

NAUČNO DRUŠTVO NR BOSNE I HERCEGOVINE
ODJELJENJE MEDICINSKIH NAUKA
SOCIETAS SCIENTIARUM BOSNAE ET HERCEGOVINAE
SECTIO SCIENTIARUM MEDICINAE

RADOVI
ACTA

I



SARAJEVO
1953

DEJSTVO BERILIJUMA NA MORFOGENEZU

R. Milin, J. Grujić i B. Bobarević

Problem berilioza pretstavlja važno područje u industrijskoj patologiji, prismo vezano za sve češću i neminovnu upotrebu tog lakog metala u industriji atomske energije. Pored sve brojnijih kliničkih zapažanja industrijskih intoksikacija, iz godine u godinu se povećava broj radova eksperimentalnog karaktera, u cilju proučavanja dejstva berilijuma, odnosno mehanizma u patogenezi berilioza. Pri tome su od posebnog interesa radovi biološkog karaktera.

Na osnovu zapažanja Pol ic a r d - a (15, 16), T u c h m a n n - D u p l e s s i s - a (23), pod uticajem berilijuma nastaje plućna berilijumska granulomatoza, eksperimentalni osteosarkom, sporije zarašćivanje rana, odnosno usporena regeneracija ekstremiteta amfibijska. Pri tome treba istaći da je berilijev jon toksičan sam po sebi (H u n t e r, 12). Ogleđima sa kulturom tkiva, C h è v r e m o n t i F i r k e t (2, 3, 6) su pokušali da inhibitorno dejstvo berilijuma na rast fibroblasta i miohlasta, protumače poremećajem mitoze u stadiumu metafaze, pri čemu bi se elektivno inhibirao efekat alkalne fostaze, tog nuklearnog enzima koji igra ulogu u sintezi nukleinskih kiselina. Do istovetnih konstatacija su došli K l e m p e r e r i s a r a d n i c i (1. cit. in 2) biohemijskim ogleđima na alkalnim fosfatazama ekstrahovanim iz raznih organa.

Imajući u vidu antimitotično i antienzimsko svojstvo berilijuma, jedinog lakog metala koji ne ulazi u sastav živih bića, kao i njegov biološki značaj u savremenoj industriji, želja nam je da u ovom radu prikažemo uticaj berilijuma na rast i metamorfozu punoglavaca, koji pretstavljaju uzoran organizam u punom jeku razvoja, i time pokušamo da doprinesemo proučavanju mehanizma njegovog dejstva.

I. Materijal i tehnika

Oglede smo izvodili u mesecu maju i junu 1953 godine, na punoglavcima vrste *Bufo vulgaris*, odgajenim u Institutu za histologiju, pošto smo jaja u više navrata sakupili iz bara u neposrednoj okolini Sarajeva. Punoglavce smo podelili u četiri grupe. Prvoj grupi (grupa I) pripadali su punoglavci stari 30 dana, drugoj (grupa II) stari 40, a trećoj (grupa III) stari 50 dana. Punoglavci iz svih triju

grupa su bili podvrgnuti uticaju rastvora berilijevog nitrata u odnosu 0,13:1000 gr. pijaće vode iz Sarajevske vodovodne mreže, jedan dan prethodno ustajale na sobnoj temperaturi, da bi se izbegao uticaj velike razlike u temperaturi. Četvrtu grupu (grupa IV) sačinjavali su punoglavci stari 35 dana, izloženi uticaju berilijevog nitrata u odnosu 0,013:1000. Za svaku grupu oglednih punoglavaca imali smo isti broj kontrolnih. Ishrana je bila jednoobrazna (prokuvan i sitno iseckan spanać), posude su bile staklene i jednake zapremnine, uvek sa istom količinom rastvora, a podloga tla bela. Rastvor smo svakodnevno menjali, kojom prilikom su i posude uvek prane. Merenje temperature vode i vazduha je također vršeno svaki dan, u isto vreme, a težina punoglavaca svaki šesti-sedmi dan, tako da se u protokol unosila prosečna pojedinačna vrednost za punoglavce odgovarajućih oglednih i kontrolnih grupa.

U cilju izrade histo-embrioloških preparata, svakih sedam dana je žrtvovan po jedan kontrolni i ogledni punoglavac iz svake grupe. Fiksacija je vršena u Bouin-ovoj tečnosti, kalupljenje u parafinu, a bojenje po trojnoj metodi Florentin-a.

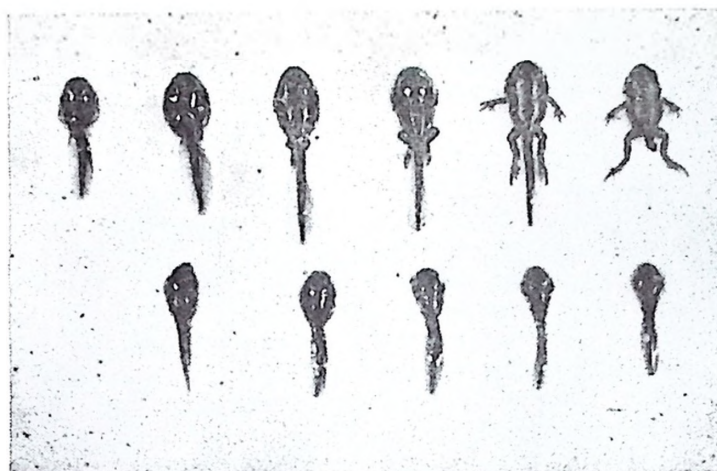
S' obzirom na uticaj fiziko-hemijskih faktora sredine u kojoj se razvijaju punoglavci, svakodnevno je vršeno merenje pH vrednosti vode, odnosno rastvora berilijevog nitrata za svaku grupu. Naime, određivan je pH sveže sačinjenog rastvora nitrata, pre potapanja punoglavaca, zatim pH istog rastvora nakon 24 časa, to jest pošto su u njemu boravili punoglavci, uporedo sa merenjem pH vrednosti upotrebljavane pijaće vode, kao i vode u kojoj su boravili kontrolni punoglavci. Ova merenja su vršena na potencijometru tipa »Potentiometer Fischer Scientific Company«. Pri radu smo se služili hinhidronovom elektrodom.

II. Rezultati

A. Rezultati morfološko-fiziološkog karaktera

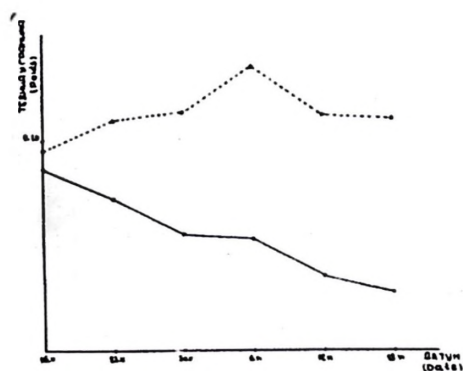
1. Punoglavci I grupe. — Ogled je počeo 16. V. 1953. Broj oglednih i kontrolnih punoglavaca: po 60 komada. Starost: 30 dana. Upotrebljena koncentracija berilijevog nitrata: 0,13:1000.

Petog dana ogledni punoglavci su manji od kontrolnih, izduženog i kruškolikog trupa. Pokret su im živahni, ali počinju slabije da uzimaju hranu. Narednih dana razlika u rastu, izražena i u postepenom smanjenju telesne težine, sve više dolazi do izraza, dok im se kruškoliko-lancetasti oblik trupa sve više ispoljava. Uporedo s navedenim pojavama, nakon dve sedmice, punoglavci su tromijih pokreta, još slabije jedu. Dok su kod kontrolnih u to doba već razvijeni zadnji ekstremiteti, u stadiumu 12—13 po Delsol-u (5), kod oglednih uopšte nema znakova metamorfoze. Idućih dana njihova težina i dužina sve više opadaju, dostižući uvek manju vrednost od težine i dužine iz prethodnih dana (Sl. 1, grafikon 1). Istovremeno počinje da se javlja i smrtnost, tako da je u razdoblju od 31. V. 1953.—6. VI. 1953. uginulo 4, a od 7. VI.—18. VI. ukupno 7 punoglavaca. Od 6. VI. 1953 svi ogledni punoglavci su nepokretni,



Sl. 1. Punoglavci I. grupe. Gornji red kontrolni, donji red ogledni. Datum: 16. V., 23. V., 30. V., 6. VI., 12. VI., 18. VI. Involutivne promene u rastu oglednih punoglavaca.

Fig. 1. Têtards du I. groupe. En haut témoins, en bas traités. Date: 16. V., 23. V., 30. V., 6. VI., 12. VI., 18. VI. Involution dans la croissance de têtards traités.



Grafikon br. 1. Punoglavci I. grupe ——— ogledni, kontrolni
Opadanje u težini oglednih punoglavaca.

Graphique 1. Têtards du I. groupe ——— Têtards traités,
Têtards témoins. Baisse en poids de têtards traités.

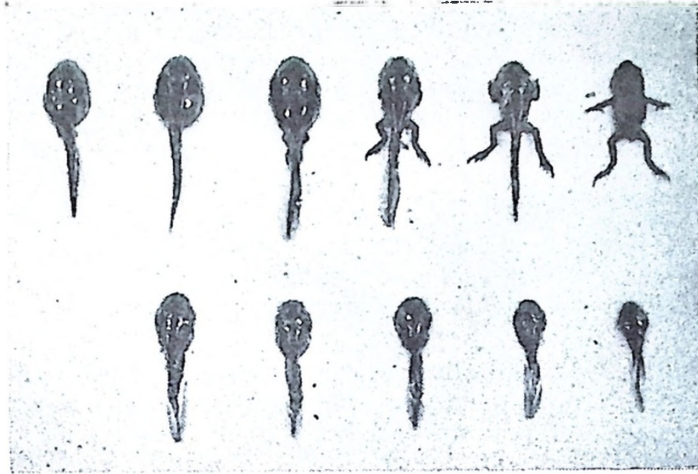
više ne jedu. Nakon jedne sedmice od tog dana, dok su kontrolni punoglavci sa već dobro razvijenim prednjim i zadnjim ekstremitetima, odgledni su još manjeg rasta, bez ikakvih znakova metamorfoze, sa dvostruko manjom težinom od one koju su imali prvog dana, pre početka ogleada. Involutivno-regresivne promene s' obzirom na rast, ispoljavale su se sve do kraja ogleada, to jest 18. VI. 1953, kada smo prestali sa primenom berilijeovog nitrata, u želji da vidimo da li su one reverzibilnog karaktera. U tu svrhu preživeli punoglavci smo podelili u dve podgrupe. Prvu podgrupu smo održavali u pijaćoj vodi, a drugoj smo dodavali po 1 ccm rastvora ACTH firma »Organon« (koncentracije 0, 1 I. J. na 6 ccm bidestilisane vode) na 500 gr. pijaće vode. Pretežni broj punoglavaca obeju podgrupa već petog dana postaje pokretljiv, ponovo uzimaju hranu i počinju da napreduju u rastu, dok ih 30% gine iz jedne i druge podgrupe, bez ikakvih promena u rastu. Pri tome valja istaći da se podgrupa tretirana rastvorom ACTH, odlikuje bržim rastom i bržom metamorfozom od prve podgrupe, to jest od netretiranih punoglavaca. Međutim težina i veličina već metamorfoziranih žabica je podjednaka kod obeju podgrupa.

