

chondria, sarcoplasmic reticulum, aqueous sarcoplasm and lipid droplets. From the above tests, the blue-stained intermyofibrillar network is most likely a membranous component: mitochondria or sarcoplasmic reticulum or both, as suggested by ENGEL and CUNNINGHAM¹ for the red intermyofibrillar material seen with the modified trichrome stain.

Fibres of 'Fibrillenstruktur' and 'Felderstruktur'² were distinct in cross section, as shown by the pattern of the network surrounding the myofibrils after gold impregnation and after hematoxylin staining (Figure 1). In longitudinal section, this network appeared as longitudinal streaks between myofibrils or showed weak transverse banding due to transverse appearance of dots.

The changes of the intermyofibrillar network were observed in skeletal muscles from patients with neuromuscular diseases. The target appearance in denervated muscle fibres³ was demonstrated as a central unstained region surrounded by a circle deeply stained with hematoxylin (Figure 2). The affected small fibres in neuropathy or myopathy showed an irregular pattern of the intermyofibrillar structure as shown by electronmicroscopy. It is possible to demonstrate the endplates and the inter-

myofibrillar network patterns in the same section by applying hematoxylin after cholinesterase histochemistry by Koelle's technique⁴.

Zusammenfassung. Cytologische Untersuchung des Sarkoplasmas von Skelettmuskulatur an Hämatoxylin-gefärbten Gefrierschnitten. Es wird auf bestimmte Veränderungen des sarkoplasmatischen Reticulums bei neuromuskulären Erkrankungen hingewiesen.

M. TOMONAGA

*Third Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Tokyo (Japan),
July 7, 1965.*

¹ W. K. ENGEL and G. G. CUNNINGHAM, *Neurology* 13, 919 (1963).

² P. KRÜGER and P. G. GÜNTHER, *Acta anat.* 28, 135 (1956).

³ W. K. ENGEL, *Nature* 191, 389 (1961).

⁴ I wish to thank Prof. Dr. K. NAKAO and Dr. W. KING ENGEL for their comments and suggestions for this study.

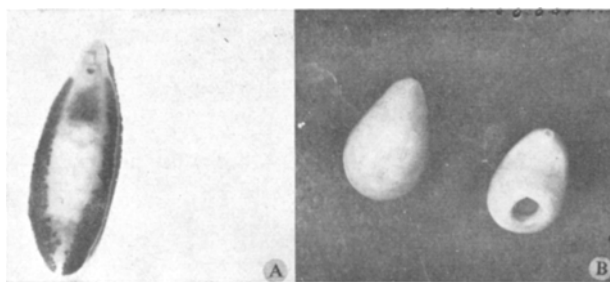
Egg-Shell in Paramphistomatidae (Trematoda: Digenea)

The mechanism of egg-shell formation is one aspect of the physiology of reproduction in helminths that has been receiving increasing attention in recent years. The egg-shell in trematodes should be conceived as a device for the protection and transport of the miracidium. The eggs are released singly inside the host and then passed into the external environment. The miracidium developing inside the eggs requires to be protected from chemical action of the exudates from the tissues of the host as well as a multitude of fluctuations in the external environment. It is now well known that the egg-shell is highly resistant to many types of chemical attacks and other disturbances in the medium. The miracidium enclosed by such an egg-shell is thus amply protected against many vicissitudes. A comparable situation occurs in pseudophyllidean cestodes where the larva is a coracidium.

