

and ions account for 80 to 90% of the cellular osmotic pressure (Table II). The deficit in osmotic pressure is probably made up by various organic molecules as carnosine or anserine which are known to be present in large amounts in the muscle of various fishes^{4, 7, 11, 12}. During hyper or hyposmotic stress, there is no significant variation of the muscle total ionic content. On the other hand the amino-acid concentration changes with the osmotic adaptation. When going from the hypertonic medium (200% sea water) to the hypotonic one (fresh water), there is a 82% decrease in the amino-acid content of the mullet muscle and a 66% decrease in that of the flounder muscle (Table II). These changes affect most of the amino acids and cannot be attributed to a simple dilution process since the cellular water content does not change significantly during the adaptation to the various media. Moreover, the percentage of decrease observed in the amino-acid concentration varies with each amino acid. The most important changes are observed at the level of the so-called non essential amino acids (GLY, ALA, ASP, GLU, SER, PRO)¹³ and is specially important at the level of glycine, alanine and the amine taurine (Table I). Such a feature is also observed in all the euryhaline invertebrate species studied so far^{2, 3} as well as in vertebrate species^(4, 7, this paper) and suggests the possibility that the role played by the amino acids in the intracellular isosmotic regulation is a generalized mechanism existing in both invertebrates and vertebrates^{15, 16}.

Résumé. Au cours de l'adaptation de deux poissons euryhalins à des milieux hyper- ou hypotoniques, la teneur en eau du tissu musculaire ne varie pas en dépit

des modifications de la pression osmotique du plasma sanguin. Les acides aminés et particulièrement la glycine, l'alanine et une amine la taurine, paraissent impliqués dans ce processus de régulation de la pression osmotique intracellulaire.

P. LASSERRE¹⁷ and R. GILLES¹⁸

*Laboratory of Marine Membrane Physiology,
Duke University Marine Laboratory,
Beaufort (North Carolina 28516, USA), 21 June 1971.*

¹¹ A. LUKTON and H. S. OLCOTT, *Fd Res.* 23, 611 (1958).

¹² K. HORISAKA, *J. Biochem., Tokyo* 54, 349 (1963).

¹³ E. T. MERTZ, in *Fish in Research* (Academic Press, New York 1969), p. 233.

¹⁴ C. L. PROSSER, D. W. BISHOP, F. A. BROWN, T. L. JAHN and V. J. WULF, *Comparative Animal Physiology* (W. V. Saunders Co., Philadelphia 1950), p. 888.

¹⁵ This work was partly supported by a grant from the Ministère des Affaires Étrangères, France, to P.L., a 'Crédit aux Chercheurs' from the Fonds National de la Recherche Scientifique Belge to R.G. and by a grant No. HE 12157 from NIMH.

¹⁶ Acknowledgments. We are grateful to Dr. D. C. TOSTESON, Chairman of the Pharmacology and Physiology Department of Duke University, Durham, North Carolina for the interest he has taken in this research. We also wish to thank Dr. J. D. COSTLOW, Director of the Duke University Marine Laboratory, Beaufort, North Carolina, for the hospitality we have received at the station.

¹⁷ Permanent address: Institute of Marine Biology, University of Bordeaux, 33 Arcachon (France).

¹⁸ Chargé de Recherches du Fonds National de la Recherche Scientifique Permanent address: Department of Biochemistry, University of Liège. Liège (Belgium).

Numerical Hyperplasia in Human Heart Hypertrophy

It is still unknown whether in hypertrophied human hearts there is an increase in the number of heart muscle cell, i.e. heart muscle cell nuclei, or whether the enlargement of the heart muscle is related only to the enlargement of the single heart muscle fibres.