Prosečna težina u gramima oglednih i kontrolnih punoglavaca I i II grupe:

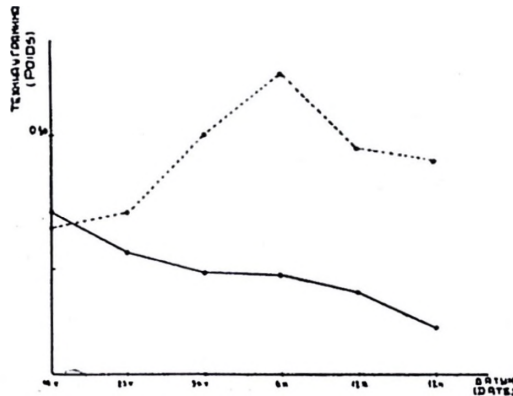
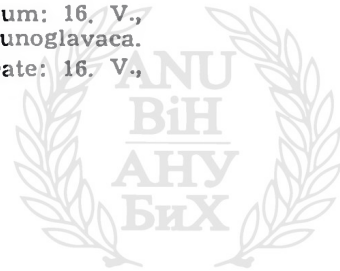
Datum	I. grupa		II. grupa	
	ogledni	kontrolni	ogledni	kontrolni
16. V. 1953	0,068	0,061	0,086	0,095
23. V. 1953	0,051	0,068	0,072	0,109
30. V. 1953	0,043	0,101	0,055	0,113
6. VI. 1953	0,042	0,127	0,053	0,135
12. VI. 1953	0,035	0,095	0,036	0,112
10. VI. 1953	0,020	0,09	0,028	0,11

2. Punoglavci II grupe. — Početak ogleada: 16. VI. 1953, broj punoglavaca: 60, starost: 40 dana (zadnji ekstremiteti su u 7-om stadiumu po Delsol-u: zadnji nožni pupoljak je u vidu izduženog patrljaka). Koncentracija berilijeovog nitrata: 0,13:1000.

Razlika u rastu, u upoređenju sa kontrolnom grupom, se odražava šestog dana ogleada. Kao i kod prethodne grupe, trup im se izdužuje, hranu slabije uzimaju. Dok su pupoljci zadnjih ekstremiteta kontrolnih povijaju i šire, kod oglednih punoglavaca oni su manji nego prvog dana ogleada. Ukoliko se produžuje trajanje ogleada, involutivno-regresivne promene se sve više i više ispoljavaju: rastom stalno opadaju, kako u odnosu prema kontrolnim tako i prema svojoj težini iz prethodnih dana (Sl. 2, grafikon 2). Nakon druge sedmice pokreti su im mnogo tromiji, hranu znatno slabije uzimaju no ranije. Krajem četvrte sedmice, dok se kod kontrolnih već počinju javljati prednji ekstremiteti, uz već dobro razvijene zadnje, kod oglednih punoglavaca pupoljak zadnjih ekstremiteta atrofiše i



Punoglavci II. grupe. Gornji red kontrolni, donji red ogledni. Datum: 16. V., 23. V., 30. V., 6. VI., 12. VI., 18. VI. Involucija u rastu oglednih punoglavaca.
 Fig. 2. Têtards du II. groupe. En haut témoins, en bas traités. Date: 16. V., 23. V., 30. V., 6. VI., 12. VI., 18. VI.



Grafikon br. 2. Punoglavci II. grupe, ——— ogledni, kontrolni, Opadanje u težini oglednih punoglavaca.
 Graphique 2. Têtards du II. groupe, ——— traités témoins. Baisse en poids de têtards traités.

takvo stanje traje sve do kraja ogleda, to jest do 18. VI. 1953. Smrtnost se javlja počev od 3. VI. 1953: od tog datuma, pa sve do završetka ogleda, uginulo je svega 13 komada. Preživjele punoglavce ove grupe smo također podelili u dve podgrupe, stavljajući ih u iste eksperimentalne uslove kao i kod I grupe. Prestankom primene berilijevog nitrata involutivno-regresivne promene u rastu i težini su također prestale i, izuzimajući uginule punoglavce, iste procentualne vrednosti kao i kod I grupe, kod ovih obeju podgrupa punoglavaca morfogeneza se progresivno odvijala. Pri tome su rast i metamorfoza bili brži kod podgrupe tretirane adreno-kortikotropnim hormonom.

3. Punoglavci III grupe. — Početak ogleda: 21. V. 1953. Broj punoglavaca: 60, starost: 58 dana (zadnji ekstremiteti u 10-om stadiumu po D elso l-u: na kraju zadnjih nožnih pupoljaka rastu izdanci prstiju); upotrebljena koncentracija berilijevog nitrata: 0,13:1000.

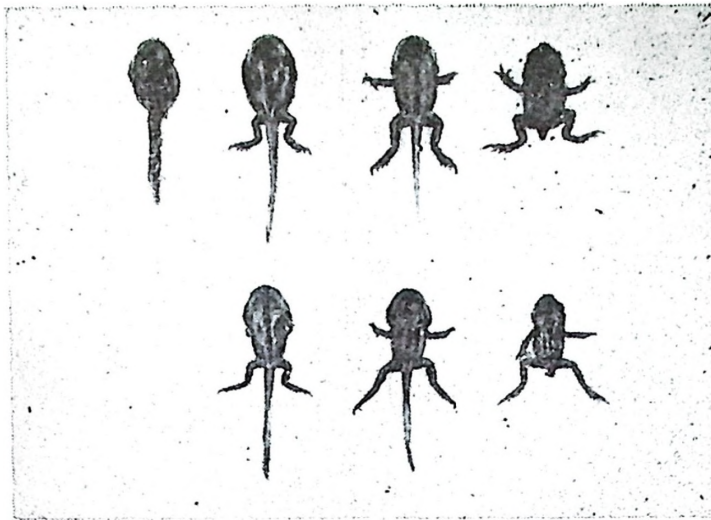
Za razliku od prethodnih dveju grupa, ogledni punoglavci iz ove grupe uopšte ne pokazuju tromije pokrete, niti pak smanjenu proždrljivost. Jedino su manji (s' obzirom na težinu) od kontrolnih, kao i nešto sporije metamorfoze (Sl. 3, grafikon 3). Tako na primer dok su se svi kontrolni punoglavci do 11. VI. 1953 već potpuno metamorfozirali, kod oglednih punoglavaca je preostala jedna trećina sa nepotpuno razvijenim prednjim ekstremitetima. Već razvijene ogledne žabice manje su rastom od kontrolnih. Smrtnosti uopšte nije bilo kod ove grupe:

Prosečna težina u gramima punoglavaca III. grupe:

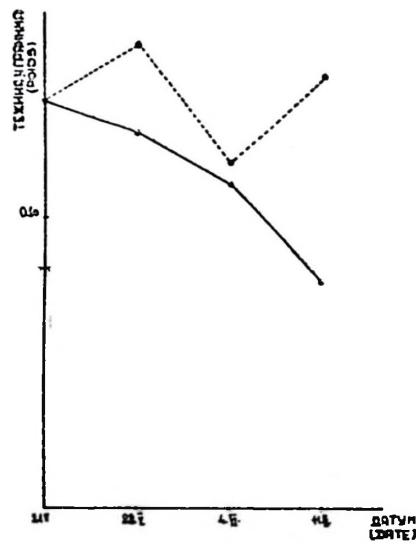
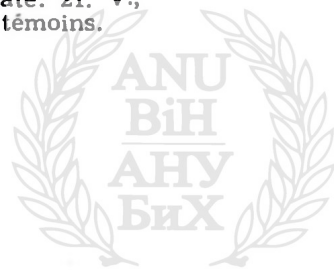
Datum	Ogledni	Kontrolni
21. V. 1953	0,14	0,14
28. V.	0,13	0,16
4. VI.	0,11	0,12
11. VI.	0,08	0,15

4. Punoglavci IV grupe. — Ogled počeo 22. V. 1953. Broj punoglavaca: 60, starost: 35 dana. Koncentracija berilijevog nitrata: 0,013:1000.

Sedmog dana se jasno primećuje da ogledni punoglavci zaostaju rastom od kontrolnih, ali u upoređenju sa njihovom vlastitom težinom, uzetom neposredno pred početak ogleda, oni napreduju. Ovo se svojstvo stalno ispoljava u narednim sedmicama. Njihova živahnost i proždrljivost su pri tome iste kao i kod kontrolnih punoglavaca. Zaostajući tako rastom u upoređenju prema kontrolnim, a napredujući u upoređenju prema vlastitoj težini iz prethodnih dana, odnosno sedmica, ogledni punoglavci se sporije metamorfoziraju. Tako, na primer, dok 12. V. 1953 kod svih kontrolnih punoglavaca već postoje razvijeni zadnji ekstremiteti, kod oglednih



Sl. 3. Punoglavci III. grupe. Gornji red kontrolni, donji red ogledni. Datum: 21. V., 28. V., 4. VI., 11. VI. Ogledni punoglavci su manji od kontrolnih.
 Fig. 2. Têtards du III. groupe. En haut témoins, en bas traités. Date: 21. V., 28. V., 4. VI., 11. VI. Les têtards traités sont plus petits que les témoins.



Grafikon br. 3. Punoglavci III. grupe, ——— ogledni, kontrolni, Opadanje težine oglednih.
 Graphique 2. Têtards du III. groupe, ——— traités, témoins, Baisse en poids de têtards traités.

se tek razlikuje njihov pupoljak u 11–12-om stadiumu po Delsol-u. Od tog doba nastaje izvesan gubitak telesne težine oglednih, da bi se nakon dve sedmice ponovo digla, što pada u vreme razvoja zadnjih ekstremiteta. Dok se metamorfoza svih kontrolnih punoglavaca već završila 19. VI. 1953, metamorfoza kod četvrtine oglednih se završila 12. VII. 1953 (Sl. 4, grafikon 4), produžujući se kod preostalih sve do 15. VIII. 1953. Smrtnosti uopšte nije bilo kod ove grupe. Metamorfozirani punoglavci odnosno već razvijene žabice, manje su rastom od kontrolnih.

