

CIVITELLI⁶. Les 3 dernières paires de la garniture autosomique groupent 6 acrocentriques de petite taille. Les hétérochromosomes sont du type XY et XX. L'X est un élément métacentrique de la taille moyenne, et l'Y est un petit élément submétacentrique à bras très inégaux. Le nombre fondamental (NF) est pour la Noctule 54 et ne diffère pas de celui établi pour les autres Vespertilionidés étudiées par BOVEY⁷ et CAPANNA et CIVITELLI^{6,8}. Ce NF constant démontre le rôle joué par les processus de fusion centrique dans l'évolution du caryotype chez les Vespertilionidés européens, et confirment sur ce sujet les idées exposées par les auteurs mentionnés.

Summary. The chromosome complement of *Nyctalus noctula* Schreb. has been determined. The karyotype is characterized by a diploid number of 42 and by a fundamental number (NF) of 54. The sex chromosomes are of

the type XY and XX, as usually found in mammals. A description of chromosomes is given and the evolutionary significance of the Robertsonian process in the development of Vespertilionid karyotype is confirmed.

B. DULIĆ, B. SOLDATOVIĆ
et D. RIMSA

*Laboratoire de Zoologie, Faculté des Sciences Naturelles,
Zagreb et Institut des recherches biologiques,
Laboratoire de Génétique, Beograd (Yougoslavie),
19 juin 1967.*

⁶ E. CAPANNA et M. V. CIVITELLI, *Caryologia* 19, 231 (1966).

⁷ R. BOVEY, *R. suisse Zool.* 56, 371 (1949).

⁸ E. CAPANNA et M. V. CIVITELLI, *Caryologia* 18, 541 (1965).

Interzelluläre Verbindungen beim Plattenepithelkarzinom der menschlichen Haut in der Gewebekultur

Die Züchtung menschlicher Hautkarzinome in der Gewebekultur ist bisher nur in wenigen Fällen gelungen¹, eine Beschreibung der Zellmorphologie steht noch aus. Für die Kultivierung des Plattenepithelkarzinoms der Haut wurde folgendes Milieu zusammengestellt: 7 ml Medium TC 199 (Difco), 3 ml Kälberserum (frisch gewonnen), 0,5 ml Vitamins Minimal Eagle 100x (Difco), und 10 mg Glutamin (Difco).

Von 18 angesetzten Tumoren wuchsen 15 aus. Entscheidend für das Wachstum scheint der Glutaminanteil des Nährmediums zu sein. Nährmedien, in denen ohne hohe Glutaminzusätze entweder TC 199 mit Kälberserum, Humanserum oder Humanascites zwischen 10% und 30% oder Hanks (BSS), Serum und Hühnerembryonalextrakt enthalten waren, erreichten nur eine Tumorstückumsatzrate von max. 30%. Auch durch Zugabe von Vitamins Minimal Eagle konnten die Ergebnisse nicht verbessert werden. Ebenfalls hohe Glutaminzusätze wurden von LIMBURG und KRAHE² für die Zucht des Cervix-Ca. und von FRIEDMAN-KIEN et al.³ für die Zucht gesunden Epithels der Haut verwandt.

Die Kulturen wurden nach dem Plasmaclot-Verfahren auf Glaslamellen in Leightonröhrchen oder durch Festsetzen der Gewebestücke zwischen Glaslamelle und Röhrchenboden angelegt und bei 37 °C und einem pH-Wert von 7,2 gehalten. Um in der Kultur eine Verwachsung mit gesundem Epithel, mit dem der Tumor im Randbereich und an der Oberfläche verbunden sein kann, zu vermeiden, wurden möglichst tief im Grunde der Haut gelegene Tumorstücke angesetzt, die sicher von der Epidermis abgrenzbar waren.

Bei einem Teil der Kulturen traten die ersten auf der Lamelle ausgebreiteten Zellen 24 h nach dem Ansetzen der Tumorstückchen auf. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich zum Teil um Zellen handelt, die aus dem Explantat herausgefallen und angewachsen sind. Tumorstückchen mit einem grossen Stromaanteil wachsen erst nach längerer Kultivierung aus (bis zu 3 Tagen

nach der Explantation). Der Bindegewebige Anteil wirkt sich offensichtlich ungünstig auf das Wachstum der Tumorzellen aus. Diese treten dann erst gleichzeitig mit Fibroblasten aus und werden später durch die schneller sich vermehrenden Bindegewebszellen im Wachstum gestört, was den Beobachtungen von SÖLTZ-SZÖTS⁴ entspricht.