In earlier investigations (SANDRITTER and SCOMAZZONI¹ KOMPMANN et al.², FISCHER et al.³) a process of polyploidization in hypertrophic human hearts with increasing heart weight, meaning a multiplication of the DNA content per single heart muscle cell nucleus, was demonstrated by cytophotometric measurements. This finding suggested that biochemical DNA determination alone do not reflect the cell number. We therefore combined cytophotometric Feulgen DNA measurements with biochemical DNA determinations in order to calculate the number of heart muscle cells. The relative number of connective tissue cell nuclei was likewise considered.

Human hearts were obtained from autopsy material less than 24 h after death and weighed, after removal of epicardial fat and connective tissue. Samples of heart muscle, each weighing 10 g, were taken from 6 different sites of both ventricles. We have proved that these samples were representative for the whole individual heart muscle, because DNA determinations on 38 different sites of some hearts did not show any statistically significant differences in DNA amount or polyploidization pattern as measured from the 6 chosen sites. After extraction with perchloric acid, the total amount of DNA was determined by the diphenylamine reaction according to DISCHE⁴ and BURTON⁵. The cytophotometric DNA

measurements were performed with a Deeley Integrating Microdensitometer (DEELEY⁶) on 300 muscle nuclei per heart.

The number of connective tissue cell nuclei was determined in histological slides from 38 areas of each heart using a light microscope with a magnification of 400 ×. We calculated the number of connective tissue cell nuclei in relation to 100 heart muscle cell nuclei. Cytophotometric measurements showed that connective tissue cell nuclei all have, without exception, a diploid DNA pattern. Hydroxyproline determinations, according to STEGEMANN's method⁷ was taken as a measure of the amount of the connective tissue.

The evaluation of these parameters allows the calculation of the number of heart muscle cell nuclei, taking into account the amount of total DNA of the individual heart muscle, the amount of DNA of the heart muscle cell nuclei and the number of connective tissue cells.

¹ W. SANDRITTER and G. SCOMAZZONI, *Nature, Lond.* 202, 100 (1964).

² M. KOMPMANN, J. PADDAGS and W. SANDRITTER, *Arch. Path.* 82, 303 (1966).

³ B. FISCHER, G. SCHLÜTER, C.P. ADLER and W. SANDRITTER, *Beitr. Path.* 141, 238 (1970).

⁴ Z. DISCHE: in *The Nucleic Acids* (Ed. E. CHARGAFF and J. DAVIDSON, Academic Press, New York 1955).

⁵ K. BURTON, *Biochem. J.* 62, 315 (1956).

⁶ E.M. DEELEY, *J. scient. Instrum.* 32, 263 (1955).

⁷ H. STEGEMANN, *Z. physiol. Chem.* 370, 41 (1958).

The amount of DNA in a diploid cell nucleus, which can also be called 'genom', is according to VENDRELY and VENDRELY 6×10^{-12} g. From the biochemically estimated total amount of DNA of a heart, and the amount of DNA within a single genom, the total number of genomes (= diploid DNA values) per heart can be calculated by the formula:

$$\frac{\text{DNA}(\text{total per heart})}{\text{DNA}(\text{per genom})} = \frac{\text{DNA}(\text{total per heart})}{6 \times 10^{-12} \text{ g DNA}} = N, \quad (1)$$

where N is the total number of genomes per heart.

Because of the different ploidy values of the individual heart muscle cell nuclei, the number of genomes within the muscle cell nuclei is different. Therefore the percentage of the different ploidy classes (Figure 1) was taken as the base line for the number of genomes of the heart muscle cell nuclei; i.e. in a diploid nucleus there is 1 genom (N_{2c}), in a tetraploid nucleus there are 2 genomes ($2 N_{4c}$), in an octoploid nucleus there are 4 genomes ($4 N_{8c}$) etc. In this way we get the total number of genomes after addition of the number of diploid connective tissue cell nuclei per 100 muscle cell nuclei:

$$N_{CN} + N_{2c} + 2 N_{4c} + 4 N_{8c} \dots = N_G, \quad (2)$$

where N_G is the total number of genomes in relation to 100 heart muscle cells; N_{CN} is the number of diploid connective tissue cell nuclei per 100 muscle cell nuclei; N_{2c} is the percentage of diploid muscle cell nuclei; $2 N_{4c}$ is the percentage of genomes within the tetraploid muscle cell nuclei etc.

