

terminals were also present in the large smooth muscles surrounding the tactile hair forming a typical autonomic ground plexus consisting mainly of strands of several adrenergic nerve terminals (Figure B). The large number of Pacinian corpuscles present close to the carpal tactile hair did not contain any adrenergic nerve terminals.

Around the hair sheath of the vibrissae adrenergic terminals were more thinly scattered. The surrounding striated muscles had no adrenergic innervation. No fluorescent nerve terminals were apparent after treatment with reserpine.

The main morphological difference between the ordinary hair with its fast adapting receptors and the tactile hair with its extremely slowly adapting mechanoreceptors<sup>8,13</sup> is the characteristic vascular sinus around the root proper in the latter. The exact function of this blood sinus is still unknown and its effect on the receptors has been the subject of a great deal of speculation<sup>8</sup>. The adrenergic terminals observed around the hair sheath may exert the same effect on the hair receptors as that suggested above for the adrenergic terminals in frog skin on the touch receptors. The presence of a strong adrenergic plexus innervating the smooth muscles surrounding the sinus of the carpal hairs is also noteworthy in this context. Thus, besides a direct effect of CA released inside the

blood sinus, the sympathetic nervous system may also exert an indirect action on the hair receptors through changes in the mechanical properties of the sinus or in the intrasinal pressure<sup>14</sup>.

**Zusammenfassung.** Es ist bekannt, dass gewisse Mechanorezeptoren durch Reizung sympathischer Nerven beeinflusst werden. Histochemisch war es möglich, adrenerge Nerven in Hautschichten des Frosches mit Berührungsrezeptoren nachzuweisen. In Pacinischen Körperchen der Katze wurde keine adrenerge Innervation gefunden, hingegen freie adrenerge Nervenendigungen an den Wurzelscheiden verschiedener Tasthaare.

K. FUXE and B. Y. NILSSON

*Departments of Histology and Physiology, Karolinska Institutet, Stockholm (Sweden), April 10, 1965.*

<sup>13</sup> O. FITZGERALD, J. Physiol., Lond. 98, 163 (1940).

<sup>14</sup> Acknowledgments: This work has been supported by grants from the Swedish State Medical Research Council and by a Public Health Service Research Grant (NB 05236-01) from the National Institute of Neurological Diseases and Blindness, Bethesda (USA).

### Azione del virus poliomielitico e Coxsackie sulle cellule renali di scimmia (*Macaca mulatta* Shaw)

Vari autori<sup>1-6</sup> hanno potuto constatare che per opera di fattori vari, il nucleolo delle cellule può andare incontro ad apprezzabili modificazioni. In particolare DURYEE<sup>1</sup> ha sostenuto che l'adenocarcinoma di Lucké di *Rana pipiens* è una malattia da virus del nucleolo cellulare, e BOLOGNARI<sup>3,4</sup> ha ammesso che in generale l'organite cellulare che per primo risentirebbe dei fattori oncogeni, sarebbe il nucleolo stesso. Fra i fattori che possono provocare tale azione vanno annoverati appunto i virus, per cui assumono sempre più importanza quelle ricerche dirette ad accertarne l'azione citopatica. Abbiamo voluto pertanto condurre delle indagini per osservare, con l'ausilio di varie tecniche, le manifestazioni cui va incontro il nucleolo in cellule infettate con determinati virus.

Allo scopo ci siamo serviti di colture primarie monostratificate di cellule epiteliali di rene di *Macaca mulatta*, in cui dopo 6-8 giorni di coltura è stata effettuata l'infezione con virus poliomielitico tipo I ceppo Brunhilde e virus Coxsackie B<sub>1</sub>.

I gruppi cellulari considerati sono stati: (a) cellule appena tripsinizzate; (b) cellule tenute in coltura per 6-8 giorni; (c) cellule infettate con virus poliomielitico e fissate a 17 h dall'infezione; (d) cellule infettate con virus Coxsackie e fissate a 41 h dall'infezione.

Le colture cellulari sono state fatte sviluppare su vetrini coprioggetti, fissati in Bouin e quindi colorate con il GALGANO I<sup>7</sup> e con il Dominici. Per le osservazioni al microscopio di fluorescenza le colture cellulari sono state fissate in formalina al 10% e trattate con arancio acridina secondo BERTALANFFY<sup>8</sup>. I nucleolini sono stati posti in evidenza dopo fissazione in liquido di Cajal e impregnazione con cloruro di platino<sup>9</sup>. Per le osservazioni al microscopio elettronico le cellule staccate dai tubi di coltura

mediante tripsinizzazione, sono state fissate in OsO<sub>4</sub> al 2% secondo Palade e incluse in miscele di metacrilati di butile e di metile (8 parti e 2 parti).