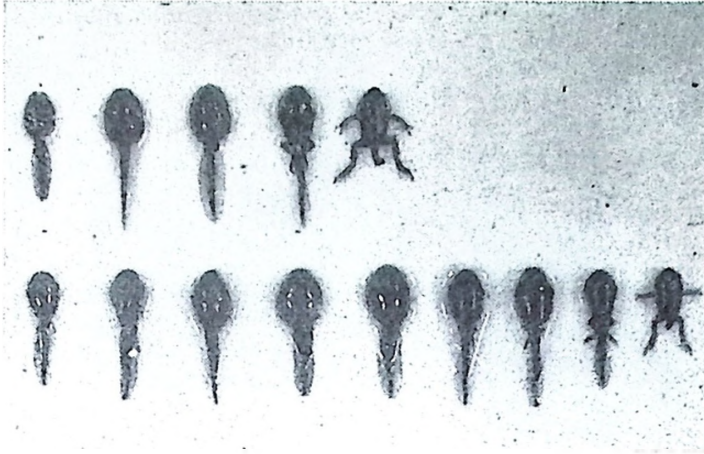
Prosečna težina punoglavaca IV grupe:

Datum	Ogledni	Kontrolni	Primedba
22. V. 1953	0,07	0,07	
29. V.	0,09	0,13	
5. VI.	0,10	0,14	
12. VI.	0,12	0,13	
19. VI.	0,11	0,15	Završena metamorfoza kontrolnih
26. VI.	0,10		
1. VII.	0,13		
6. VII.	0,10		
12. VII.	0,08		

B. Rezultati histo-embriološkog karaktera

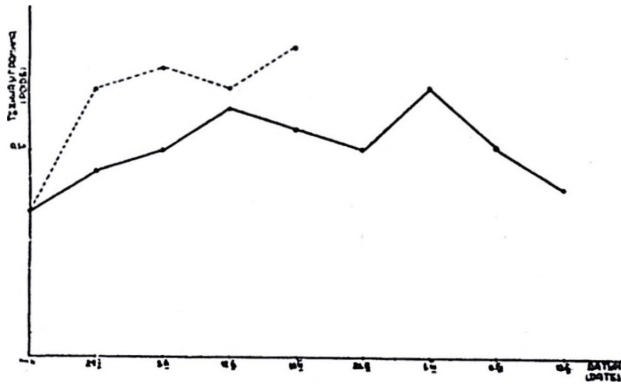
Na osnovu dosadanih rezultata, jasno se ističe izraziti antimorfofenetski efekat berilijevog nitrata, u upotrebljenim koncentracijama, kod punoglavaca I i II grupe, kao i usporavajući efekat na rast i metamorfozu kod III i IV grupe. U želji da pobliže uđemo u mehanizam ovog dejstva, s' naročitim obzirom na faktore koji sudeluju u determinizmu morfogeneze, izvršili smo komparativnu analizu serijski sečenih preparata uzetih primeraka oglednih i kontrolnih punoglavaca.

1. Hipofiza. — Kod oglednih punoglavaca I i II grupe, žlezdani parenhim adenohipofize je reduciran na ovalnu skupinu ćelija, međusobno jednakih, ali mnogo gušće zbijenih no kod kontrolnih punoglavaca. Celokupno žlezdano telo je oko pet puta manje od žlezdanog tela kontrolnih punoglavaca. Dok se ćelije adenohipofize kontrolnih punoglavaca već tinktorijalno mogu diferencirati na hromofobni i hromobilni tip ćelija, kod oglednih ta diferencijacija se ne izražava, budući da se ćelije nalaze u primitivnom embrionalnom stanju. Odnos zapremine jedra prema citoplazmi u njima ide u korist jedra. Hromatinska masa je obilatija u ćelijama kontrolnih grupa. Dok je vaskularizacija kontrolnih adenohipofiza veoma razgranata, kod oglednih je ona tako-reći reducirana na nekoliko uskih kapilara.



Sl. 4. Punoglavci IV. grupe. Gornji red kontrolni, donji red ogledni. Datum: 22. V., 29. V., 5. VI., 12. VI., 19. VI., 26. VI., 1. VII., 6. VII., 12. VII. Uspoređni rast i metamorfoza oglednih punoglavaca.

Fig. 4. Têtards du IV. groupe. En haut témoins, en bas traités. Date: 22. V. 229. V., 5. VI., 12. VI., 19. VI., 26. VI., 1. VII., 6. VII., 12. VII. Croissance et métamorphose retardées de têtards traités.



Grafikon br. 4. Punoglavci IV. grupe — kontrolni, ogledni. Krivulja težine oglednih je ispod krivulje kontrolnih.

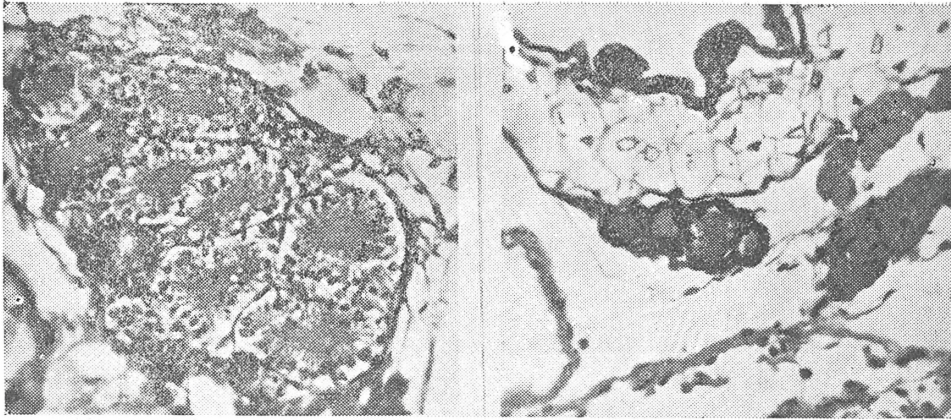
Graphique 4. Têtards du IV. groupe. — traités, témoins.

Kod oglednih punoglavaca III i IV grupe, prednji režanj hipofize, za polovinu manjih dimenzija od kontrolnih, izgrađuju ćelije raspoređene u mrežasto isprepletene putanje, nejednake među sobom, sa različitim tinktorijalnim osobinama, analogno onome što smo naveli kod kontrolnih punoglavaca I i II grupe. Jedra su ovalnog oblika, manja od kontrolnih i gušćeg hromatina. Dok kod oglednih punoglavaca I i II grupe u prednjem režnju hipofize nismo našli ćelične deobne figure, kod ovih dveju grupa one se sreću, istina u manjem broju no kod kontrolnih. Kapilari su dosta spljošteni, ali ih ima više no kod punoglavaca prvih dveju grupa. Hromatofore, razbacane po žlezdanom parenhimu, su u skupljenom stanju kod svih oglednih grupa, za razliku od kontrolnih, gde su zrnca melanina razasuta u proširenim produžecima, pa čak i van njih između žlezdanih ćelija.

2. Štitasta žlezda. — Izvanredno je upadljiva razlika u veličini i strukturi štitaste žlezde oglednih i kontrolnih punoglavaca I i II grupe. Čitavo žlezdano telo oglednih punoglavaca žrtvovanih nakon dve sedmice, ima zapreminu jednog od većih meškova iz sastava štitaste žlezde kontrolnih punoglavaca (Sl. 5). Dok su dosta brojni loptasti meškovi kontrolnih punoglavaca gusto zbijeni u jednu ovoidnu masu, štitasta žlezda oglednih punoglavaca je u to doba sasvim svedena na nekoliko sićušnih folikula. Dok je epitel kontrolnih visok, prizmatičan, zasejan često u apikalnom polu pigmentnim granulacijama, sferično uobličениh jedara, bogatih hromatinom, sa znacima deobnih figura, kod oglednih punoglavaca spomenutih grupa, on je sasvim spljošten, čak endoteliforman, sa sićušnim i razobličениm jedrima, bez ikakvih tragova ćelične deobe. Koloid je podjednako obojen, kondenzovan, dok je u kontrolnim folikulima njegova periferija optočena šupljikavim rezorpcionim vakuolama. Nasuprot bogatoj vaskularizaciji kontrolnih štitastih žlezda, stoji atrofično i vrlo slabo prožeto kapilarima žlezdano telo oglednih punoglavaca.

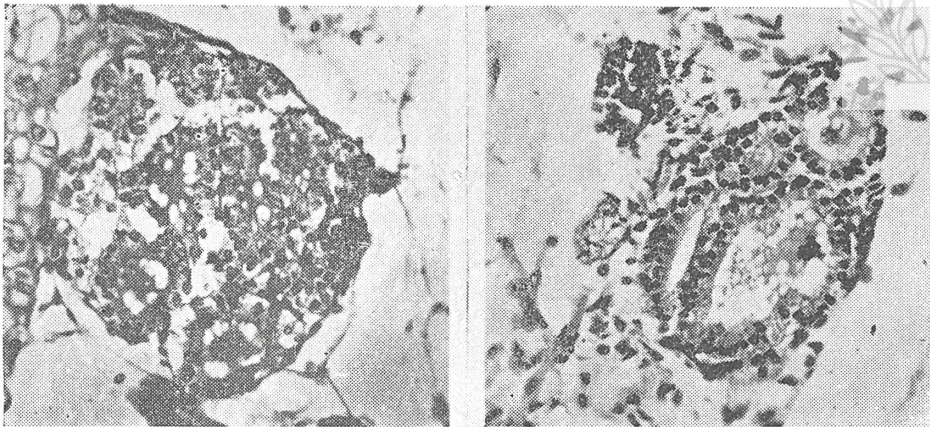
Štitasta žlezda punoglavaca III i IV grupe pokazuje blažije promene, kako u odnosu na zapreminu tako i na samu žlezdanu građu. Skoro za polovinu manjih dimenzija od kontrolnih ona je izgrađena od meškova koji su međusobno različiti no kod kontrolnih grupa. Epitel meškova je nešto niži, ravnije površine, i mnogo manje prožet pigmentnim granulacijama u apikalnom polu tireocita no kod kontrolnih grupa. Jedra su manjih dimenzija, pretežno ovalnog oblika, tamnije obojena i smeštena u bazalnom polu ćelija (Sl. 6). Učestani su znaci direktne ćelične deobe. Granica između tireocita je nejasna, koloid je dosta razređen, šupljikavo uobličен, i nema ga u svim meškovima. Razbacane hromatofore su u suženom stanju, kapilari uži od kontrolnih grupa.

3. Nadbubrežno žlezdano tkivo. — Na osnovu serijski izrađenih preparata, kortikalno nadbubrežno žlezdano tkivo oglednih i kontrolnih punoglavaca potiče od jednog blastema, smeštenog duž ventralne strane samog mezonefrosa, analogno onome što



Sl. 5. Glandula thyreoidea. Punoglavci II. grupe, stari 54 dana. Levo: kontrolni, desno: ogledni; dve sedmice pod uticajem beriliuma. Atrofija štitaste šlezde oglednih punoglavaca (oc. 10, obj. 45).

Fig. 5. Thyroïde. Têtards du II. groupe, âgés de 54 jours. A gauche témoin, à droite traité; deux semaines d' influence béryllique. Atrophie de glande thyroïde du têtard traité (oc. 10, obj. 45).



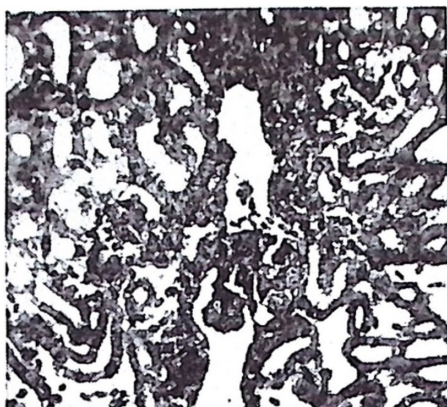
Sl. 6. Glandula thyraoidea. Punoglavci IV. grupe, žrtvovani u istom stadiumu razvoja (stadium 13 po D e l s o l - u). Levo: kontrolni, desno: ogledni; mesec dana pod uticajem beriliuma. Niži epitel i polimorfizam jedara kod uglednog punoglavca (oc. 10, obj. 45).

