässig angeordnet sind, kann noch nicht sicher entschieden werden. Dass es sich bei diesen feingekörnten Granula um solche handelt, welche die gespeicherten Brenzcatechamine zum kleineren oder grösseren Teil abgegeben haben, so dass nun ihre eigene Binnenstruktur sichtbar wird, beweisen Untersuchungen an experimentellem Material. Verursacht man eine stärkere Ausschüttung von Adrenalin aus dem Nebennierenmark durch Vorbehandlung der Tiere (Maus) mit Insulin, so wird bei der Mehrzahl der Granula ein körniges Gerüst der geschilderten Art erkennbar. Das gleiche Bild zeigen die Granula bei Tieren, die mit dem zur Hibernation verwendeten «lytischen Gemisch» nach LABORIT (Megaphen-

<sup>7</sup> N.-Å. HILLARP und B. NILSON, Acta physiol. Scand. 31, Suppl. 113, 79 (1954).

<sup>8</sup> H. BLASCHKO, P. HAGEN und A. D. WELCH, J. Physiol. 129, 27 (1955).

Atosil-Dolantin) behandelt und unterkühlt wurden (Abb. 4).

Wir teilen die Auffassung<sup>9</sup>, dass die phäochromen Granula nicht als Sekretkörner zu betrachten sind, sondern vielmehr echte Zellorganellen (mit Proteingerüst und Membran) darstellen, welche die kreislaufwirksamen Brenzcatechinarine speichern, vielleicht auch erst aus Vorstufen bilden. Die Granula sind im Schnitt in Scheiben zerlegt; wo deren Form von der des Kreises abweicht, liegt der Verdacht 'einer artifiziellen Beeinträchtigung nahe. Es kann angenommen werden, dass die Granula selbst annähernd Kugelgestalt besitzen; tatsächlich ist in aufeinanderfolgenden Serienschnitten ein und dasselbe Granulum mehrmals (mit zu- oder abnehmendem Scheibendurchmesser) identifizierbar. Aus über 1500 gemessenen Schnittkreisen in höher vergrösserten Bildern wurde ein mittlerer Radius der Scheiben von  $69,3 \text{ } \mu$  ( $\sigma = 21,7$ ) ermittelt. Die Häufigkeitsverteilung der Schnittkreisradien lässt mit Sicherheit darauf schliessen, dass die geschnittenen sphärischen Körper keine einheitliche Grösse besitzen. Nach dem Verfahren von LENZ<sup>10</sup> wurde der mittlere Kugelradius der phäochromen Granula für unsere Präparationen zu  $87 \text{ } \mu$  ( $\sigma = 11,3$ ) berechnet.

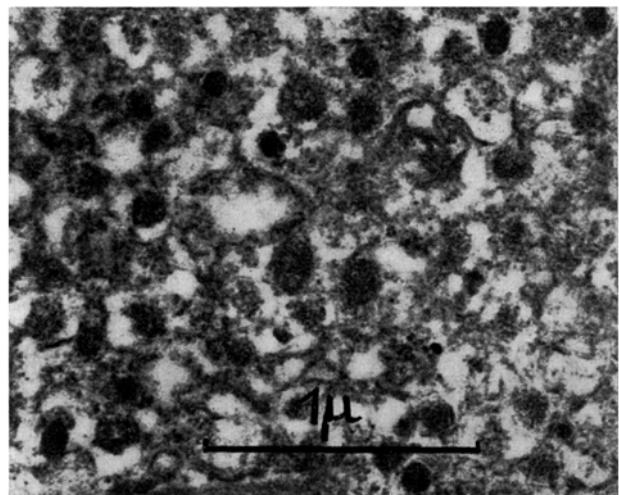


Abb. 4. Nebennierenmarkzelle Maus nach Megaphen-Atosil-Dolantin, Unterkühlung auf  $23^{\circ}\text{C}$ . Die phäochromen Granula zeigen das feingranuläre Gerüst. Mitochondrien beeinträchtigt. Elektronenmikroskop Dr. E. KINDER. Vergr. 35000 $\times$ .