Sono stati ancora misurati i nuclei con relativi nucleoli di 400 cellule per ogni gruppo considerato e costruiti dei diagrammi cartesiani con i logaritmi dei volumi nucleari (in ascissa) e nucleolari (in ordinata). I dati ottenuti sono stati quindi elaborati secondo il metodo di LAMOTTE<sup>10</sup>.

Nelle cellule appena tripsinizzate del rene di *Macaca mulatta* il nucleo è apparso piuttosto rotondo, con un piccolo nucleolo posto eccentricamente colorabile col metodo Galgano I in rosso e con il metodo Dominici in azzurro. Nello stesso nucleo i nucleolini sono risultati quasi sempre assenti, al microscopio di fluorescenza si è notata per lo più fluorescenza rossa. Le stesse cellule tenute in coltura si sono presentate con nucleo notevolmente sviluppato, con nucleolo pur esso voluminoso e di forma estremamente variabile. Sono stati altresì rilevati nucleoli doppi, ora di uguali ora di diverse dimensioni,

<sup>1</sup> W. R. DURYEE, Ann. N.Y. Acad. Sci. 63, 1280 (1956).

<sup>2</sup> M. J. KOPAC e G. M. MATEYKO, Ann. N.Y. Acad. Sci. 73, 237 (1958).

<sup>3</sup> A. BOLOGNARI, Biologica lat. 12, 1015 (1959).

<sup>4</sup> A. BOLOGNARI, Atti Soc. Peloritana Sci. Fis. Mat. Nat. 6, 1 (1960).

<sup>5</sup> A. BOLOGNARI, Atti Soc. Peloritana Sci. Fis. Mat. Nat. 7, 1 (1961).

<sup>6</sup> J. C. SALOMON, M. SALOMON e W. BERNHARD, Bull. Cancer 49, 139 (1962).

<sup>7</sup> M. GALGANO, Rend. Acc. Naz. Lincei, Cl. Sci. Fis. Mat. Nat. Ser. 8, 3, 629 (1947).

<sup>8</sup> F. D. BERTALANFFY, Mikroskopie 15, 67 (1960).

<sup>9</sup> A. BOLOGNARI, M. P. ALBANESE e A. DONATO, Boll. Soc. Ital. Biol. sper. 35, 764 (1959).

<sup>10</sup> M. LAMOTTE, *Initiation aux méthodes statistiques en biologie* (Masson et Cie., Paris 1957).

come pure nucleoli strettamente attaccati alla membrana nucleare. Rare sono risultate le cellule con più di due nucleoli. Quelli con dimensioni piuttosto piccole sono apparsi colorati in rosso col metodo Galgano I, con dimensioni più sviluppate, colorati in arancio o in azzurro. Nei nuclei polinucleolati il Galgano ha permesso di notare contemporaneamente nucleoli colorati in rosso e nucleoli colorati in azzurro. I nucleolini molto di sovente si sono riscontrati in dette cellule. Al microscopio di fluorescenza i nucleoli hanno ancora manifestato una certa fluorescenza rossa.

Nelle cellule infettate con il virus poliomielitico caratteri differenziali sono stati riscontrati nel nucleolo, il quale, rispetto ai controlli, si è presentato di maggiori dimensioni e con una più marcata variabilità di forma. I nuclei polinucleolati sono risultati più frequenti ed i nucleoli con nucleolini si sono riscontrati in percentuale maggiore. Il metodo Galgano I ha consentito di notare maggiore frequenza dei nucleoli colorati in azzurro ed il microscopio di fluorescenza una tendenza di essi ad assumere pure fluorescenza verde.

Le cellule infettate con virus Coxsackie hanno manifestato caratteri simili a quelli precedenti; pure in tal caso si è notato un apprezzabile numero di nuclei con nucleoli doppi e di nuclei con più di due nucleoli, i quali sono apparsi plurilobati, allungati e variamente malformati e con una quantità abbastanza discreta di nucleolini.

Per quanto riguarda le colorazioni e le osservazioni compiute al microscopio di fluorescenza, nulla di particolare si è rilevato rispetto a quanto si è osservato nelle cellule infettate con virus poliomielitico.