The total number of genomes (N_G) related to 100 muscle cell nuclei is related to the calculated number of cell nuclei ($N_N = 100 \text{ muscle cell nuclei} + \text{number of connective tissue cell nuclei per 100 muscle cell nuclei}$) as the total number of genomes (N ; see formula 1) to the total

$$\frac{N_G}{N_N} = \frac{N}{N_C}. \quad (3)$$

number of cell nuclei (N_C), or expressed by the formula: Using this calculation, the total amount of cell nuclei in the individual hearts can be estimated:

$$N_C = \frac{N_N}{N_G} \times N. \quad (4)$$

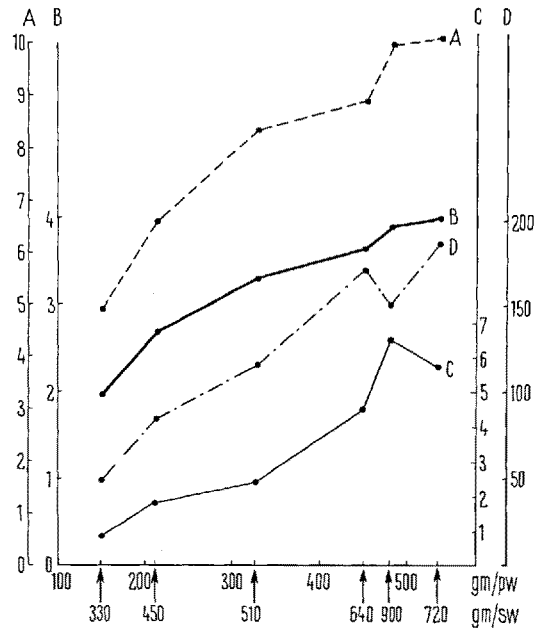


Fig. 2. Cell number and amount of DNA and collagen in human hearts in relation to heart weight. p.w. = preparation weight = heart muscle weight after removal of fat tissue; s.w. = section weight = total weight of the unprepared heart.

A, numbers of cell nuclei in connective tissue $\times 10^9$;

B, numbers of cell nuclei in heart muscle $\times 10^9$;

C, g collagen (total per heart); D, mg DNA (total per heart).

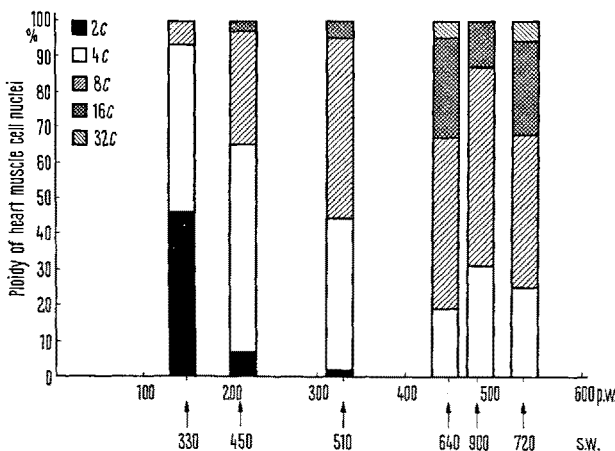


Fig. 1. Ploidy pattern of human heart muscle cell nuclei depending on heart weight. Percentage of different ploidy classes taken from cytophotometric measurements show an increasing polyploidization with increasing heart weight.

p.w. = preparation weight = heart muscle weight after removal of fat tissue; s.w. = section weight = total weight of the unprepared heart; 2c, diploid DNA content; 4c, tetraploid DNA content; 8c, octoploid DNA content, etc.

From the difference between the percentage of heart muscle cell nuclei and connective tissue cell nuclei, the total amount of heart muscle cell nuclei can be estimated.

