

in large amounts in the granular pneumocytes from amphibian lungs, as reported by BARGMAN and KNOOP⁸.

It has been established that vagotomy in mammals^{1,9} alters the surface tension properties of lung extracts and induces an almost complete disappearance of the lamellar osmiophilic inclusions from granular pneumocytes. As the lung of the frog seems not to produce surface active agents similar to those found in mammals, and large amounts of osmiophilic inclusions can be observed in the granular pneumocytes of this species, it was decided to investigate their basic chemical composition and whether these structures are under vagal control.

Material and methods. 6 (male adult) toads (*Bufo icterus icterus*) were used for this experiment. 4 of these animals were bilaterally vagotomized, under ether anesthesia, at the mid cervical region. The frogs were maintained in normal laboratory conditions and their lungs removed immediately after natural death. The lungs removed from two untreated animals were used as control.

Fragments of lung fixed for 2 h in 2% glutaraldehyde in 0.32 M phosphate buffer (pH 7.2) at ice temperature followed by fixation in 1% OsO₄ for 1.5 h, were dehydrated in ethanol and embedded in araldite. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and studied with a Zeiss EM9S2 electron microscope at 60 Kv. Fragments of lungs removed from control animals were fixed as above, immersed for 5 h in 2 ml of 2:1 chloroform-methanol mixture¹⁰ at 60 °C and embedded in araldite.

Results and conclusions. Only one type of alveolar cells could be found in the normal lung of the frog (Figure 1). These cells displayed abundant lamellar and osmiophilic cytoplasmic inclusions, characteristic of the granular pneumocytes¹¹. Occasionally, the spatial relation between the cell membrane and these inclusions strongly suggests that the latter are being extruded into the alveolar lumen (Figure 2). The treatment of normal lung fragments by the chloroform-methanol mixture, determined the disappearance of the lamellar osmiophilic inclusions (Figure 3).

The vagotomized animals died in a period of 4–36 h after surgery. The most consistent and notable alterations in the ultrastructure of the lungs were those related to the

morphology of the granular pneumocytes. 36 h post vagotomy, a marked attenuation of the lamellar inclusions, as well as a decrease in their osmiophilic, was observed. The analysis of these cells have also shown an almost complete absence of mitochondria (Figure 4).

We suppose it is permitted to conclude that: 1. The alveolar wall of the normal lung of the frog is lined by only one cell type i.e., by granular pneumocytes. 2. The lamellar osmiophilic inclusions observed in the cytoplasm of these cells seems to have a similar composition to those in mammalian pneumocytes¹⁰. 3. The almost complete absence of the osmiophilic granular inclusions after vagotomy is in accordance to conditions in mammalian lungs^{1,9}.

These findings support the hypothesis that the production of the lamellar osmiophilic inclusions in the granular pneumocytes from the lung of the toad, in a similar way as in mammals, is under vagal control. However, we suppose it is licit to speculate about the real relation between the granular pneumocytes and surfactant production. If no lowering of tension activity could be demonstrated in the lung of the frog, what may be the participation of the osmiophilic inclusions in lung physiology and pathology?

Zusammenfassung. Nachweis einer einzigen Zellart vom Typ der granulären Pneumocyten in der Alveolarwand normaler Froschlungen. Die osmiophilen Zelleinschlüsse (Chloroform-Methanol-löslich) verschwinden 36 h nach Vagotomie wie bei Säugetieren.

A. BEREZIN and W. DA SILVA SASSO

Departamento de Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa, São Paulo, and Departamento de Morfologia da Escola Paulista de Medicina, Rua Botucatu, 270, São Paulo (Brasil), 18 March 1974.

⁸ W. BARGMAN and A. KNOOP, Z. Zellforsch. 44, 263 (1956).

⁹ V. E. GOLDENBERG, S. BUCKINGHAM and S. C. SOMMERS, Lab. Invest. 16, 693 (1967).

¹⁰ F. B. ASKIN and C. KUHN, Lab. Invest. 25, 260 (1971).

¹¹ C. C. MACKLIN, Lancet 1, 1099 (1954).

