

It is not unlikely that the association of the factors for Thalassemia and for absence of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in erythrocytes presumably present in the families studied by MARCOLONGO was fortuitous, since both Thalassemia and Favism are common findings in Sardinia. The presence of this defect in 3 out of the 6 cases of Hemoglobin-H disease studied is interesting, particularly in view of the finding that absence of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity was found in 2.22% of 225 healthy Chinese male blood donors and in 2.63% of 76 Chinese male new-borns studied (VELLA). Absence of this enzyme in some cases of Hemoglobin-H disease may explain the severity of hemolysis occasionally seen in some patients.

F. VELLA

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Malaya in Singapore, September 14, 1959.

### Résumé

L'activité de la glucose-6-phosphate déhydrogénase était normale dans les érythrocytes obtenus de sujets atteints de Thalassémie (majeure ou mineure) d'Hémoglobine E – Thalassémie et dans des érythrocytes contenant une variété d'hémoglobines anormales. Chez trois des six sujets atteints d'Hémoglobine H – Thalassémie, la glucose-6-phosphate déhydrogénase était absente.

### Effect of Testosterone on the Nuclear Volume of Exorbital Lacrimal Glands of the White Rat (*Glandula lacrimalis praeparotidea*)

Recent studies have demonstrated that the exorbital lacrimal glands (Loewenthal's glands) of the white rat present a sexual dimorphism and that their morphology undergoes modifications after castration and/or administration of male sex hormones (GABE<sup>1</sup>; BAQUICHE<sup>2,3</sup>; DUCOMMUN *et al.*<sup>4</sup>). Similar observations were made by others, who have however erroneously considered this glands as a parotid gland, or as a part of it, owing to the close topographical relationships between these two structures (PARHON *et al.*<sup>5</sup>; CAVALLERO and PINI<sup>6</sup>).

Caryometric studies on exorbital lacrimal glands of the rat have been published by COLLIN and FLORENTIN<sup>7</sup>, COLLIN and GRUJIC<sup>8</sup> and TEIR<sup>9</sup>. However, in these researches the attempt was made to determine the variability of the nuclear volumes and their distribution in normal conditions. Conversely, it has been our aim to establish whether castration and/or administration of testosterone propionate in the male rat is capable of inducing changes in the nuclear volumes of Loewenthal's glands, in order to give further support to the suggested rôle of these glands as a target organ of male sex hormones.

Twenty adult male white rats of the same strain, about two months old and weighing 150–200 g were employed; they were fed a standard diet and had free access to water.

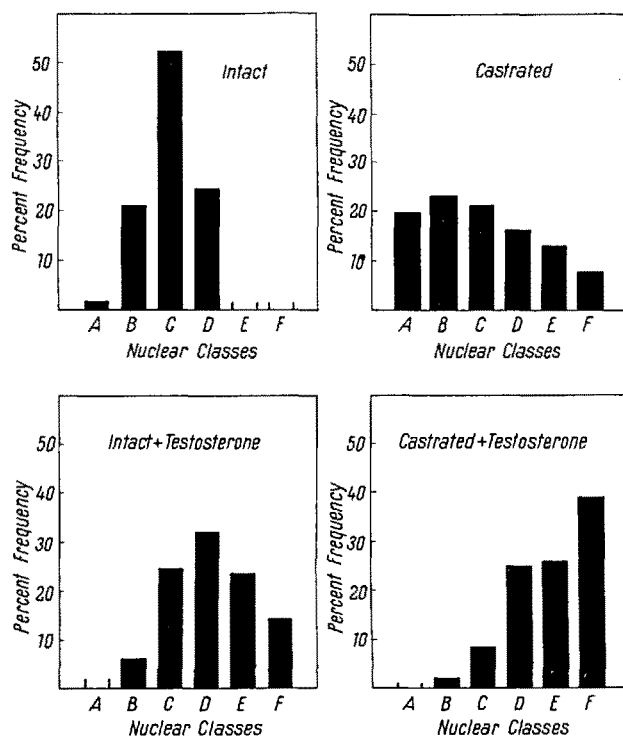
Two experimental groups of animals were considered: the first one was composed of intact rats, with and without testosterone treatment; in the second set, castrated rats, untreated and treated with the hormone, were examined, the orchietomy having been performed 60 days before the beginning of the experiment. Testosterone propionate was given subcutaneously, dissolved in Tween 80, 1 mg daily for 20 days.

At the end of the experimental period the animals were killed by decapitation; the exorbital lacrimal glands were removed, fixed in Bouin's fluid, and embedded in paraffin. Nuclear volumes were measured in 10  $\mu$  sections, stained with hematoxylin-eosin. For the measurements, only regular nuclei were selected, 300 nuclei for each gland, and two perpendicular diameters measured at 2000 magnification. The volume  $V$  of the nucleus was calculated by means of the formula:

$$V = \pi/6 [D_1 + D_2]^3/2,$$

where  $D_1$  and  $D_2$  are the two nuclear diameters considered. The values were grouped in to six classes, starting from a volume of less than 120  $\mu^3$  up to a volume of more than 700  $\mu^3$ , and the relative percent frequency was calculated. The following nuclear classes were established:  $A = < 120 \mu^3$ ;  $B = 121-199 \mu^3$ ;  $C = 200-299 \mu^3$ ;  $D = 300$  to  $449 \mu^3$ ;  $E = 450-699 \mu^3$ ;  $F = > 700 \mu^3$ .