Nun ist es wohl denkbar, dass die Granula trotz der sorgfältig gewählten Fixierungsbedingungen mehr oder weniger stark geschrumpft sind. An frischen, über Osmiumtetroxyddämpfen fixierten Gefrierschnitten sieht man im Lichtmikroskop tatsächlich osmophile Granula, die erheblich grösser sind als die in unseren Schnitten vermessenen grössten Granuladurchschnitte. Andererseits werden mit stärksten lichtoptischen Systemen in einer Fokussierungsebene weit weniger Granula scharf abgebildet, als in einem entsprechenden Bezirk auf einem unserer Dünnschnitte getroffen sind; es ist anzunehmen, dass ein grosser, wenn nicht der grösste Teil der Granula auch in frischem Zustand einen Durchmesser besitzt, der unterhalb der Grenze des lichtmikroskopischen Auflösungsvermögens liegt.

<sup>9</sup> N.-Å. HILLARP, B. HÖKFELT und B. NILSON, Acta anat. 21, 155 (1954).

<sup>10</sup> F. LENZ, Z. wiss. Mikrosk. 63 (im Druck).

Für diejenigen Granula, die unmittelbar an das Grundplasma angrenzen, ist eine wesentliche Schrumpfung nicht wahrscheinlich. Ein grosser Teil der Granula ist jedoch im Schnitt von verschiedenen grossen Flächen umgeben, die sehr hell erscheinen. Diese Bezirke, die wir vorläufig als «Höfe» bezeichnen wollen, sind oft annähernd kreisförmig, oft aber auch unregelmässig gestaltet. Solche Höfe, die ober- oder unterhalb ihres Granulum getroffen wurden, sind leer. Häufig liegt das Granulum nicht in der Mitte eines Hofes, sondern an dessen Rand. Bei den von solchen Höfen umgebenen Granula ist es möglich, dass sie in stärkerem Mass geschrumpft sind. Die Höfe könnten als reine Schrumpfungsräume aufgefasst werden. Sie zeigen aber weitere Eigentümlichkeiten, die uns eine andere Interpretation nahelegen. Die Höfe sind gegen das umgebende Grundplasma doppelt lamellär begrenzt (Abb. 2); die Doppel-lamellen gleichen ihrer Dicke und Beschaffenheit nach weitgehend denjenigen, die im Cytoplasma verschiedenster Zellarten gefunden wurden. Nahe beieinanderliegende Höfe konfluieren leicht unter Zerreissen der Grenzmembranen. Bei der photometrischen Vermessung von Negativen solcher Schnittbilder, auf denen zugleich ein Gefäss getroffen ist, zeigen die Höfe regelmässig eine noch geringere elektronenmikroskopische Dichte als das Gefässlumen. Stellenweise kann man im Innern von Höfen Reste eines vermutlich proteinhaltigen Gerüstes sehen. Diese Befunde sprechen dafür, dass die elektronenmikroskopisch nahezu leeren «Höfe» *intra vitam* mit Stoffen erfüllt waren, die bei der Vorbehandlung aus dem Gewebe gelöst und durch das Einbettungsmedium ersetzt wurden; mit diesem Vorgang erklärt sich auch das als artifiziell aufgefasste Abweichen mancher Granula von der strengen Kugelgestalt sowie eine Schrumpfung derselben als Folge der in ihrer unmittelbaren Umgebung wirksam gewesenen Lösungskräfte. Die Stoffe, die ausgelöst worden sind, brauchen nicht nur in den leeren Höfen lokalisiert gewesen sein, sondern können ja auch diffus im Granulum verteilt sein. Die Wahrscheinlichkeit ist gross, dass es sich bei den herausgelösten Stoffen um Lipide (Fette bzw. Lipoide) handelt. Eine derart disseminierte Verteilung von Lipiden in der Markzelle (auf grössere und kleinere Räume in der Umgebung von Granulis) würde auch den Widerspruch erklären, der in dieser Hinsicht bisher zwischen histologischen und biochemischen Angaben besteht: mit histologischen Nachweismethoden wurden im Nebennierenmark wesentlich geringere Lipidmengen gefunden als mit biochemischen Extraktionsverfahren<sup>11</sup>.