Stückchen, die fast ausschliesslich Karzinomzellen enthalten, haben einen mehr lockeren Zusammenhalt und können innerhalb von 2 Tagen einen einheitlichen epithelialen Saum ausgebildet haben. Mit länger werdender Kultivierungsdauer wird die äussere Wachstumszone zunehmend unregelmässiger. Zellreihen schieben sich weit aus dem Zellverband heraus, und die Zellen verlieren immer mehr das im Verband übliche Aussehen der Epithelzellen. Weit vorgeschobene einzeln liegende Zellen nehmen in der Kultur auf Grund mangelnden Kontakts zu Nachbarzellen eine rundliche oder ovale Form an. Man kann bei diesen die Zellmorphologie unter Ausschluss der Wechselbeziehungen zwischen Einzelzelle und Gewebverband beobachten. Förderlich für die Beobachtung ist dabei die abgeflachte Form der Zellen, wodurch neben den Organellen des Cytoplasmas gerade Fortsätze und Ausläufer des Cytoplasmas in die selbe Beobachtungsebene rücken.

Die Mehrzahl der Zellen enthält einen Nucleolus oder 2 durch eine basophile Brücke verbundene Nucleolen. Im kernnahen Cytoplasma liegen reichlich Granula. Phasenoptisch können sie in 2 Gruppen geteilt werden, die sich histochemisch durch PAS- bzw. Sudan-positive Reaktion unterscheiden, also Glykogen bzw. Lipide enthalten.

Die einzeln in der Kultur liegende Zelle besitzt nach allen Seiten eine grosse Zahl von feinen hyalinen, in Einzelfällen verzweigten Cytoplasmaausläufern, die keine innere Struktur erkennen lassen. Neben diesen frei enden-

¹ J. SÖLTZ-SZÖTS, *Arch. klin. exp. Derm.* 274, 594 (1962).

² H. LIMBURG und M. KRAHE, *Dt. med. Wschr.* 89, 1938 (1964).

³ A. E. FRIEDMAN-KIEN, S. MORRILL, Ph. N. PROSE und H. LIEBHABER, *Nature* 212, 1583 (1966).

⁴ J. SÖLTZ-SZÖTS, *Arch. klin. exp. Derm.* 276, 36 (1963).



Fig. 1a. Äusserer Wachstumsrand einer menschlichen Plattenepithelkarzinomkultur. Neben frei endenden Ausläufern des Cytoplasmas ist ein Grossteil der Zellen über Cytoplasmastränge mit anderen Zellen verbunden. In Kernnähe liegen Granula unterschiedlicher phasenoptischer Dichte. Phasenkontrastaufnahme. $\times 990$.



Fig. 1b. Extrem langer zwischenzelliger Verbindungsstrang, lückenlos gefüllt mit Granula, aus der Kultur eines Plattenepithelkarzinoms. Phasenkontrastaufnahme. $\times 990$.

den Cytoplasmafortsätzen finden sich häufig im Durchschnitt etwa 20μ (max. 60μ) lange und $1-2 \mu$ dicke Verbindungsstränge zu anderen Zellen (Figur 1a und b). In diesen findet man PAS-positive Granula, die gelegentlich eine lückenlose Kette bilden und auf eine Funktionseinheit der verbundenen Zellen hinweisen (Figur 1b). Eine zelltrennende Zwischenmembran ist lichtmikroskopisch nicht zu erkennen.

Entsprechende Bildungen, «Epithelfasern in zwischenzelligen Cytoplasmabändern» fand H. PINKUS⁵ in Kulturen gesunder menschlicher Epidermis. ODLAND⁶ glaubt, dass Tonofibrillen intrazellulär an Zellverbindungsstellen gebildet werden. Beide Beobachtungen deuten darauf hin, dass in der Epidermis zwei- oder mehrzellige Funktionseinheiten existieren, zumindest für die Bildung epithelialer Fasern. Das Auftreten der Zellverbindungen in der Tumorkultur kann dann als Relikt aus dem Ursprungsgewebe des Plattenepithelkarzinoms gedeutet werden. Inwieweit über diese Brücken ein Stoffaustausch stattfinden kann, und ob es sich hier um Spindelrestkörper handelt, wie sie bei Spermatiden von Säugetieren bekannt sind⁷, müssen weitere Untersuchungen ergeben.