The results of the experiments are shown by histograms. Figure 1 refers to intact, untreated animals; it appears that normally the highest incidence of the nuclear volumes falls in the class between 200 and 299  $\mu^3$  (mean nuclear volume 279  $\mu^3$ ). Untreated rats, castrated two months earlier, present a wide dispersion of nuclear volumes, as shown by Figure 2, the highest incidence being at a lower level than in intact animals (mean nuclear volume 320  $\mu^3$ ). Figure 3 and 4 refer to testosterone-treated rats; they



<sup>1</sup> M. GABE, C. R. Soc. Biol., Paris 149, 223 (1955).

<sup>2</sup> M. BAQUICHE, Thèse Univ. Genève 5, 1 (1958).

<sup>3</sup> M. BAQUICHE, Acta anat. 36, 247 (1959).

<sup>4</sup> P. DUCOMMUN *et al.*, Acta endocrinol. 30, 78 (1959).

<sup>5</sup> C. I. PARHON *et al.*, Bul. Sci. Seş. St. med. 7, 3 (1955).

<sup>6</sup> C. CAVALLERO and C. E. PINI, Atti Soc. lomb. Sci. med. biol. 13, 196 (1958).

<sup>7</sup> R. COLLIN and P. FLORENTIN, C. R. Soc. Biol., Paris 104, 1279 (1930).

<sup>8</sup> R. COLLIN and M. GRUJIC, C. R. Soc. Biol., Paris 109, 472 (1932).

<sup>9</sup> H. TEIR, Acta path. microbiol. scand., Suppl. 58 (1944).

indicate that this treatment causes a deviation to right of nuclear volumes, both in intact and castrated animals. A high percentage of the highest nuclear classes, up to and over  $700 \mu^3$ , is particularly evident in castrated, testosterone-treated rats. In the latter two groups, the mean nuclear volumes are 452 and  $637 \mu^3$  respectively.

From our investigation it appears that castration in adult male rats elicits in exorbital lacrimal glands a relative prevalence of the lower nuclear classes. Moreover it appears that, both in intact and castrated animals, but more evidently in the latter, testosterone treatment results in an increased percentage of the highest nuclear classes, i. e. in hypertrophic nuclear changes.

It is noteworthy that this nuclear hypertrophy is closely connected to the onset of structural changes of the glands; actually, it has been shown that testosterone treatment produces in the glands an alveolar structure, bearing a mucous secreting pattern, different from the acinar and serous one existing normally (CAVALLERO and PINI<sup>6</sup>).

These observations give further support to the view that the exorbital lacrimal glands of the white rat might be considered as a target organ of male sex hormones.

C. CAVALLERO and P. MORERA

*Istituto di Anatomia e Istologia patologica, Università di Pavia (Italy), May 30, 1959.*

#### Riassunto

La ghiandola lacrimale extraorbitale (ghiandola di Loewenthal) del ratto albino presenta modificazioni nucleari in seguito a castrazione ed a somministrazione di propionato di testosterone. La castrazione determina una prevalenza delle classi nucleari più basse, mentre la somministrazione di ormone maschile aumenta la percentuale delle classi più alte. L'ipertrofia nucleare è al massimo evidente in ratti castrati e trattati con ormone.

## PRO EXPERIMENTIS

### Zur Methodik der Gefrierschnitt-Mikroautoradiographie

Das Studium der Verteilung inhalierten Radons im Tierkörper in mikroskopischen Dimensionen hat uns vor die Aufgabe gestellt, autoradiographisch Lokalisationen seines  $\alpha$ -strahlenden Folgeproduktes RaF (=  $\text{Po}^{210}$ ) nachzuweisen<sup>1</sup>.

Die Gefahr einer Extraktion oder Translokation eines Radioelementes bei der üblichen histologischen Vorbehandlung des Gewebes ist bekannt und im vorliegenden Fall besonders gross, da weder das Radon noch seine Folgeprodukte in chemische Verbindungen eingebaut werden, weil der Zerfall des Radons in flüssiger Luft vor sich geht. Auch eine Fixierung durch Gefriertrocknung konnte nicht befriedigen, da bei der nicht zu umgehenden Einbettung des Gewebes in Paraffin oder Carbowachs die Möglichkeit einer innergeweblichen Verlagerung des Radioelementes nicht auszuschliessen ist.

In üblicher Weise hergestellte Gefrierschnitte unfixierter Organe tauten während des Schneidens auf und zeigten keine einheitlichen Schnittdicken. Erst die Verwendung einer Spezial-Kühlkammer mit eingebautem Mikrotom<sup>2</sup> ermöglichte die Herstellung einwandfreier nativer Organschnitte und schaltete eine Verwischung der Aktivität aus.