Die auf den Schnitten ausgemessenen Scheiben nehmen 4,5% der zugehörigen Cytoplasmafläche ein. Unter Anwendung eines Korrekturfaktors, der die mittlere Schnittdicke und den mittleren Durchmesser der Granula berücksichtigt<sup>12</sup>, kann der Volumenanteil der phäochromen Granula am Cytoplasmavolumen bei unseren Präparationen mit etwa 3,5% angenommen werden. Dieser Wert liegt, auch wenn man einen Fehler durch Schrumpfung in Rechnung setzt, sehr weit unter demjenigen, den HILLARP und NILSON<sup>13</sup> aus Daten der biochemischen Analyse von Granulafraktionen der Kuh errechnet haben (ein Drittel des Gewichtes der Markzelle).

<sup>11</sup> R. BACHMANN, *Die Nebenniere*, Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Bd. 6, 5. Teil (Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1954).

<sup>12</sup> A. HENNIG, Z. wiss. Mikrosk. 63 (im Druck).

<sup>13</sup> N.-Å. HILLARP und B. NILSON, Acta physiol. Scand. 32, 11 (1954).

Für die Verteilung der Granula im Cytoplasma ist keine bevorzugte Lokalisation zu erkennen; sie liegen in grösseren oder kleineren Gruppen beisammen; Anhäufungen kann man ebenso in der Nähe des Zellkerns wie in der Zellperipherie finden. Deutlich von den Granula verschieden sind die Mitochondrien: diese besitzen auch in den Nebennierenmarkzellen von Maus, Meerschweinchen und Katze die von SJÖSTRAND<sup>14</sup>, SJÖSTRAND und RHODIN<sup>15</sup> und anderen beschriebene Struktur (Abb. 3); allerdings sind sie hier nur in verhältnismässig geringer Zahl anzutreffen. Die biochemische Untersuchung der die Granula enthaltenden Fraktionen (daneben auch das histochemische Verhalten der Granula) haben, abgesehen von ihrem Gehalt an Brenzcatechinen, eine gewisse Analogie mit Befunden an Mitochondrien anderer Organe ergeben (HILLARP und Mitarbeiter<sup>16</sup>). Aus diesen Ergebnissen jetzt schon weiterreichende Folgerungen zu ziehen, halten wir für bedenklich, denn bei den ihnen zugrunde liegenden Zentrifugierungsversuchen konnte innerhalb der Fraktionen nicht zwischen Granula und anderen Zellbestandteilen (zum Beispiel möglicherweise auch Mitochondrien) unterschieden werden. Der auf diesem Weg erhaltene hohe Wert des angeblichen Anteils der Granula am Zellgewicht (siehe oben) spricht zugunsten der Vermutung, dass in den Fraktionen ausser den Granula noch weitere Zellkomponenten enthalten waren. Nach unseren morphologischen Befunden ist jedenfalls für die untersuchten Tierarten an einer grundsätzlichen Unterscheidung zwischen den beiden so verschiedenen gestalteten Zellorganellen - phäochromen Granula und Mitochondrien - in den Markzellen unbedingt festzuhalten.

Im Vorausgehenden wurden die bisherigen Beobachtungen an den phäochromen Granula in den Markzellen der Maus mitgeteilt. Bei Meerschweinchen und Katze zeigen die Granula ein sehr ähnliches Bild. Allerdings sind in den Markzellen des Meerschweinchens die manche Granula umgebenden «Höfe» sehr viel kleiner. Die oben gegebene Deutung der «Höfe» - als Stellen herausgelöster Lipide - findet hier eine weitere Stütze in dem Befund BACHMANNS<sup>17</sup>, nach dem gerade beim Meerschweinchen sudanophile Substanz in den Markzellen nur selten nachzuweisen war.

Schliesslich ist noch zu bemerken, dass die beschriebenen phäochromen Granula bei den untersuchten Tierarten zwar in den meisten, aber nicht in allen Markzellen anzutreffen sind. Über die Beobachtung zweier differenter Arten von Parenchymzellen des Nebennierenmarks wird demnächst an anderer Stelle<sup>18</sup> berichtet werden.