Die bei Zellen des Wachstumssaums frei endenden Cytoplasmaausläufer sind ebenfalls im geschlossenen Epithelverband der Karzinomkultur zu sehen (Figur 2). Sie haben zum Teil das typische Aussehen von Stachelzellen des Stratum spinosum. Hier dienen sie wohl als Haftorganellen an Nachbarzellen und Glasoberfläche und entsprechen damit den Desmosomen des gesunden Hautepithels, die nach elektronenmikroskopischen Bildern keinen zwischenzelligen Stoffaustausch zulassen sollen^{8,9}.

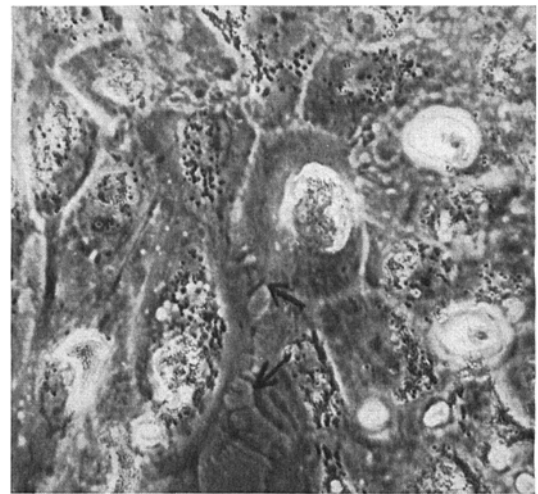


Fig. 2. Epithelverband aus der Kultur eines Plattenepithelkarzinoms, zwischen den Zellen sind Cytoplasmabrücken sichtbar. Phasenkontrastaufnahme. $\times 1110$.

⁵ H. PINKUS, Arch. Derm. Syph. 165, 53 (1932).

⁶ G. F. ODLAND, J. biophys. biochem. Cytol. 4, 529 (1958).

⁷ DON W. FAWCETT, Expl Cell Res. 8, 174 (1961).

⁸ K. R. PORTER und M. A. BONNEVILLE, Einführung in die Feinstruktur von Zellen und Geweben (Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1965).

⁹ Fräulein R. UPMANN danke ich für umsichtige Assistenz. Die Untersuchungen wurden unterstützt von der Gesellschaft zur Bekämpfung der Krebskrankheiten in Nordrhein-Westfalen.

Summary. A new medium was developed for tissue-culturing of the human squamous cell carcinoma of the skin. The morphology of the outgrowing tumour cells is described, particularly with regard to the projections of cell surface. There are 2 forms to be differentiated: one which is similar to the desmosomes of the normal epithelium of the skin, and one of intercellular connective

strands. The different functions of both forms are discussed with regard to the exchange of cell matter.

K. H. KORFSMEIER

Fachklinik «Haus Hornheide des Westfälischen Vereins für Krebs- und Lupusbekämpfung» Handorf/Münster (Deutschland), 12. Juni 1967.

Cholinergic Mechanism in the Release of Catecholamines from Intra-Ganglionic Inhibitory Terminals?

Inhibition of sympathetic ganglion cells is exerted by intraganglionic adrenergic nerve endings¹ arising either from axon collaterals or from special 'chromaffine' cells. Recently we have shown² that a number of adrenergic terminals is present in the feline ganglion cervicale superius, displaying a formaldehyde-induced fluorescence under the light microscope. These terminals contain electron microscopic 'dense-core vesicles' and establish axo-somatic contacts with ganglion cells.

Electron histochemical studies performed by means of the uranyl-thiocholine technique³ revealed that adrenergic axo-somatic nerve endings exhibit an acetylcholinesterase (AChE) activity. The reaction is confined to the intervesicular space within the terminal (Figure). No enzyme activity could be observed, however, at the junctional area between the terminals and the pseudodendritic protrusions of the ganglion cells, in striking contrast to axo-dendritic (excitatory) synapses, characterized by a heavy enzyme reaction of the synaptic area.

