

The Effect of Hypothermia Applied in the Given Stages of Pregnancy on the Number and Form of Vertebrae in the Offspring of White Mice

It has been experimentally stated¹⁻³ that fishes show a strong correlation between the temperature of incubation and the number and arrangement of arising somites, which in turn determine the number of vertebrae. Some experiments of this kind have also been carried out on amphibia; the preliminary results appear to be similar⁴.

In 1963, the author initiated an experiment with mammals. Mice used for the experiment came from an isolated colony inbred for 5 years. The skeletons of 60 newly-born specimens of this colony, examined before the experiment was started, did not show any anomalies. The oestral cycle of the females was determined by the vaginal smear method. Each pro-oestrus female was kept with one potent male overnight. The next morning the females showing vaginal plug were assigned to one of the six groups (denoted by the letters A–F) of the series I or II. In group A the body temperature was reduced on day 7½ of pregnancy (formation of the first somites in embryos⁵), in group B the temperature was reduced on day 8½ etc., until in group F hypothermia was applied on day 12½ of pregnancy, i.e. when formation of the last somites was over. In series I the body temperature was reduced to 20°C, i.e. ca. 16°C, and in series II to 25°C, i.e. ca. 11°C. In both series hypothermia lasted for 24 h. The females being given intramuscular injections of chlorpromazin (10 mg/kg) were cooled to the required temperature by putting them into a refrigerator. In series I, from 737 pregnant females subjected to hypothermia, 59 gave birth

to 253 youngsters, 131 of which had inborn anomalies of the vertebral column. In series II, from 216 pregnant females subjected to hypothermia 55 gave birth to 281 youngsters, 50 of which showed inborn malformations of the vertebral column.

The control females were treated analogically: they were injected with the same amounts of chlorpromazin at the same stages of pregnancy (the groups A–F), and in order to prevent their body temperature from being reduced to that of the environment, the females were put into an incubator. In the control series, the total number of pregnant females amounted to 42; 34 of them gave birth to 175 youngsters, 9 of which showed anomalies of the vertebral column. In all probability some females were taken from the incubator too early so that their body temperature was reduced to that of the environment, and this fact fully explains the found anomalies.

The investigated material was cleared in potassium hydroxide with glycerol, the skeletons being simultaneously stained with alizarin.

We have found two kinds of malformation of the vertebral column: (1) changes in the number of vertebrae in the given region: e.g. six instead of seven cervical vertebrae (Figure 1), twelve (sometimes eleven – Figure 2)

¹ J. ORSKA, Zool. Pol. 7, 271 (1956).

² J. ORSKA, Zool. Pol. 12, 309 (1962).

³ J. ORSKA, Acta biol. cracoviensia 5, 327 (1962).

⁴ J. ORSKA and Z. IMIOLEK, Acta univers. wratislaviensis 3, 137 (1962).

⁵ E. M. OTIS and R. BRENT, Anat. Rec. 120, 33 (1954).