Fig. 6. Thyroïde. Têtards du IV. groupe, sacrifiés au même stade de métamorphose (stade 13 selon D e l s o l). A gauche: témoin, à droite: traité; un mois d' influence béryllique. Epithélium plus bas et polymorphisme nucléaire chez le têtard traité (oc. 10, obj. 45).

je ustanovio *Segal* (19). Na poprečnim preseccima može se rekonstruisati histogeneza nadbubrežnog tkiva, kortikalne vrste, na račun spomenutih blastemskih ćelija, koje se kod oglednih punoglavaca, žrtvovanih pri kraju druge sedmice, ne raspoređuju u mrežasto tkanje, izgrađeno od ćelije gusto zbijenih u isprepletenim snopovima, već ostaju sakupljene u vidu dveju zadebljanih pantljika, smeštenih između descendentne aorte i donje šuplje vene (Sl. 7). Nejasnih međusobnih ćeličnih granica, i sa nejednakim jedrima, ove blastemske mase pretstavljaju embrionalno tkivo zaostalo u svome razvoju kod punoglavaca I i II grupe. Kod oglednih punoglavaca III grupe njihov razvoj se odigrava analogno razvoju kod kontrolnih grupa: blastemske ćelije, formirane duž mezonefrosa sa pridošlim simpatoblastima, gradeći mrežasto žlezdano nadbubrežno tkivo u kome su isprepleteni nabrojani elementi dvojakog porekla. Embriogeneza i histogeneza nadbubrežnog tkiva kod oglednih punoglavaca IV grupe, odigrava se identično kao i kod kontrolnih, ali je postranstvo tkiva manje i njegova morfogeneza usporenija.

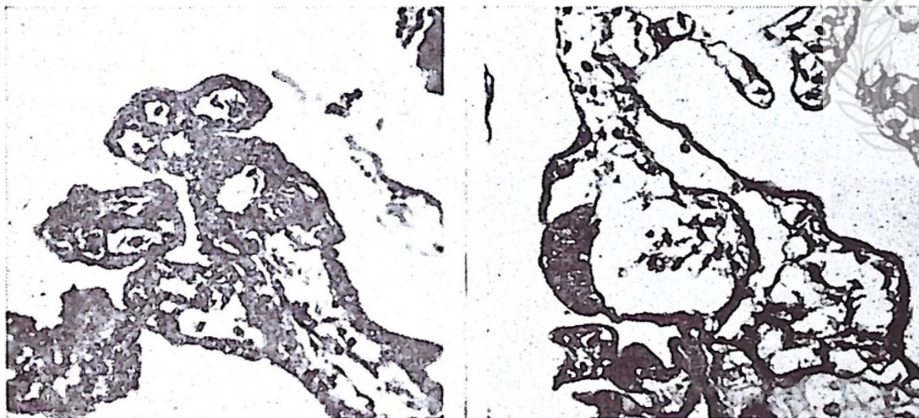
4. *Građa škruga*. — Morfološki odraz škruga oglednih punoglavaca na dejstvo berilijevog nitrata je karakteristično i znatno odudara od normalne građe kontrolnih punoglavaca. Skržne rojce su šire i deblje, pokrivene trostruko debljim epitelom od kontrolnog. Ćelije skržnog pokrova su manje-više podjednake, visoke, za razliku od spljoštenog epitela kontrolnih, sa globuloznim i znatno većim jedrom u središtu ćeličnog tela, bogatog sitnozrnastim ili grumuljičasto uobličenim hromatinom. Naročito je upadljivo prisustvo mitotičnih deobnih figura. Ispod epitela se nalaze dosta brojne ćelije, po svojoj morfologiji identične histocitima, koje se skupljaju u manje skupine, poput čvorića, ili su pak razbacane u osnovnoj škržnih rojci, koja je sluzavo-vezivne prirode, manje zastupljena no kod kontrolnih punoglavaca (Sl. 8). Kapilari su znatno širi od kontrolnih, razgranati i obloženi endotelijalnim ćelijama većim od kontrolnih, sa jedrima koja strče u zjap kapilara.

5. *Jetra*. — Bez orijentacije prema krvnim sudovima, gredice jetrinog parenhima punoglavaca, isprepletene u mrežasto tkanje, znatno odudaraju svojom strukturom kod oglednih i kontrolnih punoglavaca. Naime, kod prvih su sužene, često isprekidane, izgrađene od parenhimatozno degenerisanih hepatocita, nejasno omeđenih, pretežno izobličenih i manjih jedara od kontrolnih. Na pojedinim mestima nalaze se nekrotična žarišta većeg područja gredica. Ovako izmenjena parenhimna struktura se upadljivo razlikuje od znatno gušćeg i zbijenog mrežastog tkanja u jetri kontrolnih punoglavaca (Sl. 9), koja se odlikuje u doba punog varenja, prisustvom većih ili manjih šupljikavih prostora u citoplazmi, vidljivih na preparatima rađenim navedenom tehnikom, koji bi u stvari odgovarali ležištima glikogenih paraplazmatičnih tvorevina. slično opisima koje daju *Prenant*, *Bouin* i *Maillard* (18). Dok se u hepatocitima kontrolnih punoglavaca nalaze odrazi mitotične ćelične deobe, sa tu i tamo pojedinačno uklještenim ćelijama



Sl. 7. Nadbubrežno žlezdano tkivo. Ogledni punoglavac II. grupe, star 54 dana.
Zbijene blastemske ćelije duž mezonefrosa.

Fig. 7. Tissu glandulaire surrénal. Têtard traité du II. groupe, âgé de 54 jours.
Les cellules blastémiques sont serrées le long du mésonéphros.



Sl. 8. Skršne rojke. Punoglavci I. grupe, stari 54 dana. Levo: kontrolni, desno: ogledni; dve sedmice pod uticajem beriliuma. Grananje i proširenje oglednih rojki. Pokrovni epitel je deblji kod oglednog (oc. 10, obj. 45).

Fig. 8. Franges branchiales. Têtard du I. groupe, âgés de 54 jours, A gauche: témoin, à droite: traité; deux semaines d' influence béryllique. Ramification et dilatation des franges branchiales et épaississement épithélial chez le têtard traité (oc. 10, obj. 45).

tamnog tipa, u širokim i često udvostručenim gredicama, kod oglednih punoglavaca I i II grupe nismo naišli na prisustvo deobnih figura. Međutim kod njih je upadljiva proširenost kapilara, mestimično preplavljenih krvnim uobličanim elementima. Od posebnog su interesa promene u zidu kapilara. Endotelijalne ćelije oglednih grupa su veće od kontrolnih, voluminoznijeg jedra, znatno bogatijeg hromatinom i opasanog širokim pojasom razgranate citoplazme. Broj ovih ćelija takođe je veći kod oglednih grupa, i pored toga što strče u zjap kapilara, ima ih odljubljenih, slobodnih u lumenu, u kome se takođe mogu naći i ostaci degenerisanih hepatocita.

Kod oglednih punoglavaca IV grupe, gredice nisu sužene i degenerisani hepatociti se sreću u mnogo manjem broju i to samo pojedinačno, dok polimorfizam jedara, siromašnijih hromatinom od kontrolnih, dominira u svim presecima. Sreću se znaci direktne ćelične deobe. Kupferove ćelije takođe reaguju svojom hipertrofijom i hiperplazijom.

Hromatofore su podjednako u maksimalno skupljenom stanju kod svih oglednih grupa, znatno većih dimenzija od kontrolnih.

6. Mezenhimi. — Vršeći komparativnu analizu morfologije mezenhima iz subektodermalnog područja, stiče se utisak da su mezenhimatozne ćelije oglednih punoglavaca razređenije, duguljastih jedara, kraćih i zdepastih protoplazmatičnih produžetaka, koji, nejasno ograničeni, grade u međuprostorima mnogo tamnije niti od kontrolnih. Jedra su im nejednako bogata hromatinom (Sl. 10).

7. Razvoj ekstremiteta. — Poznato je da su žarišta za razvoj ekstremiteta prvobitno izgrađena od poluloptastih pupoljaka, sazdanih od velikog broja gusto zbijenih mezenhimatoznih ćelija. Posmatrajući paralelno razvoj blastema za zadnje ekstremitete kod prvih dveju oglednih i kontrolnih grupa, već u 14-om danu trajanja oglada zapaža se blokada mezenhimatoznog tkiva kod oglednih grupa. Naime, u to doba, dok se kod kontrolnih punoglavaca nalaze učestana ćelična razmnožavanja mitotičnim putem, sa uvlačenjem razgranatih krvnih kapilara, uz pojavu mehurasto uobličanih i sve većih hondrocita, kod oglednih punoglavaca blastem je izgrađen od jednog centralnog razređenog polja i periferne zone koju sačinjavaju gusto zbijene mezenhimatozne ćelije, nejednakih jedara, bez vidljive međusobne granice, dok su jedra ćelija iz centralnog polja manja, gušćeg hromatina i pretežno piknotična. Međućelična granica im je međutim vidljiva. Dok se kod kontrolnih već u to doba jasno diferenciraju i nizovi osteoblasta, poređanih po obodu, a van njih u neposrednoj blizini i brojni mioblasti, kod oglednih grupa proces morfogeneze ekstremiteta je blokiran u fazi formiranja hialine rskavice i mobilizacije osteoblasta (Sl. 11).

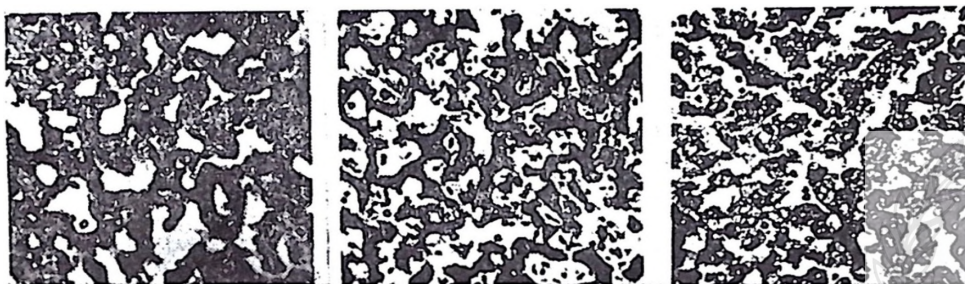
C. Rezultati fiziko-hemijskog karaktera

Na osnovu priloženih grafikona jasno se vidi da otapanjem berilijevog nitrata dolazi do promene vrednosti pH upotrebijene vode. Pri tome treba istaći da je pH vrednost vode kontrolnih i

oglednih punoglavaca bila približno ista i uvek u zavisnost od pH vrednosti vodovodne vode, kako kod onih iz I i II grupe, tako i onih iz IV grupe.

Pri pripremanju rastvora $0,13:1000 \frac{M}{(1000)}$ berilijevog nitrata, primećeno je da rastvor opalescira, a nakon kraćeg vremena se izlučuje beli voluminozni talog. Kod rastvora $0,013:1000 \frac{M}{(10.000)}$, ovog taloga je bilo znatno manje. Da bismo mogli ustanoviti koja komponenta deluje na punoglavce, ispitali smo hemijski sastav rastvora i taloga.

Berilijev nitrat, beli higroskopni prašak, je topiv u destilovanoj i vodovodnoj vodi. Pri njegovom otapanju u destilovanoj vodi otopina ostaje bistra iako i tu dolazi do djelomične hidrolize. Dok



Sl. 9. Jetra. S leva na desno: kontrolni punoglavac, punoglavac II. grupe, punoglavac IV. grupe. Atrofija i parenhimatozna degeneracija gredica kod srednjeg, vakuolizacija i delimično suženje gredica kod poslednjeg punoglavca (oc. 10, obj. umerzija 100).