So far as it is known, in several trematodes, in which the chemical nature of shell material has been studied, the egg-shell is a quinone-tanned protein. It is characteristically amber coloured and is derived from precursors synthesized and stored in the vitelline cells. These precursors inside the vitelline cells have been histochemically identified as consisting of proteins rich in tyrosine and phenolase¹⁻⁵. During my studies on egg-shell formation in trematodes, it was observed that in members of the family Paramphistomatidae the chemical nature of egg-shell differs significantly from this fundamental pattern. A remarkable feature, as differing from other trematodes, noticed in several members of this family (*Diplodiscus mehrai* Pande, 1937; *Paramphistomum cervi* (Zeder, 1790); *Gastrodiscus secundus* Looss, 1907; and *Caromyerius spatiosus* (Brandes, 1898)) is that the egg-shell is colourless and transparent without any indication of amber colour at any stage. The shell precursors inside the

vitelline cells have also been found to be histochemically distinct. They gave positive reactions for proteins (Bromophenol blue reaction⁶), while tests for phenols (Fast Red Salt B and Argentaffin reactions^{7,8}) and phenolase (Catechol reaction²) were entirely negative. Histochemical and other tests pointed out that the egg-shell in amphistomes is a keratin type of scleroprotein where the protein is stabilized by disulphide (-S-S-) linkages.

It has thus been revealed for the first time that at least two types of mechanisms are operating to stabilize



A, *Artyfechinostomum mehrai*.

B, *Paramphistomum cervi*.

¹ W. STEPHENSON, *Parasitology* 38, 128 (1947).

² J. D. SMYTH, *Quart. J. micr. Sci.* 95, 139 (1954).

³ J. D. SMYTH and J. A. CLEGG, *Exp. Parasit.* 8, 286 (1959).

⁴ K. HANUMANATHA RAO, *Parasitology* 53, 1 (1963).

⁵ P. R. BURTON, *J. exp. Zool.* 154, 247 (1963).

⁶ D. MAZIA, P. BREWER, and M. ALFERT, *Biol. Bull. Woods Hole* 104, 57 (1953).

⁷ L. N. JOHRI and J. D. SMYTH, *Parasitology* 46, 107 (1956).

⁸ E. J. BELL and J. D. SMYTH, *Parasitology* 48, 131 (1958).

the egg-shell protein in trematodes. The one widely known mechanism is that of quinone-tanning. In trematodes having this type of egg-shell, one can normally see that the sites occupied by vitelline cells and the shells of uterine eggs gradually turn brown after fixation and preservation. In the second condition, at present known to occur only in Paramphistomatidae, the egg-shell represents a product of keratinization involving disulphide bonds. Consequently, upon fixation and preservation for any length of time the regions occupied by vitelline cells and the completed egg-shells remain colourless. This striking contrast between the two conditions can be vividly seen in the accompanying microphotograph (Figure)⁹.

Résumé. On a découvert que, dans la famille des Paramphistomatidae (Trematodes), la coquille de l'œuf,

transparente et sans couleur, est une kératine-type de scléroprotéine, constituée de disulphide en chaînes (-S-S-). On sait que chez d'autres trématodes, la coquille d'œuf, d'une couleur ambrée, est une protéine de quinone.

R. MADHAVI

Department of Zoology, Andhra University, Waltair (India), July 24, 1965.

⁹ I am grateful to Dr. K. HANUMANTHA RAO for helpful suggestions and criticism, and to Prof. P. N. GANAPATI for facilities and encouragement. Thanks are also due to the authorities of C.S.I.R. for the award of a Research Fellowship.

Résistance de la souris et du souriceau à l'hypothermie prolongée à 20°C. Observations portant sur près de 500 animaux

Des travaux sur les réactions endocriniennes de la souris à différentes températures nous ont amené à pratiquer sur près de 500 animaux des hypothermies prolongées à 20 et 23°C en utilisant les méthodes de GIAJA et de son école. Etant donné le petit nombre de travaux publiés sur ce sujet (hypothermie prolongée sans agent pharmacodynamique) et l'importante quantité d'animaux traités, il nous a paru utile de rédiger une note essentiellement technique sur les résultats obtenus, c'est à dire sur la résistance de la souris à ces basses températures.