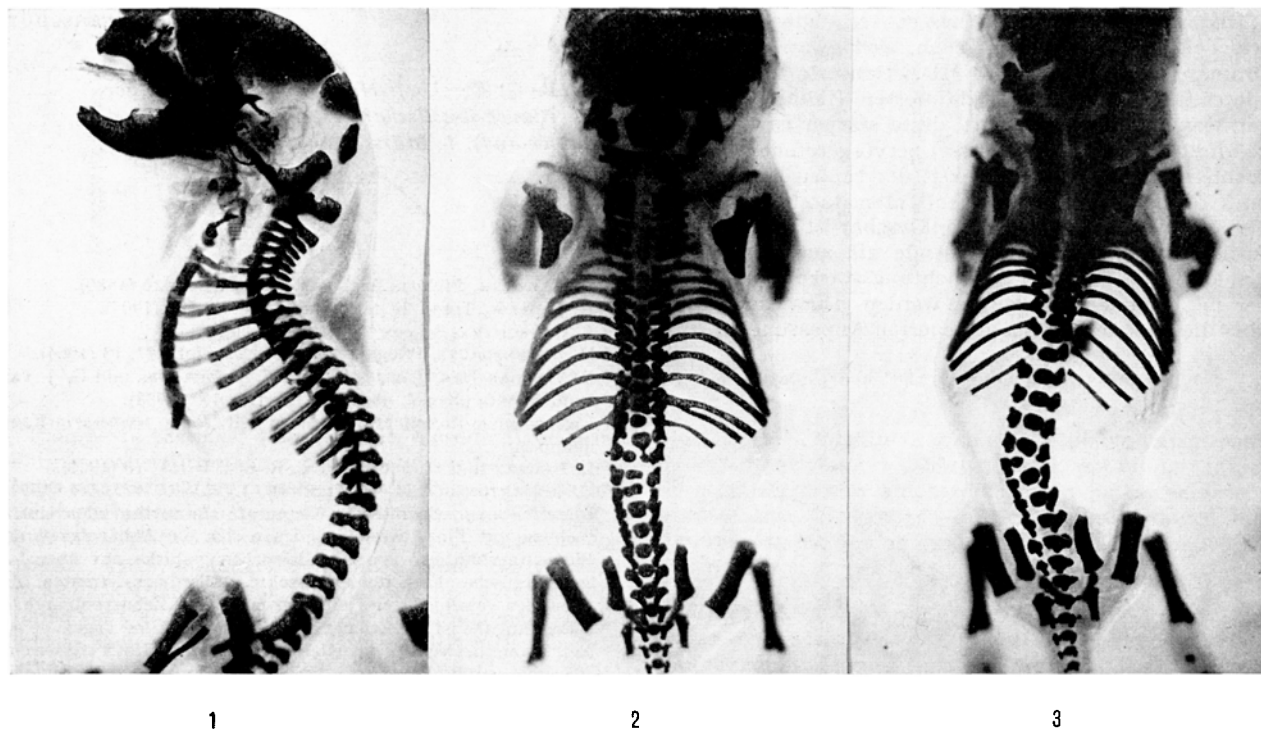


Fig. 1. The offspring of a female, group A, series II. The occurrence of six cervical vertebrae.

Fig. 2. The offspring of a female, group C, series I. Eleven thoracic vertebrae instead of thirteen, in the penultimate thoracic vertebra a double centrum and a fused double rib. The first lumbar vertebra

shows a split centrum, its second half being fused with the centrum of the preceding vertebra.

Fig. 3. The offspring of a female, group C, series I. In the lumbar region the occurrence of wedge-shaped semi-vertebra causing a distinct scoliosis.

thoracic vertebrae (in the control thirteen), five, and in some cases four lumbar vertebrae (in controls six). (2) Teratological changes consisting of: the fusion of the centra and arches of two or more neighbouring vertebrae, presence of split-out centra (Figure 2) and wedge-shaped side half-vertebrae (Figure 3) lacking their symmetric half, usually associated with scoliosis. In the thoracic region these anomalies were associated with asymmetry in the number of ribs on the two sides of the body.

In the offspring of series I, the anomalies involved chiefly the teratological cases mentioned above combined with changes in the number of vertebrae. In series II the anomalies consisted mostly in a reduced number of vertebrae in the given region, with or without teratological changes.

A preliminary analysis of the results allows the conclusion that, as in fishes and amphibia¹⁻⁴, the temperature during the period of segmentation and the number and arrangement of somites in an embryo are closely related.

The anomalies of the vertebral column induced by hypothermia are similar to those induced by X-rays⁵ and hypoxia^{7,8}; they resemble also some inborn anomalies of the vertebral column encountered in man⁹⁻¹¹.

Zusammenfassung. Trächtige Mäuseweibchen wurden in der Zeit zwischen dem 7¹/₂ und 12¹/₂ Tag der Gravidität im Hypothermieverfahren während eines Tages auf einer Körpertemperatur von 20°C oder 25°C gehalten. Insgesamt wurden 953 Tiere verwendet, von denen 114 insgesamt 533 Junge warfen. Von den letzteren zeigten 181 angeborene Missbildungen der Wirbelsäule, wie Reduktion der Wirbelzahl, Anomalien der Wirbelkörper und Wirbelbogen sowie Rippenanomalien.

M. LECYK

*Laboratory of Comparative Anatomy of the Zoological Institute, University of Wrocław (Poland),
March 16, 1965.*

⁶ L. B. RUSSELL, J. exp. Zool. 131, 329 (1956).

⁷ K. H. DEGENHARDT and J. KLADEZKY, Z. menschl. Vererb. Konstit. Lehre 33, 151 (1955).

⁸ U. MURAKAMI and Y. KAMEYAMA, J. Embryol. exp. Morphol. 11, 107 (1963).