Fig. 9. Foie. De gauche à droite: têtard témoin, têtard du II. groupe, têtard du IV. groupe. Atrophie et dégénérescence parenchymateuse des travées hépatiques chez le têtard moyen, vacuolisation et retrecissement relatif de travées chez le dernier têtard (oc. 10, obj. immersion 100).

pri otapanju u vodovodnoj vodi radi prisutnosti karbonata, odnosno hidrokarbonata i hidrolize, dolazi do stvaranja taloga berilijevog bazičnog karbonata. Pri analizi taloga služili smo se sledećim dokaznim postupcima:

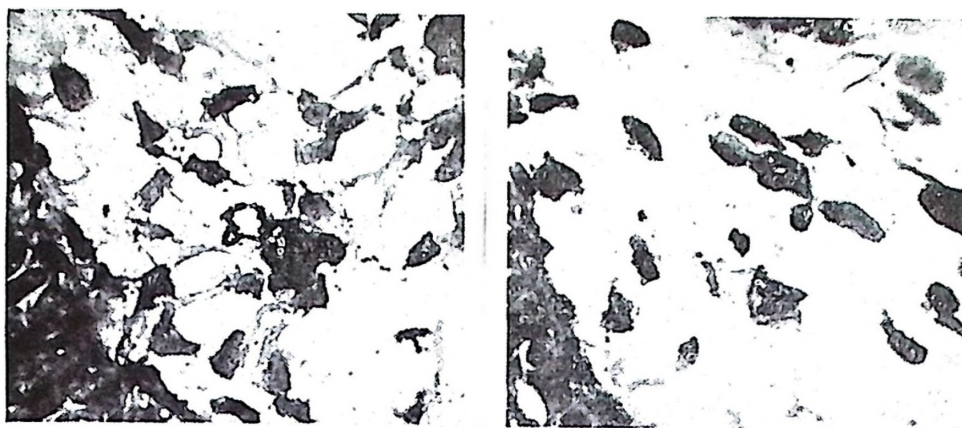
a. Dodavanjem sone kiseline razvijao se gas koji smo uveli u baritnu vodu, a zamućenjem ove ustanovili smo da je razvijeni gas ugljen dioksid.

b. Talog je topiv u višku amonijevog karbonata.

c. Kuhanjem vodene suspenzije došlo je do izdvajanja berilijevog hidroksida.

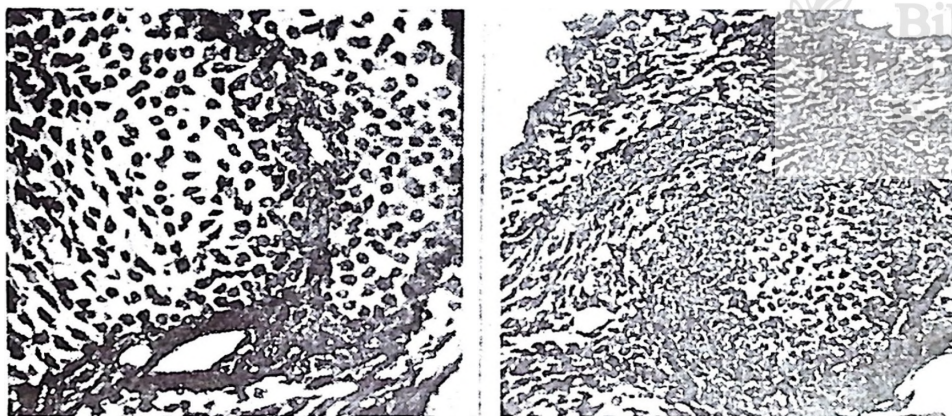
d. Talog nije davao reakciju na nitrate.

Za izvođenje svih navedenih proba koristili smo se literaturom citiranom pod br. 7, 11, 21, 22.



Sl. 10. Mezenhimatozno tkivo. Punoglavci I. grupe. Levo: kontrolni, desno: ogledni.

Fig. 10. Tissu mésenchymateux. Têtard du I. groupe. A gauche le témoin, à droite le traité.



Sl. 11. Izdanak zadnjeg ekstremiteta. Punoglavci II. grupe, stari 50 dana. Levo: kontrolni, desno: ogledni; 16 dana pod uticajem beriliuma. Zakržljao pupoljak oglednog, izgrađen od mezenhimatoznih ćelija, gusto zbijenih po obodu, dok se kod kontrolnog pored hialine rskavice vidi red osteoblasta (oc. 10, obj. 45).

Fig. 11. Bourgeon du membre inférieur. Têtards du II. groupe, âges de 50 jours. À gauche: témoin, à droite: traité: 16 jours d'influence béryllique. Bourgeon atrophié du têtard traité, formé par des cellules mésenchymateuses, serrées à la périphérie, tandis que chez le têtard témoin à côté de cellules du cartilage hyalin on voit une rangée d'ostéoblastes (oc. 10, obj. 45).

Ispitivanjem filtrata dokazano je prisustvo berilijum jona (Gmelins, 11; Tredwell, 22). Prema tome sredina u kojoj su živali ogleđni punoglavci sadržavala je berilijum-bazičnog karbonata u vidu taloga i berilijum jona.

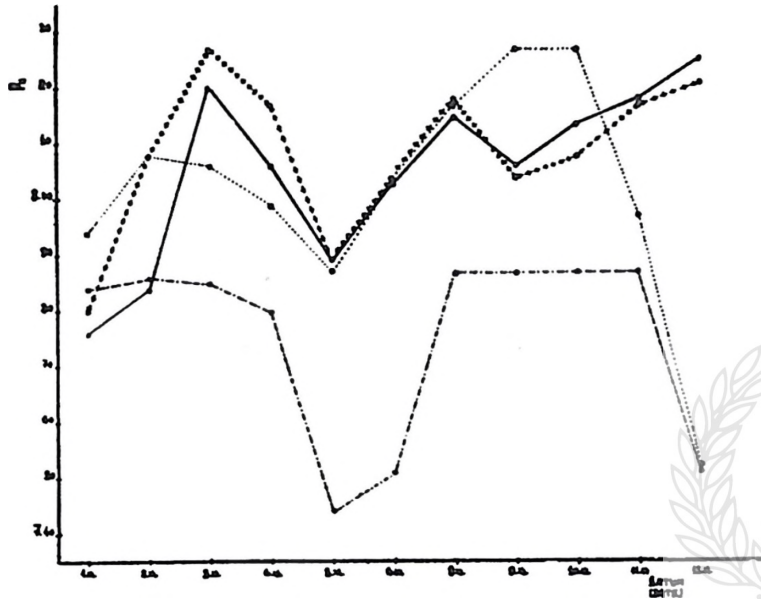
Da bismo dokazali prisustvo berilijuma u samim punoglavcima, izvršena je laboratorijska analiza anorganskog ostatka ogleđnih punoglavaca na berilijum, klasičnim metodama, kao i kvalitativna spektralna analiza. Prva analiza, rađena u Institutu za hemiju, dala je pozitivan rezultat na berilijum. Druga, to jest spektralna analiza, izvršena je univerzalnim spektrografom tvornice Zeiss, sa kvarcovom prizmom i optikom, u Institutu za sudsku medicinu i kriminalistiku Medicinskog Fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (zahvaljujemo se Dr. K. Weber-u na učinjenoj usluzi). I ova analiza je dala jasno pozitivan rezultat na berilijum (Sl. br. 12).

Obe vrste spomenutih analiza, izvršene na anorganskom ostatku punoglavaca koji su prethodno bili podvrgnuti uticaju berilijuma u toku 20 dana, a potom 10 dana držani u običnoj vodovodnoj vodi, koja je svakodnevno menjana, pokazale su negativan rezultat na berilijum.

III. Razmatranje dobivenih rezultata

Ogledi na punoglavcima I i II grupe pokazuju inhibitorno dejstvo berilijuma na rast i metamorfozu. Međutim ista koncentracija usporava rast i metamorfozu punoglavaca III grupe, slično efektu deset puta blažije koncentracije kod punoglavaca IV grupe. Ako pri tome imamo u vidu da su u početku ogleđni punoglavci I grupe bili stari 30 dana, to jest bez znakova metamorfoze, kao i punoglavci IV grupe, dok su oni iz II grupe bili u početnom stadijumu razvoja zadnjih ekstremiteta, a iz III grupe već u odmaklijem stadijumu razvoja istih; da efekti istih koncentracija nisu istovetni na starije i mlađe oblike; da jača koncentracija na starijim punoglavcima, to jest u stadijumu već izrazite metamorfoze, ima isto dejstvo kao i slabija koncentracija na mlađe oblike, — s' pravom se može konstatovati da dejstvo berilijuma ne zavisi samo od njegove koncentracije već i starosti punoglavaca. To je potpuno razumljivo ako imamo na umu da je reaktivnost tkiva u ontogenezi promenljiva zbog njegove stalne kvalitativne promene u toku razvoja. Jedino tom izmenjenom reaktivnošću organizma, priskočno vezanom za stadijumu njegovog razvoja, možemo protumačiti što ista koncentracija berilijevog nitrata, toksična za jednu grupu punoglavaca, ima samo depresivni karakter, baš kao i znatno slabija koncentracija na mnogo mlađe stadijume u toku njihovog razvoja. Imajući u vidu da u procesu morfogeneze imaju udela neuroendokrini faktori, to jest somatotropni hormon, hormon tireoidne žlezde i diencefalon (Ivanova, 13; Milin, 14), samo po sebi se nameće pitanje njihovog učesća u determinizmu berilijevog efekta na punoglavce: Zastoj u rastu i stalna regresija u težini ogleđnih punoglavaca prvih dveju grupa, ide u prilog inhibicije somato-

tropne funkcije prednjeg režnja hipofize, što potvrđuje i histološka građa adenohipofize opisanih grupa, baš kao što usporavanje rasta kod drugih dveju grupa (III i IV) govori u prilog depresivnog dejstva berilijuma na hormon rasta. Paralelno tome, kod punoglavaca I i II grupe postoji inhibicija i ostalih somatotropnih hormona, odnosno tireotropne i adrenotropne funkcije, jer su tireoidna žlezda i nadbubrežno žlezdano tkivo, kao što smo videli, blokirani u svome razvoju. Međutim to nije slučaj kod punoglavaca III grupe,

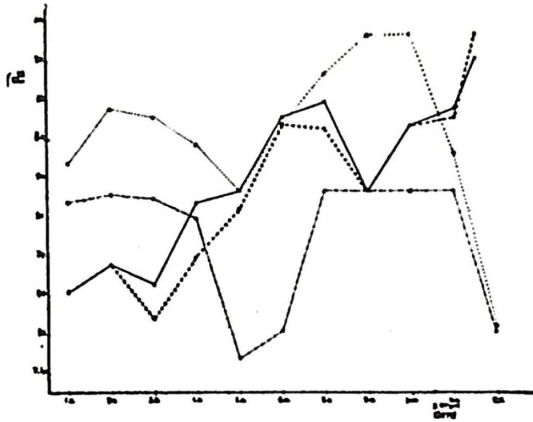


Grafikon br. 5. Vrednosti pH, punoglavci I. grupe. ——— Voda oglednih punoglavaca posle jednodnevnog boravka punoglavaca u njoj. + + + + + Voda kontrolnih punoglavaca posle jednodnevnog boravka punoglavaca u njoj. Sveža voda iz vodovoda. —.—.— Sveža voda iz vodovoda
kojoj je dodato 10^{-10} M berilijevog nitrata.