Während TAUGNER und WAGENMANN<sup>3</sup> nach Beendigung der Exposition Gefrierschnitt und Film voneinander trennen und das Autoradiogramm mit dem histologischen Bild eines Nachbarschnittes vergleichen mussten, erstrebten wir, den zur Erzeugung des Autoradiogramms benutzten Schnitt auch während des photographischen Entwickelns und allen weiteren Behandlungen mit dem Film in Kontakt zu belassen.

Wir erreichten dies auf folgende Weise:

Die  $5 \mu$  dicken Schnitte werden auf einem gereinigten, gut entfetteten Objektträger gestreckt. Auf der rauhen Oberfläche eines mit Gelatine überzogenen Objektträgers, wie man ihn üblicherweise für das stripping-Verfahren benutzt<sup>4</sup>, erhält man keine faltenfreien Schnitte. Die Präparate bleiben noch etwa 2 h zur Trocknung im Innenraum des Kryostaten, werden dann entweder bis zum Folgetag in einer Kühltruhe bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt oder unmittelbar durch kurzzeitiges Eintauchen in eine Chromalungelatine-Lösung (0,5 g Chromalaun und 5,0 g Gelatine auf  $1000 \text{ cm}^3$  aqua destillata) hauchdünn überzogen. GUIDOTTI und PASSALACQUA<sup>5</sup> empfehlen eine Schutzschicht zwischen Gewebe und Film in Form eines Plexiglas-Überzugs (1%ige Lösung in Chloroform). Die Verwendung von Plexiglas hat den Nachteil, dass die Schnitte vor der Exposition gefärbt werden müssen, weil der Farbstoff die Schutzschicht nicht zu durchdringen vermag.

Während Expositionen über mehrere Wochen hinweg erfährt das native Gewebe leicht Veränderungen, die durch Aufbewahrung in der Kühltruhe bei  $-15$  bis  $-20^\circ\text{C}$  ausgeschaltet werden können. Die tiefen Temperaturen schaden zwar den Emulsionen nicht, setzen jedoch ihre photographische Empfindlichkeit herab<sup>6</sup>. Wir sind deshalb zur Kühltrocknung-Exposition ( $2-4^\circ\text{C}$ ) zurückgekehrt, haben aber zur Minderung der Gewebsautolyse die Exposition in einer  $\text{N}_2$ -Atmosphäre in Präparatekästen im Exsikkator vorgenommen. Diese Massnahme reduzierte auch das «fading»<sup>6-8</sup>. ALBOUY und FARAGGI<sup>7</sup> haben die Wirkung der Veränderung der Zusammensetzung der die Emulsion umgebenden Atmosphäre bei konstanter Temperatur und konstanter relativer Feuchtigkeit geprüft und fanden zum Beispiel für die ILFORD C2 Kern-Emulsion, dass die fading-Rate in reinem Sauerstoff doppelt so gross wie in Luft und zehnmal so gross wie in Stickstoff ist.

Die Schnitte lassen sich nach dem photographischen Entwickeln durch die beiden für Farbstoff (zum Beispiel Hämatoxylin nach BÖHMER und Erythrosin) permeablen Schichten hindurch anfärben. Bei der Differenzierung in angesäuertem Alkohol entfärben sich die Gelatineschichten schneller als das Gewebe, so dass die in Glyzeringelatine eingedeckten Präparate mikroskopisch gut auswertbar sind (Abb.). Der Glyzeringelatine wurden zur Konservierung 0,5 g Karbolsäurekristalle/100 g Glyzeringelatine zugesetzt.

<sup>1</sup> A. SCHRAUB, B. RAJEWSKY, E. REINHOLZ, CHR. WIRTH und V. BELLOCH-ZIMMERMANN, *Die Verteilung inhalierten Radons im Organismus*, Abhandlungen des IX. Int. Congresses für Radiologie (München 1959), im Druck.

<sup>2</sup> «Kryostat», System Dittes-Duspiva.

<sup>3</sup> R. TAUGNER und U. WAGENMANN, Arch. exp. Path. Pharm. 234, 336 (1958).

<sup>4</sup> G. A. BOYD, *Autoradiography in Biology and Medicine* (Acad. Press Inc., New York 1955).

<sup>5</sup> G. GUIDOTTI und F. PASSALACQUA, Exper. 12, 117 (1956).

<sup>6</sup> A. BEISER, Rev. mod. Phys. 24, 275 (1952).

<sup>7</sup> G. ALBOUY und H. FARAGGI, J. Phys. Radium 10, 105 (1949).

<sup>8</sup> W. LOHMANN, Z. Naturf. 11a, 592 (1956).

<sup>9</sup> B. RAJEWSKY, *Naturforschung und Medizin in Deutschland 1939-1946*, Bd. 21, Biophysik, Teil I, p. 169.