Innervation des Tracheenblasenepithels bei der Büschelmücke *Corethra plumicornis* (Chaoborus)

Die Larvenformen der Büschelmücke *Corethra* besitzen im Thoralkalsegment und im 7. Abdominalsegment jeweils 2 als Schwebeorgane dienende Tracheenblasen, denen Pigmentzellen aufgelagert sind. Die Form- und Lageveränderung dieser amöboid beweglichen Zellen ist als eine Sonderform des physiologischen Farbwechsels bekannt¹: auf hellem Untergrund sind die Farbzellen kugelförmig geballt und auf eng begrenzte Areale konzentriert; auf dunklem Untergrund erfolgt eine großflächige Ausbreitung der Pigmentzellen, bei gleichzeitiger Dispersion des Pigments, die zu einer fast völligen Abschirmung der Tracheenblasen führen kann. Schnürungs-, Implantations- und Injektionsversuche lassen eine Steuerung der Pigmentbewegung durch neurohormonale Faktoren aus den Kopf- und Abdominalganglien^{1–3} und durch nervöse Beeinflussung⁴ vermuten.

Im Rahmen einer Untersuchung zur Motilität der Farbzellen wurden licht- und elektronenmikroskopische

Befunde gewonnen, die auf eine enge morphologische und funktionelle Beziehung des Nervensystems zu den Farbzellen hinweisen.

Material und Methode. Für die Untersuchungen wurden Tiere im 4. Larvenstadium verwendet. Für die Lichtmikroskopie erfolgte die Fixierung der Tracheenblasen in alkoholischer Bouinlösung (Rossman). Nach der Fixierung wurden sie der Silberimprägnation nach Palmgren unterworfen.

Die elektronenmikroskopischen Präparate kamen nach der Fixierung in Osmiumsäure (2%), gepuffert in Veronalacetat ($5,7 \times 10^{-3}$ M; pH 7,4) mit 3% Saccarose-

¹ A. KOPENEC, Z. vergl. Physiol. 31, 490 (1949).

² M. DUPONT-RAABE, C. r. Acad. Sci., Paris 228, 130 (1949).

³ M. GERSCH, Z. vergl. Physiol. 39, 190 (1956).

⁴ E. HADORN und G. FRIZZI, Revue suisse Zool. 56, 306 (1949).

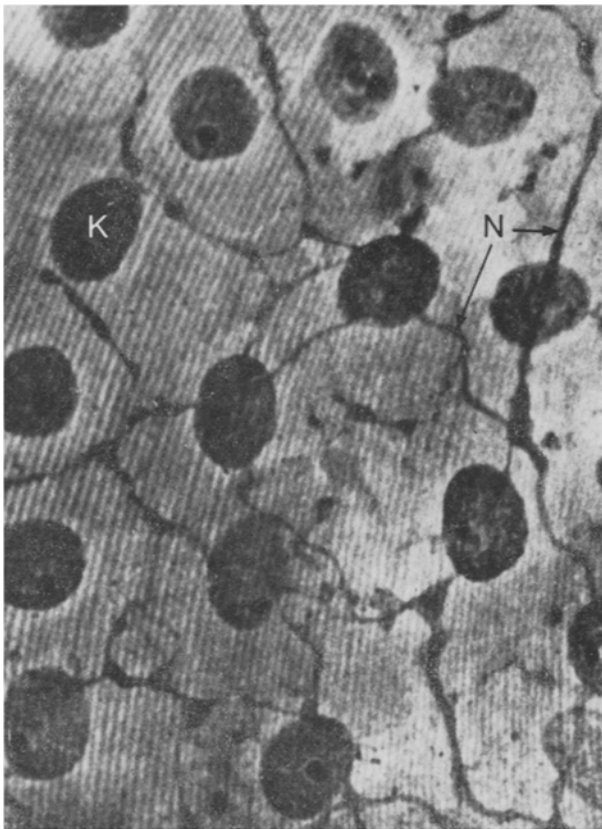


Fig. 1. Tracheenblasenepithel mit Nervennetz (N). K, Kerne der Epithelzellen. $\times 800$.