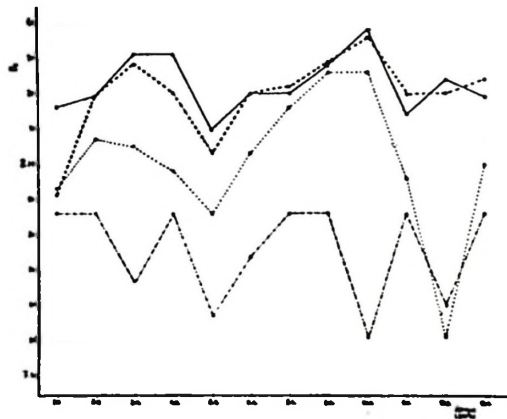
Graphique 5. Valeurs du pH, têtards du I. groupe. ——— Eau après un jour de séjour de têtards traités. + + + + + Eau après un jour de séjour de têtards témoins. Eau fraîche. —.—.— Eau fraîche
contenant le 10^{-10} M de nitrate de béryllium.

kod kojih je efekat berilijuma počeo da se izražava na organizam u kome je tireoidna žlezda bila već u svojoj punoj aktivnosti, u svojstvu determinatora metamorfoze. U tom stadiumu dakle, pored određene korelacije somatotropne i tireotropne funkcije prednjeg režnja hipofize, s' jedne strane, i lučenja tiroksina, uz regulisanje reaktivnosti tkiva na njegovo dejstvo sa strane diencefalona, s' druge strane, dejstvo berilijuma se svodi ne na inhibiciju i blokadu, već samo na relativnu depresiju svih navedenih funkcija, što se

sve izražava u usporavanju kako proliferativne, tako i rezorpcione faze u morfogenezi punoglavaca. Histološke promene u hipofizi i štitastoj žlezdi oglednih punoglavaca IV grupe, takođe potvrđuju depresivni karakter berilijskog efekta, identično promenama kod prethodne grupe. Iz svega toga neminovno proističe dokaz zavisnosti berilijskog efekta od njegove koncentracije i morfogenetskih



Grafikon br. 6. Punoglavci II. grupe. Legenda ista kao na grafikonu br. 5.
 Graphique 6. Têtards du II. groupe. Mêmes légendes que sur graphique 5.



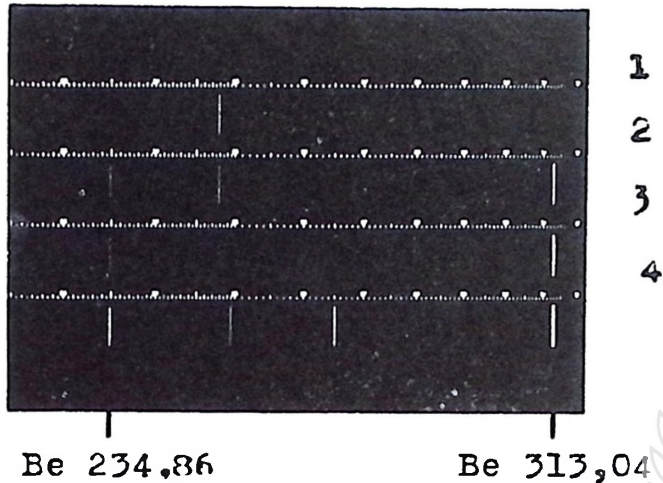
Grafikon br. 7. Punoglavci IV. grupe. Legenda ista kao na grafikonu br. 5.
 Graphique 7. Têtards du IV. groupe. Mêmes légendes que sur graphique 5.

faktora, među kojima posebno mesto pripada štitastoj žlezdi. Naime, poznat je afinitet diencefalona prema tiroksinu, kako u toku embriogeneze sisara, tako i vodo-zemaca (Tusques, 24), kao što je poznato da je tireotropna funkcija prednjeg režnja hipofize podređena uticaju hipotalamusa nervnim i humoralnim pu-



tem (Greer, 9, 10). Hormon štitaste žlezde bi prema tome bio jedan od faktora koji bi uticao na izmjenjenu reaktivnost punoglavaca III grupe, paralelno sa sinergetskim udelom somatotropnog hormona, a posretstvom diencefalo-hipofizarnog kompleksa.

Reverzibilnost promena, izazvanih u toku oglada na prvim dvema grupama punoglavaca, potvrđuje da retencija berilijevih jona nije dugotrajna i da njihovo inhibitorno dejstvo iščezava u toku prve sedmice po prestanku oglada, što dokazuju i navedene analize anorganskog ostatka punoglavaca koji su bili prethodno



Sl. 23. Spektralni snimak anorganskog ostatka punoglavaca koji su boravili u rastvoru $\frac{M}{1000}$ berilijevog nitrata, u toku od 20 dana. Jasno se vide karakteristične spektralne linije berilijuma na talasima 234,86 i 313,04 milimikrona (spektar 2 i 3). Spektar 1: snimak spektralno čistog ugljena. Spektar 4: snimak berilijevog nitrata upotrebljenog za ogled (linije su pojačane).

Fig. 12. Prise spectrales du résidu anorganique de têtards soumis à l' influence d' une solution $\frac{M}{1000}$ de nitrate de béryllium (20jours). On voit clairement les lignes spectrales caractéristiques du béryllium-ondes 234,86 et 313,04 millimicrons (spectre 2 et 3). Spectre 1: prise spectrale de charbon pur. Spectre 4: prise spectrale de nitrate de béryllium, utilisé en expérience (les lignes sont renforcées).

tretirani berilijevim nitratom i potom držani u običnoj vodi. Pored smrtnosti, koja se javlja u podjednakom procentu kod obeju grupa i po prestanku primene berilijuma, pretežni broj punoglavaca doživljuje kompletnu metamorfozu. Povoljni efekat primene adrenokortikotropnog hormona kod spomenutih podgrupa, u smislu povećanja težine i ubrzanja metamorfoze, potvrđuje udeo endokrinih faktora u determinizmu pojačane otpornosti organizma na agresivne faktore, u ovom slučaju adreno-kortikotropnog hormona protiv jednog hemijskog agresora, to jest berilijuma, pri čemu sva-

kako dolazi do izražaja zavisnosti hormonalnog dejstva i od fiziko-hemijskih uslova sredine (Sluczewski et Roth, 20).

Promene u strukturi jetre oglednih punoglavaca govore da se toksično dejstvo berilijum jona odigrava humoralnim putem: nekrotična žarišta u jetri punoglavaca I i II grupe identična su promenama za koje spominje Policard (15) da se odigravaju nakon intravenozne eksperimentalne aplikacije rastvorljivih berilijevih soli. Morfološki odgovor retikulo-endotelijalnih ćelija iz zida jetrinih kapilara, u smislu hipertrofije i hiperplazije, svedoči o njihovom aktivnom udelu u mehanizmu berilijske intoksikacije. Baš ta proliferativna moć retikulo-endotelijalnih ćelija pretstavlja jednu od bitnih odlika u biološkoj istoriji berilijuma.

Izmenjena struktura skržnih rojti, mesta koja pored digestivnog trakta pretstavljaju najelektivnija ulazna vrata za berilijum, pretstavlja specijlni vid prilagođavanja respiratornog epitela, dck gomilanje histiocitiformnih elemenata u stromi rojti, potseća na minijaturne granulomatozne čvoriće, koji se nalaze kod eksperimentalnih berilijumskih granulomatoza (Policard, 16, 17). Ovaj nalaz takođe potvrđuje proliferativno dejstvo berilijuma na histiocite.

Od posebnog interesa su reaktivne promene u mezenhimatoznom tkivu i blastemskim žarištima ekstremiteta. Naime, regresivne promene u mezenhimatoznom tkivu ispod spoljašnjeg, etkodermalnog omotača oglednih punoglavaca, u suprotnosti su sa evolutivno-proliferacionim promenama već diferenciranih endotelijalnih ćelija jetrinih kapilara i histiocita u šrkama. To potvrđuje da se proliferativno dejstvo berilijuma na elemente mezenhimatoznog porekla odigrava direktnim putem, to jest uz neposredno prisustvo berilijum jona (Policard 15). Isto tako i opisane promene u blastemskom području ekstremiteta, potvrđuju inhibiciju diferencijacije hialine rskavice i proliferaciju osteoblasta, što je svakako posledica somatotropne insuficiencije adenohipofize koja stimuliše hondrogenezu i osteogenezu, uporedo sa sinergetskim dejstvom na hondrogenezu sa strane tireoidne žlezde (C r o o k e, 4).

Imajući u vidu rezultate hemijske analize, očevidno je da su punoglavci bili podvrgnuti uticaju slobodnih berilijevih jona s' jedne strane i uticaju bazičnog berilijum karbonata s' druge strane. Ovi zadnji mogli su dospeti putem digestivnog trakta (punoglavci su pored komadića spanaća proždrali i pojedine čestice karbonata). Odista, vršeći morfološku analizu obojenih kristala navedenog karbonata, kao i crevnog sadržaja u preparatim punoglavaca, uverili smo se u postojanje karbonatnih čestica u lumenu creva. Međutim svakako da je primordijalno dejstvo slobodnih berilijevih jona, dok za sudbinu unetih kristala bazičnog karbonata ne možemo biti izvesni, budući da nismo bili u mogućnosti da odredimo pH vrednost crevnog sadržaja. Izvršena hemijska i spektralna analiza anorgan-skog ostatka oglednih punoglavaca potvrdile su prisustvo berilijuma. Iz priloženih grafikona o vrednosti pH vidi se da punoglavci svojim

metabolitima nisu uticali na promene pH vrednosti vode, pri čemu svakako treba imati na umu da je voda svakodnevno menjana.

Na osnovu svih do sada prodiskutovanih rezultata, mehanizam dejstva berilijuma na rast i metamorfozu punoglavaca, predstavlja jedan složen proces u čijem determinizmu pored koncentracije berilijuma imaju aktivnog udela faktori koji sudeluju u morfogenezi. Ogledi na punoglavcima se ne mogu uporediti sa ogledima na kulturi tkiva, jer dok, kod ove zadnje, ćelije izdvojene od matičnog organizma, predstavljaju jedino poprište berilijevog toksičnog efekta, u organizmu punoglavaca dejstvo berilijevih jona je usmereno, posredstvom humoralnih faktora, na tkiva koja se nalaze pod određenim korelativnim uslovima, s' obzirom na neuro-endokrini sistem, jer se dejstva hormona odigravaju na »jednom višem nivou no što je izolovana ćelija« (Barshi et Brion, 1). Samo tako možemo protumačiti inhibitorno dejstvo berilijuma na mezenhimatozne ćelije in vitro, a proliferativno-elektivni efekat in vivo, pogotovo ako pri tome imamo u vidu da ćelije in vivo, zahvaljujući zaštitnom dejstvu proteinske sredine prema toksičnom uticaju pojedinih metala, imaju veću moć prilagođavanja (Verne, 25).

IV. ZAKLJUČCI

1. U rastvoru $\frac{M}{1000}$ berilijum izaziva inhibiciju rasta i sprečava pojavu metamorfoze punoglavaca koji pre oglada nisu bili u stadiumu metamorfoze, izazivajući istovremeno postepeno involutivno-regresivne promene u njihovoj težini.

Kod punoglavaca izvrnutih uticaju iste koncentracije berilijuma u doba metamorfoze, rast i metamorfoza su usporeni.