F. S. SJÖSTRAND und R. WETZSTEIN

*Karolinska Institutet, Anatomiska Institutionen, Stockholm, und Institut für Histologie und experimentelle Biologie der Universität, München, den 18. Januar 1956.*

### Summary

The catechol-containing granules in the adrenal medullary cells (mouse, guinea pig, cat) are true cell

organells, clearly distinguished from mitochondria; their size varies over a fairly wide range, the mean diameter being calculated at about 175 m $\mu$  in the mouse (osmium-tetroxide-fixation). They have a surrounding membrane of 100 Å thickness; their internal structure is finely granular. On the thin sections, many granules are surrounded by spaces which appear empty under the electron microscope and which are limited by double-membranes; it is most likely that *intra vitam* these spaces contain lipids.

### STUDIORUM PROGRESSUS

#### The Influence of a Queen on the Ovary Development in Worker Bees

By STIJN VOOGD, Utrecht<sup>1</sup>

During the last few years experiments have been carried out on the relation between queen and worker bees in a colony of honeybees (*Apis mellifica* L.). This problem has been approached in two different manners with regard to the testing method used in establishing the absence or presence of a queen: BUTLER<sup>2</sup> used *building of emergency queen cells* by worker bees as criterion, whereas DE GROOT and VOOGD<sup>3</sup> and VOOGD<sup>4</sup> used *ovary development* in worker bees. The experiments of BUTLER strongly suggest that bees obtain some substance from their queen which inhibits them from building emergency queen cells. The experiments of DE GROOT and VOOGD, and VOOGD have demonstrated the existence of a substance present on the body of a queen which is responsible for the inhibition of ovary development in worker bees.

Moreover, experiments on the ovary development in worker bees were set up by Miss PAIN<sup>5</sup>. Most of these experiments are open to criticism in different respects. Several theories concerning the factors regulating the development of the ovaries were put forward by Miss PAIN<sup>6</sup>.

According to one of these theories, ovary development would depend on the presence of a "fertility hormone" in worker bees, normally *transmitted to the queen*, but accumulating in the case of her absence<sup>7</sup>. At the same time a substance on the body of the queen *transmitted to the worker bees* and inhibiting ovary development is assumed to be proven<sup>8</sup> by experiments which, in a subsequent paper, were considered as inconclusive by the author herself<sup>9</sup>. Slightly more convincing are the results of Miss PAIN's experiments with pieces of elder-pith impregnated with chloroform extracts of queens. The scanty data given are quite insufficient to justify the assumption of attractiveness and inhibitory effect with regard to these impregnated objects<sup>10</sup>. In order to

<sup>1</sup> Laboratory of Comparative Physiology, University of Utrecht.

<sup>2</sup> C. G. BUTLER, Trans. Roy. entomol. Soc. London 105, 11 (1954).

<sup>3</sup> A. P. DE GROOT and C. VOOGD, Exper. 10, 384 (1954).

<sup>4</sup> C. VOOGD, Exper. 11, 181 (1955).

<sup>5</sup> J. PAIN, Arch. int. Physiol. 59, 203 (1961); C. r. Acad. Sci. 240, 670 (1955).

<sup>6</sup> J. PAIN, C. r. Soc. Biol. 145, 1505 (1951).

<sup>7</sup> J. PAIN, Insectes Sociaux 1, 59 (1954).

<sup>8</sup> J. PAIN, C. r. Acad. Sci. 239, 1869 (1954).

<sup>9</sup> J. PAIN, Insectes Sociaux 2, 35 (1955).

<sup>10</sup> J. PAIN, C. r. Acad. Sci. 239, 1869 (1954); 240, 670 (1955).

<sup>14</sup> F. S. SJÖSTRAND, Nature 171, 30 (1953).

<sup>15</sup> F. S. SJÖSTRAND und J. RHODIN, Exper. Cell Res. 4, 426 (1953).

<sup>16</sup> N.-Å. HILLARP, B. HÖKFELT und B. NILSON, Acta anat. 21, 155 (1954). - N.-Å. HILLARP und B. NILSON, Acta physiol. Scand. 31, Suppl. 113, 79 (1954); 32, 11 (1954).

<sup>17</sup> R. BACHMANN, Z. mikrosk.-anat. Forsch. 45, 157 (1939).

<sup>18</sup> R. WETZSTEIN (in Vorbereitung).