Comme nous l'avons déjà écrit¹, suivant la méthode de GIAJA et de l'école de Belgrade² rapportée par MAROIS³, nous amenons les souris à la température désirée (20°C, température rectale - quelquefois 23°C) par asphyxie au froid. Pratiquement, nous opérons ainsi: les animaux sont placés au frigidaire à 4°C dans un bocal hermétiquement clos (2 adultes ou 3 souriceaux pour un bocal de 0,5 l) jusqu'au moment où ils paraissent prêts à s'affaïsser; dans les conditions ci-dessus décrites, il faut pour arriver à ce stade de 60 à 80 min aux adultes et de 40 à 55 min aux souriceaux. On vérifie alors la température rectale et, pour maintenir les animaux dans les mêmes conditions thermiques, il suffit à ce moment-là de les immerger dans de l'eau à cette température; on glisse donc les souris dans des sacs en tissu très aéré (tulle) qui leur permettent de respirer mais les immobilisent complètement; les animaux ainsi ligotés sont introduits dans l'eau de façon à ce que seules leurs têtes émergent. Ils vivent ainsi plus ou moins longtemps mais ne se réchauffent absolument pas.

Nous avons traités par cette méthode 310 souris adultes d'une part (244 mâles et 66 femelles) et 180 souriceaux de 25 jours environ d'autre part (10 mâles et 170 femelles). Ces animaux avaient subi des traitements divers mais la plupart des adultes devaient nous permettre de comparer l'action de l'hormone thyroïdienne sur la thyroïde de la souris en hypothermie à celle que nous observions dans des conditions de vie normales; certains avaient été soumis auparavant à des régimes destinés à mettre leur thyroïde au repos. Quant aux souriceaux, le plus grand nombre d'entre eux était destiné à tester la réaction de

l'utérus à des injections de folliculine à ces basses températures.

Dans un travail d'ensemble à publier ultérieurement, nous indiquerons tous les résultats obtenus; nous ne donnons ici que des chiffres globaux sur la durée moyenne de vie de la souris aux températures de 20 et 23°C. Il est apparu, en effet, que cette durée moyenne de vie ne variait pratiquement pas suivant les traitements, d'un sexe à l'autre ni du souriceau à l'adulte; nous devons signaler cependant qu'elle peut être nettement prolongée si l'on soutient les animaux en cours d'expérience avec des injections de sérum glucosé. Nous avons utilisé ce procédé pour le dernier lot d'animaux soumis à l'hypothermie et nous avons fait vivre une souris à 20°C près de 70 h alors que nous n'avions jamais dépassé 50 h auparavant; la moyenne de vie de l'ensemble de ce lot est bien supérieure également aux résultats antérieurs.

Sur les 490 animaux soumis à l'hypothermie prolongée, nous avons obtenu les pourcentages de résistance suivants (Tableau I).

A titre d'exemple, nous donnons un Tableau plus détaillé de résistance à ces basses températures, qui porte sur deux lots d'animaux: l'un de 229 souris adultes mâles et l'autre de 150 souriceaux femelles (Tableau II).

Il nous paraît utile enfin d'ajouter à ces chiffres deux graphiques qui évoquent cette même résistance à l'hypothermie prolongée et où nous avons fait figurer trois catégories d'animaux: (1) Ceux qui ont été tués à des heures déterminées, car notre but - rappelons-le - n'était pas d'étudier la survie maxima de la souris à 20 ou 23°C mais l'examen de certains organes dans ces conditions; ces animaux auraient donc pu vivre plus longtemps et sont représentés par des bandes noires. (2) Ceux qui sont morts à des heures connues car les souris étaient, durant la journée, surveillées toutes les quinze minutes, et qui figurent sous forme de bandes pointillées. (3) Ceux enfin qui, vivant le soir, étaient trouvés morts au matin; cette dernière période de vie, possible mais incertaine, est représentée par des bandes blanches.

¹ J. FLATIN et M. DELSOL, *Ann. Endocrin.* 20, 761 (1959).

² J. GIAJA, XXème congrès international de Physiologie, Bruxelles (1956), vol. 1, p. 103.

³ M. MAROIS, *C. r. Soc. Biol.* 150, 57 (1956).