2. U rastvoru $\frac{M}{10000}$ berilijum usporava rast i metamorfozu.

3. Pod uticajem berilijuma dolazi do inhibicije i regresije u histogenezi hipofize, štitaste žlezde i nadbubrežnog žlezdanog tkiva, do parenhimatozne degeneracije jetre i inhibicije u razvoju blastemskih područja za ekstremitete.

4. Dejstvo berilijuma na rast i metamorfozu je reverzibilnog karaktera.

5. Vrednost pH rastvora nije se bitno razlikovala kod oglednih i kontrolnih punoglavaca.

6. U determinizmu složenog mehanizma berilijevog dejstva na rast i metamorfozu, pored koncentracije berilijevih jona imaju udela neuro-endokrini faktori koji sudeluju u morfogenezi (diencefalo-hipofizarni kompleks, štitasta žlezda).

SUMMARY

Effect of Beryllium on Morphogenesis

R. Milin, J. Grujić and B. Bobarević

Considering the antimetabolic and antienzymatic characteristic of beryllium, the authors tested to investigate the effect of beryllium on the growth and metamorphosis of tadpoles. In the experiment there were used tadpoles of the kind *BUFO VULGARIS*, of different age, divided into groups, with equal number of both experimental and control tadpoles. The experiments were performed in the months of May and June 1953. by exposing the tadpoles to the effect of $\frac{M}{1000}$ and $\frac{M}{10\ 000}$ of beryllium nitrate solution, being changed every day. The aquariums, which were on a white base, were cleaned daily. Food was uniform: cooked spinach.

A. Results of morphologic-physiological character

1. Tadpoles I. group. — Experiment started V. 1. 1953; number of tadpoles: 60; age: 30 days; beryllium nitrate concentration: $\frac{M}{1000}$

The fifth day the experimental tadpoles are found to be smaller than the controls, eating less, moving lazier, this appearing more and more evident, so that after a month involutive-regressive changes concerning size and weight reach the maximum, without any signs of metamorphosis, which meanwhile comes to an end in the control tadpoles (fig. 1, graph. 1). An stopping the application of beryllium-nitrate, the growth proceeds and the metamorphosis appears. ACTH accelerate morphogenesis of the same tadpoles.

2. Tadpoles II group. — Experiment started: V. 16. 1953. number tadpoles: 60; age: 40 days (posterior extremities accentuated in the 7th stage after DELSOL); beryllium-nitrate concentration: $\frac{M}{1000}$

The results are identical with those of the preceding group (fig. 2, graph. 2).

3. Tadpoles III. group. — Beginning of the experiment: V. 21. 1953; number of tadpoles: 60; age: 58 days (posterior extremities are in the 10th stage after DELSOL); beryllium-nitrate concentration: $\frac{M}{1000}$

The tadpoles are mobile and eat like the controls, but growing slower, metamorphosing slower. Already developed frogs are smaller and lighter than the controls (fig. 3, graph. 3).

4 Tadpoles IV. group. — Beginning of experiment: V. 21. 1953; number of tadpoles: 60; age: 35 days; beryllium-salt concentration: $\frac{M}{10\ 000}$

Mobility and voracity well saved, growth and metamorphosis are happening considerably slower than in the controls. Experimental frogs smaller than the controls (fig. 4, graph. 4).

B. Results of histo-embryological character.

1. Hypophysis. — Groups of cells, building the hypophysis, remain in the embryonal stage in tadpoles of I and II group, till in the control tadpoles there may be differentiated chromophobe and chromophil cells, besides signs of evident vascularisation.

2. Thyroid gland. — Atrophy of thyroid gland, not quite surpassing the volume of one follicle of the experimental glandular parenchyma in tadpoles of group I and II, with endothelioidal epithelium (fig. 5). In tadpoles of group IV, thyroid gland shows nuclear polymorphism and lower epithelium than in the control (fig. 6).

3. Suprarenal glandular tissue. — The suprarenal blastema consists of cells, which remained in embryonal stage, serried in form of a ribbon against the mesonephros.

4. Branchial braids. — The extension and branching of the branchial braids, covered with higher and richer epithelium in cells; infiltration of histiocytic cells in the stroma (fig. 7, 8).

5. Liver. — Parenchymatous degeneration and necrosis of the trabeculas in the group I and II, vacuolisation in group IV (fig. 9); mobilisation of Kupffer's cells (signs of hyperplasia).

6. Mesenchyme. — Signs of hypoplasia (fig. 10).

7. Development of extremities. — Blocking in histogenesis of the buds of the extremities, reduced to tissue, made from densely congested mesenchymatous cells, without signs of chondrogenesis and osteogenesis, as in the controls (fig. 11).

C. Results of physicochemical character.

The medium wherein the tadpoles were living, included beryllium carbonate in form of sediment and beryllium-ions. Tadpole metabolites did not influence the change of value of pH center (graph. 5, 6, 7). In the inorganic rest of experimental tadpoles there has been established the presence of beryllium (spectral analysis, fig. 12). In those however which after 20-days of beryllium effect, were kept 10 days without treating, beryllium could not be found in their inorganic residue.

D. Contemplation of results obtained

In a discussion of the results obtained, the authors call attention to the variability of tissue reactivity in the ontogenesis, due to its constant qualitative change, which might account for the fact that the same concentration of beryllium acts differently upon younger and elder forms of tadpoles. At the same time the authors emphasize the changes in the endocrine system with particular regard to the inhibition of somatotropical and thyrotropical function

of the hypophyseal anterior lobe and effect of diencephalon in connection with the proliferating and resorptive phase of metamorphosis.

E. Conclusions

1. In a concentration of $\frac{M}{1000}$ beryllium has an inhibitory effect upon the growth and hinders the metamorphosis of tadpoles, which were not under metamorphosis before the beginning of the experiment. However in tadpoles, exposed to the effect of beryllium during metamorphosis, the growth and metamorphosis take place at a slower rate.

2. The concentration of beryllium $\frac{M}{10\ 000}$ inhibits the growth and metamorphosis.

3. The effect of beryllium on the growth and metamorphosis is of a reversible character.

4. The value of pH solution showed no essentially differences.

The specific effect of beryllium appears in the mobilisation of Kupffer's cells, invasion of branchial stroma by histiocytar elements and by hypoplasia of the mesenchyme.

6. The neuro-endocrine factors, dominating in the morphogenesis (hypothalamo-hypophyseal complex, glandula thyreoidea) actively participate in the determinism of beryllium's effect upon growth and metamorphosis.

R É S U M É

R. Miline, J. Grujić et B. Bobarević

ACTION DU BERYLLIUM SU LA MORPHOGENÈSE

Ayant en vue l' action antimitotique et antienzymatique du béryllium (Chèvremont et Firket, Klemperer et collaborateurs), les auteurs se sont proposé d' étudier l' influence de ce metal sur la croissance et métamorphose des têtards *Bufo vulgaris* de l' âge différent, répartis en lots comprenant un nombre égal d' animaux mis en expérience et d' animaux témoins. L' expérimentation fut exécutée au mois de mai et juin 1953; les têtards étaient soumis à l' influence d' une solution de nitrate de béryllium de $\frac{M}{1000}$ et $\frac{M}{10.000}$ quotidiennement changée. Le lavage des aquariums, posés sur fond blanc, était chaque jour. La nourriture était la même: épinards cuits.

A. Résultats morpho-physiologiques

1. Têtards du I groupe. — Commencement d' expérience: le 16 mai 1953; nombre de têtards: 60; âge: 30 jours; concentration: $\frac{M}{10.000}$

A partir de 5 jours les têtards sont plus petits que les témoins, mangent moins et leurs mouvements sont plus faibles. Au bout d'un mois les phénomènes regressifs, en ce qui concerne leur grandeur et poids, arrivent au maximum, sans aucun signe de métamorphose, qui cependant vint de se terminer chez les têtards témoins (Fig. 1, graphique 1). Après interruption d'influence béryllique, la croissance de têtards continue, suivie de métamorphose, mais en retard par rapport aux têtards témoins. L'ACTH accélère la morphogénèse de ces têtards.

2. Têtards du II groupeé — Expérience commencée le 16 juin 1953; nombre de têtards: 60; âge: 40 jours (les extrémités postérieures au stade 10 d'après Delsol). Concentration de béryllium-nitrate: $\frac{M}{1000}$

Les résultats sont indentiques a ceux du lot précédent (fig. é, graphique 2).

3. Têtards du III groupe. — Expérience commencée le 21 mai 1953; nombre de têtards: 60; âge: 58 jours (les extrémités postérieures au stade 10 d'après Delsol). Concentration de béryllium-nitrate: $\frac{M}{1000}$

Mouvements et appetit sont sans changement, la croissance et métamorphose ralenties. Les grenouillettes développées plus petites que les témoins (fig. 3, raphique 3).

4. Têtards du IV groupeé —Expérience commencée le 21 mai 1953; nombre de têtards: 60; âge: 35 jours; concentration béryllique: $\frac{M}{10.000}$

Mouvements et appetit sans changement, la croissance et métamorphose notablement ralenties. Les grenouilletter plus petites que les témoins (fig. 4, graphique 4).

B. Résultats histo-embryologiques

1. Hypophyse. — Amas cellulaires hypophysaires du I et II groupe reste en état embryonnaire, tandis que chez les têtards témoins apparait la différentiation de cellules chromophobes et chromophiles, accompagnée d'une vascularisation plus accentuée.

2. Glande thyroïde. — Atrophie de la thyroïde: le corps glandulaire entier d'un têtard du I et II groupe ne dépasse pas le volume d'un follicule moyen de la thyroïde du têtard témoin; épithélium folliculaire est endothélioïde. Chez les têtards du IV groupe on voit le polymorphisme nucléaire et un épithélium plus bas que chez les témoins (fig. 6).

3. Tissu glandulaire adrénal. - Le blasthème adrénal est formé de cellules restées en état embryonnaire, serrées sous forme d'un ruban situé le long du mésonéphros.

4. Les branchies. — Dilatation et ramification des franges branchiales recouvertes d'un épithélium plus haut et plus riche en cellules; infiltration du stroma par des cellules hystiocytaïres (fig. 7, 8).

5. Foie. — Dégénérescence parenchymateuse et nécrose de travées chez les têtards du I t. II groupe, vacuolisation chez ceux du IV groupe (fig. 9). Mobilisation de cellules de Kupffer (hyperplasie).

6. Mésenchyme. — Signes d'hypoplasie (fig. 10).

7. Développement des membres. — Blocade d'histogénèse du blastème des membres, formé uniquement de cellules mésenchymateuses, sans apparition de chondrogénèse et d'ostéogénèse (fig. 11).

C. Résultats physico-chimiques

Le milieu de têtards mis en expérience, contenait de béryllium carbonate basique, sous forme de dépôt, et d'ions bérylliques. Les métabolites de têtards n'avaient aucune influence sur le pH du milieu (graphique 5, 6, 7). Dans le résidu anorganique de têtards expérimentés, la présence du béryllium fut constatée par analyses chimique et spectrale (fig. 12), cependant avec le résultat négatif chez les têtards sacrifiés 10 jours après arrêt du traitement.

D. Considération des résultats obtenus

En discutant les résultats obtenus, les auteurs attirent l'attention sur la variation de réactivité tissulaire dans l'ontogénèse, par suite du changement qualitatif constant de tissus. C'est de cette façon que l'on pourrait expliquer l'action différente d'une même concentration de béryllium sur les formes jeunes et plus âgées de têtards. Les auteurs discutent en même temps les changements constatés au niveau du système endocrinien, relatifs à l'inhibition de fonctions somatotrope et thyrotrope hypophysaires, aussi bien que l'influence hypothalamique par rapport aux phases proliférative et résorptive de métamorphose.