Supposing that the site of an enzyme activity points to the site of the breakdown of its physiological substrate, one arrives at the conclusion that acetylcholine, being the physiological transmitter substance in excitatory ganglionic synapses⁴, plays a role also in the liberation of

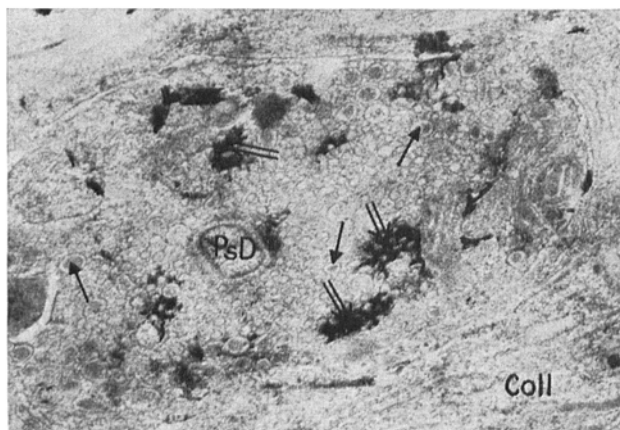
catecholamines from inhibitory (adrenergic) terminals. Catecholamines are known to exert a blockade of ganglionic transmission⁵ by means of increasing the membrane potential of the ganglion cells⁶. The electron histochemical patterns suggest that the liberation of catecholamines from their bound form within the adrenergic nerve endings is effected by a cholinergic mechanism.

An interaction between acetylcholine and norepinephrine at the level of the peripheral autonomic innervation apparatus has been proposed repeatedly⁷. Histochemical studies on the structure, development and regeneration of the peripheral autonomic innervation apparatus failed to support this theory⁸. A transmitter interaction of this kind appears to be possible, however, at the level of the inhibitory ganglionic synapses that might, at least partly, account for the startling physiological findings of BURN and his collaborators.

Zusammenfassung. Elektronenmikroskopisch werden einfache und osmiophile («dense core») synaptische Bläschen in den axo-somatischen (hemmenden) adrenerischen Nervenendigungen im Ganglion cervicale superius der Katze gefunden. Die Anwesenheit einer elektronenhistochemischen Acetylcholinesterase-Reaktion um die synaptischen Bläschen herum scheint für die funktionelle Bedeutung des Acetylcholins bei der Freisetzung von Catecholaminen aus solchen Nervenendigungen zu sprechen.

B. CSILLIK and ELIZABETH KNYIHÁR

Department of Anatomy, University Medical School, Szeged (Hungary), 30th May 1967.



Electron histochemical localization of acetylcholinesterase in an axo-somatic synapse in the ganglion cervicale superius of a cat. A large number of synaptic vesicles is present in the presynaptic axon; most of the vesicles are of the simple ('regular') type, whereas others belong to the dense-core type (arrows). The intervesicular space within the terminal axoplasm is, here and there, filled by the electron dense end product of the acetylcholinesterase reaction (double arrows). PsD, pseudodendritic protrusion of the postsynaptic ganglion cell. Coll, collagenous fibres. $\times 36,800$.

- 1 B. HAMBERGER, K.-A. NORBERG and F. SJÖQUIST, *Int. J. Neuropharmac.* 2, 279 (1963).
- 2 B. CSILLIK, G. KÁLMÁN and E. KNYIHÁR, *Experientia* 23, 477 (1967).
- 3 Fixation with an isotonic and isohydric 10% formaline solution through the carotid artery. Thick frozen sections are incubated at pH 6.2 for 10–60 min in the following solution: acetylthiocholine, 7 mg; acetate buffer, 0.1M, 2.5 ml; copper glycinate, 0.1M, 0.1 ml; uranyl acetate (concentrated solution), 0.1 ml. After incubation, sections are treated with an isotonic and isohydric yellow ammonium sulphide solution, rinsed, dehydrated, embedded in Durcupan, sectioned on an LKB Ultratome and photographed under a Tesla 413 B electron microscope.
- 4 W. FELDBERG and J. H. GADDUM, *J. Physiol., Lond.* 81, 305 (1934).
- 5 A. S. MARRAZZI, *Am. J. Physiol.* 127, 738 (1939). – R. M. ECCLES and B. LIBET, *J. Physiol., Lond.* 157, 484 (1961).
- 6 A. LUNDBERG, *Acta physiol. scand.* 26, 252 (1952).
- 7 J. H. BURN and M. J. RAND, *Nature* 184, 163 (1959). – J. H. BURN, *Pharmac. Rev.* 25, 377 (1966).
- 8 B. CSILLIK, *J. Neurochem.* 11, 351 (1964). – B. CSILLIK and G. B. KOELLE, *Acta histochem.* 22, 350 (1965); *Acta neuroveg.* 29, 177 (1966).