

### Mitotic Activity of Mast Cells in Precancerous Mouse Skin

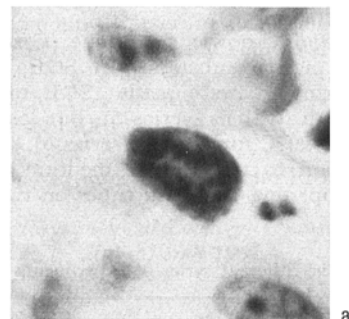
The enormous number of mast cells appearing in precancerous skin of mice painted with aromatic hydrocarbons has been considered as the result of transformation from undifferentiated mesenchymal cells, because no mitotic figures were observed there (SIMPSON<sup>1</sup> and SIMPSON et al.<sup>2</sup>). However, HUNT and HUNT<sup>3</sup> and ALLEN<sup>4</sup> found mitotic figures in the normal mast cells of rat. On the other hand, the incorporation of tritiated thymidine into some of tissue and peritoneal fluid mast cells has also been described (ALLEN<sup>4</sup>, PADAWER<sup>5</sup>, WALKER<sup>6</sup>). Such a labelling, however, cannot be simply interpreted as indicating the ability of mitotic division of mast cells. It has been suggested by PELC<sup>7</sup> that incorporation of thymidine into DNA can occur independently of the mitotic cycle.

In the present study, the Harris hematoxylin and neutral red method of colouring mast cells, as well as the colchicine for the arrest of metaphases, were applied to demonstrate mitoses in a large population of mast cells from precancerous mouse skin painted with benzanthracene.

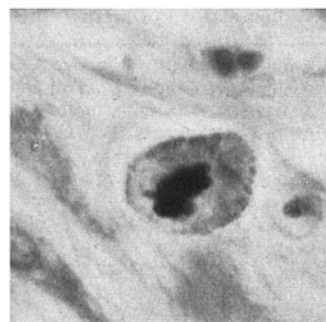
Adult female mice of the RIII/19c strain were painted with 0.05 ml of 0.5% 7,12-dimethylbenza(α)anthracene (DMBA) in acetone, 4 times twice weekly. 4 and 6 weeks after the last painting, half the animals were sacrificed at 10.00–11.00. The skin with distinct warts was sectioned, fixed in ethanol:formol:glacial acetic acid (85:10:5) and embedded in paraffin. Sections (6μ) were cut and coloured with Harris hematoxylin and neutral red (0.01% aqueous solution). Moreover, 8 animals chosen from the group

painted 6 weeks before, were injected i.p. with 1.8 mg/kg body weight of colchicine. These animals were sacrificed 2 and 5 h after injection.

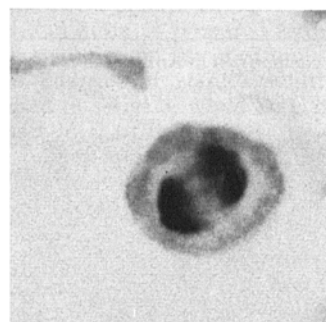
In the sections from all animals, various mitotic phases could be seen (Figure a, b, c, d). Determination of the



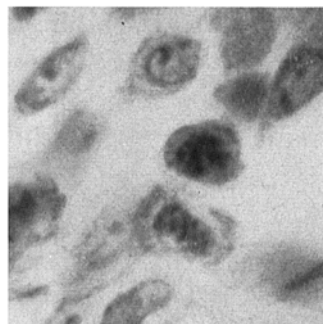
a



b



c



d

The mitoses of mast cells:  
(a) prophase, (b) metaphase, (c) anaphase, (d) telophase.

Table I. Frequency of mitoses in mast cells of mouse precancerous skin

| Animal No. | Time after painting (weeks) | No. of mast cells counted | Mitotic index (%) |
|------------|-----------------------------|---------------------------|-------------------|
| 1          | 4                           | 4637                      | 0.78              |
| 2          | 4                           | 2394                      | 0.46              |
| 3          | 4                           | 2108                      | 0.64              |
|            |                             | Total: 9139               | Mean: 0.62        |
| 1          | 6                           | 3742                      | 0.85              |
| 2          | 6                           | 3655                      | 0.79              |
| 3          | 6                           | 2177                      | 0.53              |
|            |                             | Total: 9574               | Mean: 0.72        |

Table II. Rate of inhibition of metaphases in mast cells from precancerous skin of mice injected with colchicine

| Animal No. | Time (h) after colchicine injection | No. of interphasal cells | No. of mitoses | Mitotic index (%) |
|------------|-------------------------------------|--------------------------|----------------|-------------------|
|            | Control <sup>a</sup>                | 9574                     | 68             | 0.72              |
| 1          | 2                                   | 2785                     | 25             | 0.97              |
| 2          | 2                                   | 3115                     | 27             | 0.85              |
| 1          | 5                                   | 3425                     | 68             | 1.98              |
| 2          | 5                                   | 4100                     | 93             | 2.23              |

<sup>a</sup> The figures represent mean values from 3 animals.

<sup>1</sup> W. L. SIMPSON, Ann. N.Y. Acad. Sci. 103, 4 (1963).

<sup>2</sup> W. L. SIMPSON, Y. HAYASHI and E. POWLEY, *Biological Interactions in Normal and Neoplastic Growth* (Ed. M. J. BRENNAN and W. L. SIMPSON; J. A. Churchill Ltd., London (1962).

<sup>3</sup> T. E. HUNT and E. A. HUNT, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 94, 166 (1957).

<sup>4</sup> A. M. ALLEN, Anat. Rec. 139, 13 (1961).

<sup>5</sup> J. PADAWER, Angiology 12, 538 (1961).