Figure 1 shows the polyploidisation pattern of all 6 hearts where the process of polyploidisation during heart hypertrophy is obvious. Figure 2 reveals that with increasing heart weight, the DNA content increases (curve D) and that at the same time there occurs an increase in the amount of collagen (curve C). The increase in the number of connective tissue cell nuclei in the 900 g heart, as compared to the 330 g heart, is about 100% (curve A).

Using the above formula, we calculated 2×10^9 heart muscle cell nuclei in normal hearts, and in maximally hypertrophied hearts an increase of up to 4×10^9 heart muscle cell nuclei (curve B). It has been proved by histological techniques that generally 1 cell nucleus belongs to 1 heart muscle cell. There are only a few muscle fibres (less than 2%) with double nuclei in the hypertrophied hearts. So it can be postulated that in normal and slightly hypertrophied human hearts the amount of heart muscle cells lies in the range of 2×10^9 , and in maximally hypertrophied human hearts, there is an increase in the number of heart muscle cells of up to 100%.

From these measurements it becomes clear that numerical hyperplasia of heart muscle cells occurs with hypertrophy. The weight increase in heart hypertrophy is a function of increase in volume, i.e. the dry mass (SANDRITTER and SCOMAZZONI¹) and a numerical increase of heart muscle cells.

Zusammenfassung. Mit Hilfe kombinierter biochemischer und zytophotometrischer DNS-Messungen wurde die Anzahl der Herzmuskelzellen in Menschenherzen be-

stimmt. Normale Menschenherzen (330 g) haben nach dieser Berechnung 2×10^8 Muskelzellen. In hypertrophierten Herzen (500–900 g) nimmt die Zellzahl bis auf 4×10^8 Muskelzellen zu.

W. SANDRITTER and C. P. ADLER

Pathologisches Institut der Universität,
Ludwig-Aschoff-Haus,
Albertstrasse 19, D-78 Freiburg im Breisgau (Germany),
30 July 1971.

Bewegungsmimikry bei *Carausius morosus* Br. (Phasmida)

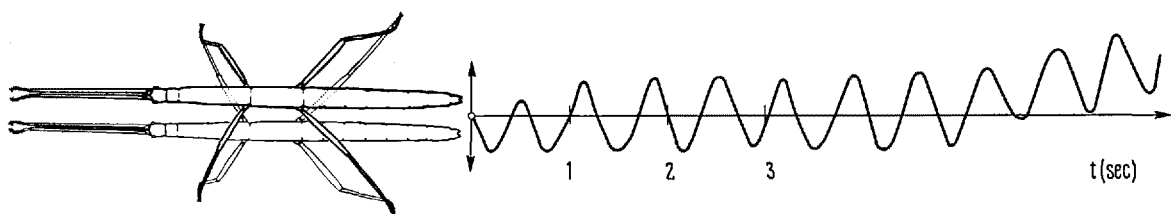
Die mimetische Körperform der Stabheuschrecke wird von allen Beobachtern ad hoc anerkannt^{1,2}. Da diese Tiere während der Nacht aktiv sind, interessiert die Beantwortung der Fragen, wozu die auffälligen, schaukelnden Bewegungen während des Tages ausgeführt werden und ob diese nicht den Schutz, den ihnen ihre Körperform verleiht, aufheben; denn relative Bewegungen eines Tieres gegenüber seiner Umgebung verhindern seine Tarnung.

Unter «Schaukeln» wird im Folgenden ein seitliches, rhythmisches Hin- und Herschwingen des ganzen Tieres verstanden (ohne Vorwärtsbewegung). Zufällige Beobachtungen der Schaukelbewegungen in unserem Zuchtkäfig führten zu einer genaueren Kontrolle. Dabei stellte sich heraus, dass die bei Tage ruhig sitzenden Tiere oft dann schaukelten, wenn sie in einem $\pm$ luftdicht abgeschlossenen Gefäß (Aquarium) waren, das auf einer Heizung stand (40–50°C). Wurde die Temperatur stärker erhöht oder wirkte diese länger ein, so versuchten die Tiere zu fliehen. Bei konstanter Temperatur (25°C) konnte das Schaukeln auch durch hohe Luftfeuchtigkeit ausgelöst werden, in dem der Boden und die Wände des Aquariums mit Wasser besprengt wurden. Die Tiere wippen je nach Temperatur und Feuchtigkeit unterschiedlich lange (10 sec bis 2 min) hin und her.