Al microscopio elettronico le cellule infettate con i virus, rispetto a quelle di controllo tenute per 6-8 giorni in coltura, hanno presentato nel citoplasma un numero relativamente più ridotto di citomembrane ed uno più accresciuto di ribosomi dispersi per ogni dove. Il loro nucleo è apparso con membrana molto più irregolare e scavato da profonde incisure che non quello delle cellule di controllo, pure esse modificate rispetto alla membrana ad andamento regolare delle cellule appena tripsinizzate. Il nucleolo delle cellule infettate è risultato di norma alterato rispetto a quello dei controlli: è apparso di sovente molto allungato, diviso in lobi e aderente alla membrana nucleare. In esso, con molta frequenza, sono stati riscontrati addensamenti di granulazioni corrispondenti sul piano strutturale ai nucleolini. Nelle cellule infettate con virus poliomielitico raggruppamenti di particelle di tipo virale con un diametro medio di 285 Å sono stati osservati nell'area nucleare, raggruppamenti simili coesistenti coi suddetti addensamenti sono stati notati pure entro il nucleolo (Figura 1). Particelle simili sono state riscontrate talvolta anche nel citoplasma.

Nelle cellule infettate con virus Coxsackie, raggruppamenti di particelle di tipo virale con un diametro medio di 270 Å sono stati visti in punti diversi del citoplasma (Figura 2); di simili ne sono stati osservati in taluni casi anche nel nucleo. Il nucleolo di essi si è presentato con gli addensamenti di cui sopra, nulla però è stato individuato che potesse corrispondere a raggruppamenti di particelle virali.

L'analisi citometrica ha permesso di notare che il volume nucleare, già notevolmente aumentato nelle cellule di controllo, in quelle infettate con virus poliomielitico, è risultato con un ulteriore aumento non riscontrato, invece, in quelle infettate con virus Coxsackie. L'elaborazione dei dati statistici secondo il metodo di Lamotte non ha permesso, tuttavia, di apprezzare una correlazione fra il volume del nucleolo e quello del nucleo in nessuno dei gruppi cellulari presi in considerazione.

Le presenti indagini hanno consentito di rilevare una reale azione dei virus poliomielitico e Coxsackie su cellule renali tenute preventivamente in coltura per 6-8 giorni, azione che è risultata soprattutto evidente nel nucleolo. In questo sono state riscontrate appunto quelle manifestazioni (variazioni delle affinità tintoriali e numero accresciuto di nucleolini) relative a quella seconda fase di attività nucleolare, che in precedenza era stata indicata come una caratteristica degli ovociti e delle cellule tumorali<sup>11,12</sup>. D'altro canto, almeno col virus poliomielitico, sono stati osservati nel nucleolo raggruppamenti di particelle ascrivibili a virus tali da indicare la possibilità di un'alterazione portata direttamente nell'organite.

Dette indagini fanno risaltare pertanto il fatto che le manifestazioni più salienti indotte nelle cellule infettate



Fig. 1. Micrografia elettronica di porzione di cellula renale di *Macaca mulatta* in seguito ad infezione con virus poliomielitico. Si noti nel nucleo (N) dalla forma molto irregolare l'esistenza di un raggruppamento di particelle di tipo virale (pv) e con aspetto simile ad un raggruppamento (freccia) esistente nel nucleolo (nu). Fissazione  $\text{OsO}_4$  al 2% sec. Palade; inclusione in miscela di metacrilati.

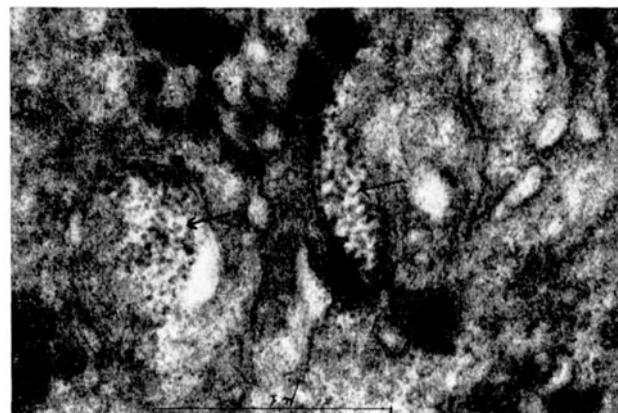


Fig. 2. Micrografia elettronica di porzione di citoplasma di cellula renale di *Scimia* in seguito ad infezione con virus Coxsackie. Le frecce indicano due raggruppamenti di particelle ascrivibili a virus. Fissazione  $\text{OsO}_4$  al 2% sec. Palade; inclusione in miscela di metacrilati.

siano a carico del nucleolo, quell'organite cioè che, in base a precedenti ricerche<sup>1,2,4</sup>, era stato indicato come il primo responsabile della cancerogenesi. Di interesse sarebbero pertanto altre ricerche dirette ad accertare se con virus certamente oncogeni le reazioni del nucleolo possano essere della stessa natura.

**Summary.** The authors found several modifications, particularly in the nucleolus, in kidney epithelial cells of *Macaca mulatta*, kept in culture for 6-8 days, after infection with polio and Coxsackie viruses. They observed, after infection with polio virus, some groups of virus-like

bodies, which indicate the possibility that a provocation took place in it.