⁹ G. TÖNDURY, Die Wirbelsäule in Forschung und Praxis 7, 1 (1958).

¹⁰ P. ELACHER, Wien. med. Wschr. 104, 587 (1954).

¹¹ The author is deeply indebted to Professor J. ORSKA for the most valuable advice given in the course of the experiments.

Végétalisation de l'œuf de l'oursin *Paracentrotus lividus* par l'hydrazide de l'acide isonicotinique (isoniazide)

La différenciation de l'œuf d'oursin peut être modifiée expérimentalement en soumettant les œufs à l'influence de certains agents chimiques. L'une de ces modifications, la végétalisation, se caractérise par l'hyperdéveloppement des structures entomésodermiques aux dépens des structures ectodermiques présomptives. Cet effet a d'abord été observé avec l'ion lithium¹. Récemment la végétalisation a été obtenue avec des inhibiteurs des synthèses protéiques, tels que le chloramphénicol^{2,3} et la streptomycine⁴.

Dans ce travail nous examinerons les effets de l'hydrazide de l'acide isonicotinique (isoniazide) sur l'œuf d'oursin et nous montrerons que cet agent exerce des effets végétalisants.

A la concentration la plus élevée utilisée, $6,6 \cdot 10^{-2} M$, l'isoniazide arrête le développement au cours de la segmentation.

Avec la concentration $5 \cdot 10^{-2} M$, les œufs atteignent le stade blastula; les anomalies de la segmentation sont très fréquentes, elles sont indiquées par la présence de grandes cellules incluses dans les parois de la blastula.

Les œufs traités par l'isoniazide aux concentrations respectives de 4, 3,3, et $2,5 \cdot 10^{-2} M$, s'arrêtent également au stade blastula mais le développement est moins ralenti qu'avec la concentration $5 \cdot 10^{-2} M$. Ces blastulas s'agglutinent entre elles en formant des aggrégats pouvant contenir plusieurs dizaines de larves. La zone d'adhérence est le pôle végétatif aisément identifiable grâce à l'épaississement des parois à ce niveau et à la présence de cellules mésenchymateuses primaires. Dans ces aggrégats les blastulas peuvent conserver leur individualité ou bien se fusionner complètement avec coalescence des blastocèles qui forment une cavité commune.

Les œufs traités pendant 24 h par l'isoniazide aux concentrations: 4, 3,3 et $2,5 \cdot 10^{-2} M$ puis transférés, après plusieurs lavages, dans l'eau de mer normale, se développent en larves végétalisées caractéristiques: larves avec entomésoderme volumineux, complètement évaginé et petite vésicule ectodermique à parois minces, larves avec archentéron volumineux, à parois épaisses, complètement invaginé et enfin pluteus à lobe oral étroit avec ou sans bouche et archentéron ou intestin volumineux à parois épaisses. Le degré de végétalisation obtenu augmente avec la concentration en isoniazide.

Les larves traitées au stade blastula, après la formation du mésenchyme primaire, sont également sensibles aux effets de l'isoniazide; la phase de détermination embryonnaire étant terminée, on n'observe plus que des effets inhibiteurs sur le développement de la larve. Les blastulas traitées par l'isoniazide ($1 \cdot 10^{-2} M$) cessent de se développer et dégèrent rapidement. Avec la concentration $5 \cdot 10^{-2} M$ le développement s'arrête au stade prismatique. Des pluteus sont formés avec la concentration $2,5 \cdot 10^{-2} M$. Toutes ces larves présentent une grande mobilité, même après 24 h de traitement par l'isoniazide. Ces observations indiquent que, dans ces conditions, l'isoniazide n'interfère pas avec les facteurs responsables de la mobilité des larves.

L'isoniazide et le chlorure de lithium, utilisés ensemble, chacun à une concentration dépourvue d'effets végétalisants, renforcent mutuellement leurs effets et les larves traitées sont fortement végétalisées. Réciproquement, l'isoniazide renverse complètement les effets animalisants d'agents tels que les ions zinc et le bleu d'Evans.

¹ C. HERBST, Z. wiss. Zool. 55, 446 (1892).

² R. LALLIER, J. Embryol. exp. Morph. 10, 563 (1962).

³ S. HÖRSTADIUS, Devl. Biol. 7, 144 (1963).

⁴ R. LALLIER, C. r. Soc. Biol. 156, 1249 (1962).