<sup>6</sup> B. E. WALKER, Nature 192, 980 (1961).

<sup>7</sup> S. R. PELC, Expl Cell Res. 29, 194 (1963).

mitotic indexes yielded values 0.4–0.8% (Table I). The values for the mitotic indexes of animals sacrificed 6 weeks after painting are higher than those for mice sacrificed 4 weeks after painting but the difference is not significant. The distribution of mitotic phases calculated on 126 mitotic figures showed 17% prophases, 30% metaphases, 18% anaphases and 35% telophases. Table II presents the frequency of mitoses 2 and 5 h after injection of colchicine. Between the 2nd and 5th h after injection, the mitotic index increased from 0.9–2.2%. To find the rate on an hourly basis, the difference between the values of the 2 and 5 h periods was divided by 3. Thus, 0.4% of mast cells in precancerous mouse skin may be roughly estimated to enter mitosis every hour.

The mitotic figures of mast cells can mainly be seen beneath the epithelium, although they may be also observed in deeper skin layers.

The results of the present study suggest that mitotic division is the prevailing way in which mast cells increase their number in precancerous mouse skin.

**Résumé.** En utilisant le 7, 12-diméthylbenza(α)nthracène (DMBA) on a provoqué un papillome dans la peau de la souris. On observe de nombreuses figures mitotiques dans les mastocytes du papillome formé. Le coefficient mitotique est de 0,6–0,7%; l'injection de colchicine augmente sa valeur.

W. SAWICKI

*Department of Histology and Embryology, School of Medicine, Warsaw (Poland), 12th December 1966.*

### L'induction neurogène chez les Oiseaux: passage du flux inducteur par le filtre millipore<sup>1</sup>

Des expériences nombreuses et variées ont démontré que chez les Amphibiens l'induction de l'ébauche neurale peut avoir lieu même si l'inducteur n'est pas en contact direct avec l'ectoblaste. Chez les Oiseaux, au contraire, nous ne disposons d'aucune précision à ce sujet. Pour combler cette lacune, nous avons entrepris des expériences analogues à celles que SAXÉN<sup>2</sup> avait effectuées chez le Triton, il y a quelques années. Cet auteur a interposé un filtre millipore (diamètre des pores – 0,8 μ, épaisseur du filtre – 20 μ) entre le jeune ectoblaste et l'inducteur, soit normal soit artificiel (cellules HeLa). Malgré cette intervention, il a obtenu ou bien la formation d'une ébauche neurale typique, ou bien des inductions plus faibles, d'aspect neuroïdal, ou, enfin, l'ectoblaste, situé au-dessus du millipore, n'était que légèrement épaissi et composé de cellules cylindriques. Un peu plus tard, NYHOLM, SAXÉN, TOIVONEN et VANIO<sup>3</sup> ont repris ces expériences pour soumettre leurs préparations à l'analyse au microscope électronique. Il s'est révélé que le filtre millipore empêche effectivement tout contact direct entre les cellules de l'ectoblaste et l'inducteur.

Nos expériences sont faites sur de jeunes blastoderms de Poulet cultivés in vitro selon la technique de NEW<sup>4</sup> légèrement modifiée (voir GALLERA et CASTRO-CORREIA<sup>5</sup>).

Deux blastoderms servent à une seule opération: le donneur, toujours au stade de la ligne primitive achevée, et l'hôte, à un stade plus jeune (ligne primitive moyenne à longue). Les opérations sont pratiquées du côté ventral. Nous enlevons soigneusement l'endoblaste du croissant antérieur de Duval et le rempart vitellin situé plus en avant. Contre cet ectoblaste dénudé, nous appliquons un carré de millipore, dont le côté mesure 1,7 mm (Millipore filter Comp. Bedford, Massachusetts; épaisseur 25 μ, diamètre des pores 0,45 μ). Nous découpons le tiers antérieur de la ligne primitive du blastoderme-donneur et nous le transportons sur ce fragment de millipore. Nous orientons le greffon de telle façon que sa face ventrale soit appliquée contre le filtre et son bord antérieur tourné vers l'extrémité céphalique de la ligne primitive de l'hôte. Le liquide surnageant soigneusement retiré, nous remettons le blastoderme à l'étuve. Le greffon se contracte tout d'abord et ne commence à adhérer au millipore



Fig. 1. Microphotographie in toto d'un blastoderme où le greffon mis sous le millipore a induit dans l'ectoblaste, situé de l'autre côté du filtre, la formation d'une plaque neurale. La tête de l'embryon-hôte surplombe partiellement le millipore.

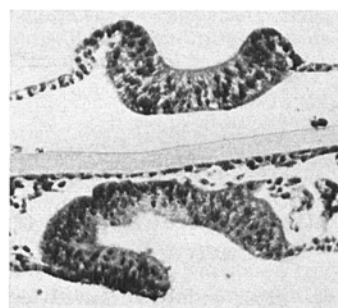


Fig. 2. Coupe d'un autre embryon que celui représenté sur la Figure 1. Sous le millipore, on voit l'ébauche neurale fournie par le greffon et au-dessus du filtre la plaque neurale induite.

<sup>1</sup> Travail subventionné par le Fonds national suisse de la Recherche scientifique.

<sup>2</sup> L. SAXÉN, *Devl Biol.* 3, 140 (1961).

<sup>3</sup> M. NYHOLM, L. SAXÉN, S. TOIVONEN et T. VANIO, *Expl Cell. Res.* 28, 208 (1962).

<sup>4</sup> D. T. A. NEW, *J. Embryol. exp. Morph.* 3, 326 (1955).

<sup>5</sup> J. GALLERA et J. CASTRO-CORREIA, *C. r. Séanc. Soc. Biol.* 154, 2014 (1960).