A. BOLOGNARI, ANTONINA DONATO CELI,  
P. MOTTA e L. SQUERI

*Istituto di Zoologia e di Anatomia comparata dell'Università di Messina e Istituto di Igiene dell'Università di Messina (Italia), il 9 giugno, 1965.*

<sup>11</sup> A. BOLOGNARI, Exper. 16, 361 (1960).

<sup>12</sup> A. BOLOGNARI, Boll. Zool. 28, 597 (1961).

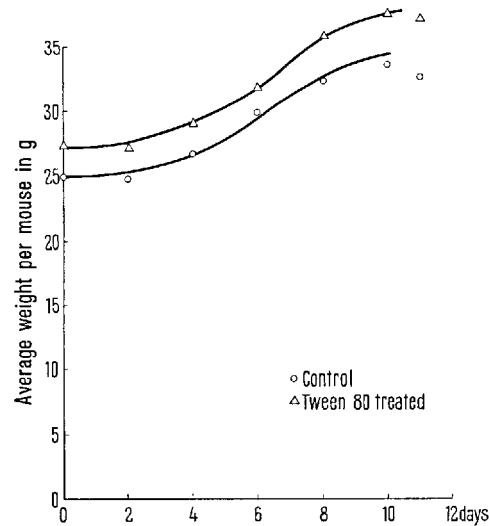
### Effects of Tween 80 on the Growth of the Ehrlich-Letré Ascites Carcinoma<sup>1</sup>

It has been shown<sup>2</sup> that treatment of cells of the Ehrlich Letré ascites carcinoma by Tween 80 produced marked permeability changes, and associated metabolic alterations as a result of this. During the course of this study it was of interest to observe in preliminary experiments that when the treated cells were inoculated into host mice, the growth of the tumor as measured by weight increase alone, was similar to the normal untreated tumor. In order to verify this observation a study has been made of the growth of this tumor after Tween 80 treatment, with CFW strain mice acting as host for transplantation of this tumor. The results will indicate identical growth patterns thus confirming the earlier preliminary observations on the negative effects of this surface active agent on growth potential of the tumor.

All experiments were carried out with the Ehrlich Letré hyperdiploid strain ascites carcinoma which has been carried in this laboratory for some years. The tumor was maintained by making serial transplants of 0.2 ml of the ascitic fluid containing cells into female CFW mice of 6-7 weeks of age. The transplants were done between 7-10 days of tumor growth at which time the growth rate is maximal. Fluid for the experiments was drained from several anesthetized mice and pooled. The fluid was divided into two portions of 10 ml each and centrifuged in a clinical centrifuge for 5 min operating at 3000 rpm. The clear ascitic plasma was decanted and saved separately. To the control was added 10 ml of 0.25 M sucrose. The other experimental tube had 10 ml of 0.25 M sucrose containing 1% Tween 80 added to it. Both tubes were stoppered and shaken to mix the cells and fluids thoroughly. After 15 min at room temperature the tubes were centrifuged, as above, at 3000 rpm for 5 min and the supernatant sucrose solutions decanted and discarded. Each tube containing cells was then mixed thoroughly with 10 ml of 0.9% saline and re-centrifuged at the above speed of 3000 rpm for 5 min. This washing operation was repeated three times at room temperature, and the supernatant saline wash solution was discarded. To each of the tubes containing the packed cells the appropriate plasma sample saved from above was added, and after stoppering the tubes were shaken to mix the cells. These suspensions of cells were then injected into host mice. For this procedure two groups of 5 mice each were used. The mice were females of about 6-7 weeks of age of the CFW strain.

Injection of control and Tween treated cells was done by intraperitoneal injection of 0.2 ml of the cell suspension. The cell counts of these injections were done using a bright line hemocytometer and using a red cell diluting and counting pipet, with a dilution of 1:100. The number of cells injected in each case into each of the five mice used as controls, and the Tween 80 treated cells, was as follows:  $27 \cdot 10^6$  cells control,  $24 \cdot 10^6$  cells Tween 80 treated.

During the course of the next 10 days, weight records were made for these two groups of mice. The Figure shows that during the course of the experiment the growth rate was similar in the control and Tween 80 treated cells. At the eleventh day the mice were sacrificed and the fluid was drained carefully into separate 15 ml conical centrifuge tubes. The volumes of total fluid was noted and the tubes were centrifuged at 3000 rpm for 5 min in a clinical



Fluid volume and packed cell volume of control and Tween 80 treated cells.

<sup>1</sup> Supported by Grant No. CA 05172 of the National Cancer Institute, U.S.P.H.S.

<sup>2</sup> E. R. M. KAY, Cancer Res. 25, 764 (1965).