Zur genaueren Erfassung wurden die Bewegungen mit einer Paillard-Bolex-Kamera gefilmt. Auf der Rückseite des Aquariums war Millimeterpapier gespannt. Zur Vermeidung von Reflexen wurde die vordere Trennscheibe entfernt. Heizen war überflüssig, da die grellen Filmleuchten (600 Watt) für schnelle Erwärmung sorgten.

Bei der bildweisen Einzelauswertung von 17 Schaukel-szenen ergab sich folgendes: Die Frequenz der Bewegungen liegt durchschnittlich bei 3 Hz und kann zwischen 1 und 5 Hz schwanken. Sie ist unabhängig von der Grösse und dem Alterszustand der Larven und Imagines. Ein Tier kann sich auch unmittelbar hintereinander mit verschiedenen Frequenzen bewegen. Entsprechendes gilt für die Amplitude, die zwischen 1 mm und 2 cm liegen kann. (Das Maximum der Amplitude ist natürlich mit der

Spannweite der Extremitäten korreliert). Im Durchschnitt dauern die Schaukelbewegungen nur kurz: 10–30 sec. Das Schaukeln ist in allen Raumlagen möglich und kann mit 6 oder 4 (selten 2) Beinen ausgeführt werden, wobei immer der ganze Körper bewegt wird. Der Beginn der Bewegungen setzt meist ruckartig und mit voller Amplitude ein. Das Ende läuft allmählich aus, in dem die Amplitude sukzessiv abnimmt; jedoch lässt sich kein typisches Dekrement errechnen. Häufig kommt es vor, dass die Tiere nicht um ihre Ruhelage in gleichem Abstand hin- und herschwingen, sondern ihre Bewegungen neben dieser Normallage ausführen, ähnlich einem schwingenden Ast, der vom Winde zur Seite gedrückt wird (Figur). Bei fortdauernder Wärmeeinwirkung versuchen sie den Standort zu wechseln und schaukeln dabei anfänglich noch weiter, so dass eine Kombination zwischen normalem Gehen und Schaukeln entsteht, die in reines Laufen überleitet. – Durch starke Temperaturerhöhungen sind die Schaukelbewegungen auch während der aktiven Nachtphase der Tiere auslösbar. – Aus diesen Beobachtungen wird geschlossen, dass die Schaukelbewegungen der Stabheuschrecken der Regulation ihrer Körpertemperatur durch Verdunstung dienen. Zur Stütze dieser Folgerung wurde der Gewichtsverlust von 12 Stabheuschrecken während 5-minütiger Bestrahlung (Rotlicht, wobei mehrmals geschaukelt wurde) einzeln bestimmt: im Durchschnitt 1,8 mg pro Tier und 5 min. Eine gleichstarke Kontrollgruppe ruhender Tiere hatte unter konstanten Bedingungen eine Gewichtsabnahme von durchschnittlich nur 0,4 mg pro Tier und 5 min. Dieser Befund deckt sich gut mit den Ergebnissen von NECHELES³, der für *Periplaneta* Körperabkühlung durch



Schaukelnde Stabheuschrecke, die ihre Mittellage nach oben verschiebt.

¹ R. M. Fox und J. W. Fox, *Introduction to Comparative Entomology* (Reinhold Publishing Corporation, New York 1964).

² U. BÄSSLER, *Das Stabheuschreckenpraktikum* (Franckh'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart 1965).

³ H. NECHELES, *Arch. ges. Physiologie* 204, 72 (1924).