

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 amphibia<sup>1-4</sup>, 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-rays<sup>5</sup> and hypoxia<sup>7,8</sup>; they resemble also some inborn anomalies of the vertebral column encountered in man<sup>9-11</sup>.

**Zusammenfassung.** Trächtige Mäuseweibchen wurden in der Zeit zwischen dem 7<sup>1</sup>/<sub>2</sub> und 12<sup>1</sup>/<sub>2</sub> 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.*

<sup>6</sup> L. B. RUSSELL, J. exp. Zool. 131, 329 (1956).

<sup>7</sup> K. H. DEGENHARDT and J. KLADETZKY, Z. menschl. Vererb. Konstit. Lehre 33, 151 (1955).

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

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

<sup>10</sup> P. ELACHER, Wien. med. Wschr. 104, 587 (1954).

<sup>11</sup> 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 lithium<sup>1</sup>. Récemment la végétalisation a été obtenue avec des inhibiteurs des synthèses protéiques, tels que le chloramphénicol<sup>2,3</sup> et la streptomycine<sup>4</sup>.

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 prisma-tique. 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.

<sup>1</sup> C. HERBST, Z. wiss. Zool. 55, 446 (1892).

<sup>2</sup> R. LALLIER, J. Embryol. exp. Morph. 10, 563 (1962).

<sup>3</sup> S. HÖRSTADIUS, Devl. Biol. 7, 144 (1963).

<sup>4</sup> R. LALLIER, C. r. Soc. Biol. 156, 1249 (1962).

L'isoniazide interfère avec le fonctionnement de différentes enzymes. Elle inhibe la diphosphopyridine nucléotidase chez l'oursin<sup>5</sup>. Elle déprime l'activité des enzymes fonctionnant avec le phosphate de pyridoxal comme coenzyme. Certaines de ces enzymes jouent un rôle important dans le métabolisme des protéines. Nous n'avons toutefois pas observé d'effets végétalisants chez les œufs traités par différents inhibiteurs de la diphosphopyridine nucléotidase et des enzymes à phosphate de pyridoxal. HULTIN<sup>6</sup> a montré récemment que le chloramphénicol, à concentration élevée, inhibe l'incorporation de la valine dans les protéines de l'œuf d'oursin et empêche l'activation des ribosomes et la formation des polyribosomes nécessaires aux synthèses protéiques. Le chloramphénicol partage d'ailleurs ces propriétés avec le dinitrophénol et le cyanure, deux agents qui se sont montrés, dans certaines conditions, capables d'exercer une influence végétalisante sur l'œuf d'oursin<sup>7,8</sup>. Selon des recherches effectuées sur différents organismes, le chloramphénicol interférerait avec la fixation de l'acide ribonucléique messager sur les ribosomes<sup>9</sup>. Les effets comparables exercés sur la segmentation et la détermination embryonnaire par le chloramphénicol et l'isoniazide suggèrent que cette dernière substance interfère probablement avec la synthèse des protéines par un mécanisme analogue à celui du chloramphénicol. Nous signalerons pour terminer, les très intéressantes recherches de LUBIN<sup>10</sup>. Cet auteur a montré que les ions potassium sont nécessaires à l'établissement des synthèses protéiques. Les ions lithium sont capables d'entrer en compétition avec les ions potassium et d'empêcher son action initiatrice sur les synthèses protéiques. Or, chez l'oursin, les ions potassium protègent les œufs contre les effets des ions lithium<sup>11,12</sup>. Ces études ouvrent une voie d'approche intéressante pour l'étude du mode d'action des ions lithium chez l'oursin. L'ensemble de ces données indique que les synthèses protéiques dont l'œuf est le siège pendant

la période de détermination embryonnaire, c'est à dire jusqu'au stade blastula-mésenchyme, jouent un rôle essentiel dans le processus de la détermination embryonnaire. Les synthèses protéiques liées à la détermination des structures ectodermiques seraient plus sensibles aux effets des agents végétalisants que les synthèses protéiques responsables de la détermination des structures entomésodermiques.