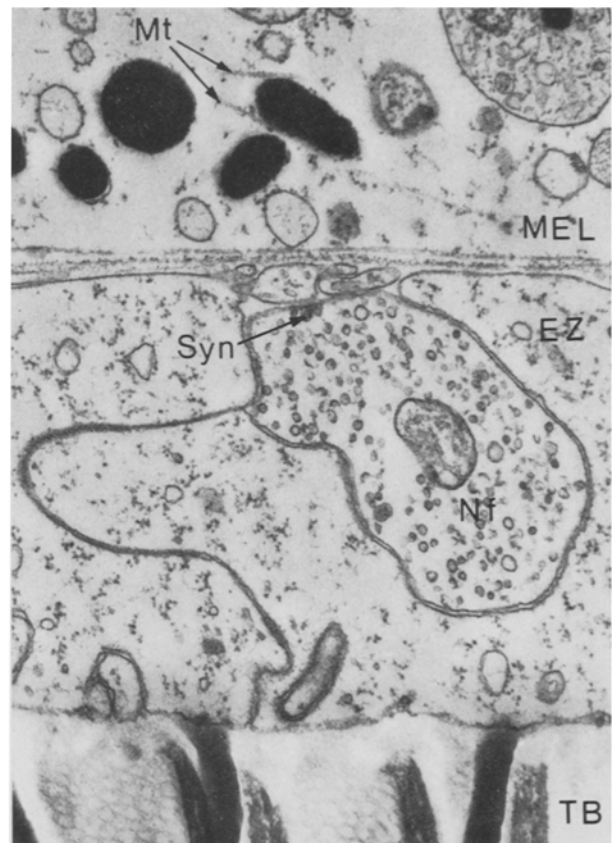


Fig. 2. Querschnitt durch eine Tracheenblase (TB) mit Epithelschicht (EZ) und Melanophore (MEL). Zwischen den Epithelzellen eine Nervenfasern (Nf) mit Synaptoid (Syn). Mikrotubuli (Mt) in Kontakt mit einem Melanosom. $\times 28000$.

zusatz, zur Einbettung in Styrol-Methacrylat-Benzoylperoxid. Kontrastierung der Schnitte (Reichert Om U3) mit Uranylacetat und Bleicitrat. Elektronenmikroskop: EM 9A (Zeiss).

Befunde. Im lichtmikroskopischen Bild lässt sich nach der Silberimpragnation im Bereich des gesamten Tracheenblasenepithels ein Netz von Nervenfasern darstellen, die teilweise miteinander anastomosieren, zum andern in knopfartigen Verdickungen enden (Figur 1).

Elektronenmikroskopische Querschnittsbilder vermitteln ein genaueres Bild über den dreischichtigen Aufbau: über der chitinenen Auskleidung der Tracheenblase breitet sich das einschichtige Epithel aus, dessen polygonale Zellen eng miteinander verzahnt sind. Dem Epithel sind die Pigmentzellen aufgelagert. Im kontrahierten Zustand bilden sie eine Anhäufung abgekugelter und teilweise übereinanderliegender Zellen. Neben Zellkern und vereinzelt Mitochondrien ist das Zellinnere hauptsächlich von Melanosomen (mittlerer Durchmesser $0,6 \mu\text{m}$) erfüllt. Dazwischen erstrecken sich Mikrotubuli in unregelmässiger Anordnung. Im Verlauf der Pigmentdispersion nehmen die Zellen eine flache diskusförmige Gestalt an und liegen einzeln ausgebreitet auf der Blase.

Zwischen den Epithelzellen erscheinen im elektronenmikroskopischen Querschnittsbild Profile von Nervenfasern. Sie liegen vorzugsweise im basalen, den Pigmentzellen zugewandten Bereich des Epithels.

Bei der Auswertung von Schnittfolgen fand sich über mehrere Schnitte eine lokale Anhäufung von elektronen-

optisch leeren Vesikeln, an dem den Pigmentzellen zugewandten Abschnitt der Fasermembran. (Figur 2). Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine als «Synaptoid» bekannte Freisetzungsstelle von Transmittersubstanzen an das Interstitium. Lage und Struktur dieser Elemente lassen darauf schließen, dass die Formveränderung der Pigmentzellen nicht nur durch einen in der Hämolymphe zirkulierenden «Kopffaktor» gesteuert wird, sondern auch noch unmittelbar am Erfolgsorgan freigesetzte Transmittersubstanzen wirksam werden. Das Zusammenspiel dieser doppelten Kontrolle bleibt weiter zu untersuchen.

Summary. Light and electron microscope observations of the air sacs of the larva of *Corethra* (Chaoborus) *plumicornis* reveal a network of nerve fibres scattered amongst the epithelium. In the axoplasma, accumulations of vesicles (synaptoid) are found. The arrangement and structure of these nervous elements make it possible to discuss the physiological colour change of *Corethra* in terms of a double control mechanism.

K. WEMHÖNER und W. WEBER

Zoologisches Institut der Universität, Tierphysiologie, Weyertal 119, D-5 Köln 41 (Bundesrepublik Deutschland), 5. November 1973.