**Summary.** Isonicotinic acid hydrazide (isoniazid) causes vegetalization of whole larvae of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. The effects of isoniazid are compared with those of chloramphenicol and lithium ions. The protein synthesis during the phase of reversible determination, i.e. to the late blastula stage, appears to be of paramount importance in the differentiation of larvae. It is suggested that the protein synthesis connected with the determination of ectodermal structures is more sensitive to the action of vegetalizing agents than the protein synthesis connected with the determination of entomesodermal structures.

R. LALLIER

Station Zoologique, Villefranche-sur-Mer (A.M., France),  
le 6 avril 1965.

<sup>5</sup> T. FUJII et T. OHNISHI, J. Fac. Sci., Univ. Tokyo 9, 333 (1962).

<sup>6</sup> T. HULTIN, Expl. Cell Res. 34, 608 (1964).

<sup>7</sup> S. HÖRSTADIUS, J. Embryol. exp. Morph. 7, 327 (1953).

<sup>8</sup> G. CZIHAK, Wilhelm Roux Arch. Entw.-Mech. 154, 272 (1963).

<sup>9</sup> A. S. WEISBERGER et S. WOLFE, Fed. Proc. 23, 976 (1964).

<sup>10</sup> M. LUBIN, Fedn. Proc. Fedn. Am. Socs. exp. Biol. 23, 994 (1964).

<sup>11</sup> J. RUNNSTRÖM, Acta zool. Stockh. 9, 365 (1928).

<sup>12</sup> R. LALLIER, Ex. Cell Res. 27, 556 (1960).

## The Effect of Various Diuretic Agents on Renal Electrolyte and Urea Concentration Gradients in Rats

In 1951 it was established by WIRZ, HARGITAY, and KUHN<sup>1</sup> that a tissue fluid osmolarity gradient exists from the renal cortex towards the tip of the papilla. Very little is known concerning how this osmolarity gradient is changed by various diuretic agents. In this preliminary report small samples of tissue from the tip of the papilla, inner medulla, outer medulla, and renal cortex after administration of various diuretic agents in therapeutic doses at the moment of maximal urine flow were analysed for sodium, potassium, and urea and the concentrations per 1 l of tissue water compared with the values in urine samples obtained just before sacrificing the animals.

The urine flow 1–2 h after intravenous injection of Aminophylline (12 mg/kg) was 2 times, and natriuresis 5 times higher than in the control group; nevertheless, the concentration of sodium, potassium and urea in all renal tissue samples did not differ significantly from control values (Figure A). If, however, the rats were sacrificed only 10–15 min after Aminophylline injection, a decrease in papillary sodium concentration was observed. After

Meralluride or Salyrgan administration (2–4 mg Hg/kg) there were no changes in the concentration of sodium and urea in any tissue sample. On the contrary, a decrease in potassium concentration in the cortex and papilla was always found (Figure B). Figure C shows the changes in sodium gradient after acetazolamide (2 mg/kg), chlorothiazide (2–6 mg/kg), and hydrochlorothiazide (3 mg/kg) administration. Their effect on the urea concentration gradient was very similar. The concentration of potassium in the cortex was decreased by all three sulphonamides. Furosemid (Lasix, 20 mg/kg i.v.), however, caused a total disappearance of sodium and urea concentration gradients without any effect on the potassium concentration.

The acceleration of tubular urine flow in Henle's loops after infusion of hypertonic mannitol solution diminishes or abolishes the sodium concentration gradients, so-called 'washout effect', as shown by MALVIN and WILDE<sup>2</sup>. Diuretics which inhibit the reabsorption of electrolytes in the proximal tubule, could work via this 'washout'

<sup>1</sup> H. WIRZ, B. HARGITAY, and W. KUHN, Helv. physiol. Acta 9, 196 (1951).

<sup>2</sup> R. L. MALVIN and W. S. WILDE, Am. J. Physiol. 197, 177 (1959).