E. Conclusions

1. Le béryllium (concentration $\frac{M}{1000}$) inhibe la croissance et empêche la métamorphose de têtards qui n'étaient pas au stade de celle-ci au commencement de l'expérience. La métamorphose et la croissance continuent cependant (avec un ralentissement) chez les têtards soumis aux influences bérylliques au cours de métamorphose.

2. Concentration de $\frac{M}{10000}$ détermine le retard de croissance et de métamorphose.

3. L'effet du béryllium sur la croissance et la métamorphose est réversible.

4. Le pH des solutions bérylliques ne présentait pas de grande différences.

5. L'action spécifique du béryllium: mobilisation de cellules de Kupffer, invasion du stroma branchial par des éléments histiocytaires et hypoplasie du mésenchyme.

6. Les facteurs neuro-endocriniens qui dominent dans la morphogénèse (complexe hypothalamo-hypophysaire, glande thyroïde), prennent une part active dans le déterminisme d'action béryllique sur la croissance et la métamorphose.

ZUSAMMENFASSUNG

Wirkung des Berylliums auf die Morphogenese

R. Milin, J. Grujić und B. Bobarević

Angesichts der Tatsache, dass das Beryllium antimitotische und antienzymatische Wirkung hat (Chèvremont und Firket, Klemperer und Mitarbeiter), haben die Autoren versucht, durch Experimente an Kaulquappen die Wirkung des Berylliums auf das Wachstum und die Metamorphose festzustellen. Für die Versuche wurden Kaulquappen der *Bufo vulgaris* verwandt, u. zw. verschiedener Altersstufen, aufgeteilt in Gruppen mit gleicher Anzahl von Versuchs- und von Kontrolltieren. Die Experimente wurden im Mai—Juni 1953 durchgeführt, indem man die Kaulquappen dem Einfluss von $\frac{M}{1000}$ und $\frac{M}{10.000}$ Berylliumnitratlösung aussetzte. Die Lösung wurde täglich ausgewechselt. Die Glasbehälter, Aquarien, wurden täglich gespült. Die Unterlage für die Behälter war weiss gefärbt. Die Ernährung war einheitlich (gekochter Spinat).

A. Morphologisch-physiologische Ergebnisse

1. Kaulquappen I. Gruppe. — Der Versuch begann am 16. Mai 1953. Anzahl der Kaulquappen: 60, Alter: 30 Tage. Konzentrierung des Berylliumnitrats: $\frac{M}{1000}$

Am fünften Tage sind die Versuchsquappen kleiner als die Kontrollquappen, essen schlechter, sind träge in der Bewegung. Die involutivregressiven Veränderung erreichen ihren Höhepunkt nach einem Monat, ohne dass Anzeichen für eine Metamorphose auftreten, welche aber bei Kontrolltieren schon vor dem Ende steht. (Bild 1, Graphikon 1). Am fünften Tage nach der Unterbrechung der Verabreichung von Beryllium nitratlösung setzen Wachstum und Metamorphose wieder ein. Die Anwendung von ACTH-Lösung beschleunigt die Morphogenese dieser Kaulquappen.

2. Kaulquappen II. Gruppe. — Der Versuch begann am 16. VI. 1953. Anzahl der Kaulquappen: 60, Alter 40 Tage (Die hinteren Extremitäten sind im 7. Stadium, nach Delsol ausgedrückt). Konzentrierung des Berylliumnitrats $\frac{M}{1000}$

Die Ergebnisse sind mit denjenigen der vorhergehenden Gruppe identisch (Bild 2, Graphikon 2).

täten im 10. Stadium nach Delsol). Konzentrierung: $\frac{M}{1000}$

Die Kaulquappen dieser Gruppe sind lebhafter in ihren Bewegung und essen wie die Kontrolltiere. Ihr Wachstum und ihre Metamorphose sind verlangsamt. Schon entwickelte Fröschen sind kleiner und leichter als die Kontrollfröschen (Bild 3, Graphikon 3).

4. Kaulquappen IV. Gruppe. — Der Versuch begann 21. V. 1953. Anzahl: 60, Alter: 35. Konzentrierung $\frac{M}{10.000}$.

Lebhaftigkeit der Bewegungen und Esslust, blieben erhalten, Wachstum und Metamorphose war langsamer als bei den Kontrolltieren. Die Versuchsfroschen waren kleiner als die Kontrollfröschen. (Bild 4, Graphikon 4).

B. Histo-embryologische Ergebnisse

1. Hypophyse. — Die Zellgruppen der Adenohypophyse bei den Kaulquappen der I. und II. Gruppe bleiben im embryonalen Stadium. Jedoch bei den Kontrolltieren kann man die chromophoben und chromophilen Zellen mit Anzeichen von verstärkter Vaskularisation unterscheiden.

2. Schilddrüse. — Bei den Kaulquappen der I. und II. Gruppe ist die Schilddrüse atrophisch, wobei sie in ihrer Gesamtheit das Volumen einer Follikel der Schilddrüse bei den Kontrolltieren nicht überschreitet (Bild 5). Bei den Kaulquappen der IV. Gruppe zeigt sich an der Schilddrüse nuklearer Polymorphismus und niedrigeres Epithelium als bei den Kontrollquappen (Bild 6).

3. Nebennierendrüsen Gewebe. — Das Blasthem des Nebennierendrüsen Gewebes ist aus Zellen, die im Embryonalstadium verblieben sind, gebildet. Diese Zellen sind bandartig das Mesonephros entlang gepresst.

4. Kiemen. — Es besteht Erweiterung und Verzweigung der Kiemenfransen die mit einem Epithelium bedeckt sind, welches höher und zellenreicher als bei den Kontrolltieren sind. Das Stroma ist mit histiocytären Zellen infiltiert (Bild 7 und 8).

5. Leber. — Bei den Kaulquappen der I. und II. Gruppe tritt parenchymatöse Degeneration mit Nekrose auf, bei den Kaulquappen der IV. Gruppe (Bild 9) Vakuolisierung. Die Mobilisierung der Kupferzellen (ihre Hyperplasie) ist stark ausgebildet.

6. Mesenchym. — Es bestehen Anzeichen von Hypoplasie. (Bild 10).

7. Entwicklung der Extremitäten. Es zeigt sich eine Blockade des Blasthems für die Extremitäten, (ohne Auftreten von Chondrogenese und Osteogenese wie bei den Kontrollquappen, Bild 11).

C. Physiko-chemische Ergebnisse

Die Umgebung, in der die Kaulquappen lebten, enthielt basisches Berylliumkarbonat in Form eines Niederschlags und Berylliumionen. Die Metaboliten der Kaulquappen haben keine pH-Veränderung in ihrer Umgebung verursacht (Graphikon 5, 6 und 7).

Im anorganischen Rückstand der Versuchskaulquappen hat man die Anwesenheit von Beryllium festgestellt (Spektralanalyse, Bild 12), was sich dort, wo man die Verabreichung von Beryllium 10 Tage vorher eingestellt hatte, nicht feststellen liess.

D. Erörterung der erhaltenen Ergebnisse

Bei der Besprechung der Ergebnisse lenken die Autoren die Aufmerksamkeit auf die Veränderlichkeit der Gewebereaktivität in der Ontogenese wegen ihrer ständigen Veränderung. Allein dadurch lässt sich die Unterschiedlichkeit der Wirkung ein- und derselben Berylliumkonzentrierung auf jüngere und ältere Formen der Kaulquappen erklären. Hierbei heben die Autoren die Veränderungen am neuroendokrinen System hervor, unter besonderer Berücksichtigung der Inhibierung der somatotropen und thyreotropen Funktion der Hypophyse und des Einflusses des Diencephalons mit Bezug auf die proliferative und resorptive Phase der Metamorphose.

E. Zusammenfassung

1. In der Lösung $\frac{M}{1000}$ von Beryllium tritt eine Inhibierung des Wachstums und eine Behinderung der Metamorphose der Kaulquappen auf, bei denen die Metamorphose nicht vor Beginn des Versuches angefangen hat.

Bei Kaulquappen, die dem Einfluss der gleichen Konzentrierung zur Zeit der Metamorphose ausgesetzt wurden, zeigt sich lediglich eine Verlangsamung des Wachstums und der Metamorphose.

2. In einer Lösung $\frac{M}{10\ 000}$ werden Wachstum und Metamorphose verlangsamt.

3. Die Wirkung des Berylliums auf das Wachstum und die Metamorphose ist reversibel.

4. pH-Wertigkeit der Lösung hat sich bei den Versuchs- und den Kontrollquappen nicht wesentlich unterschieden.

5. Eine spezifische Wirkung des Berylliums zeigt sich in der Mobilisierung der Kupferzellen, der Anhäufung von histiocytären Elementen in den Kiemen und in der Hypoplasie des Mesenchyms.

6. An dem Determinismus des komplexen Mechanismus der Wirkung des Berylliums auf das Wachstum und die Metamorphose haben die neuroendokrinen Faktoren Anteil, welche bei der Morphogenese dominieren (Diencephalohypophysärer Komplex, Schilddrüse), selbstverständlich neben der Konzentration der Berylliumionen.

Literatura

1. Barschi G. et de Brion G.: Culture prolongée du tissu conjonctif et épithélial des Mammifères en présence de cortisone et de désoxycorticostérone, Note in Presse medicale No. 34, 1952.
2. Chèvremont M. et Firket H.: Action du béryllium en culture de tissus, — Archives de Biologie, T. LXIII, Fasc. 3, 1952.
3. Chèvremont M. et Firket H.: Étude histochimique de l' action du béryllium sur la mitose en culture de tissus. — C. R. Soc. de Biol., T. CXLV, vol. 11—12, 1951.
4. Crooke A. C.: Endocrine Glands and Growth. — Predavanje održano u okviru »Schweizerische Medizinisch-Biologische Gesellschaft« Berne, 1953 (separat).
5. Delsol M.: Action du thioruacile sur les larves de Batraciens. — Archives de Biologie, T. LXIII, Fasc. 3, 1952.
6. Firket H. et Chèvremont M.: Neutralisation partielle du béryllium sur la mitose par le magnésium. — C. R. Soc. de Biol., T. CXLVI, 1952.
7. Frezenius R. und Jander G.: Handbuch der Analytischer Chemie, Berlin, 1940.
9. Greer A. M.: Evidence of hypothalamic Control of the Pituitary release of Thyrotrophin. — Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1951, V. 77.
10. Greer A. M.: The Role of the Hypothalamus in the Control of Thyroid Function. — Separat.
11. Gmelins: Handbuch der Anorganischen Chemie, Berlin, 1930.
12. Hunter D.: Otrovanje novim metalima, Prvi sastanak stručnjaka za higijenu rada, Zagreb, 1950.
13. Ivanova T.: Centralni nervni sistem i procesi formiranja oblika, Zurnal opšte biologije, T. IX. No. 3, 1948.
14. Milin R.: Uticaj svetlosti i mraka na morfogenezu. — Medicinski Arhiv, Br. 4, 1950.
16. Policard A.: La granulomatose béryllique. — La Medicina del Lavoro, rylliques. — Archives des maladies professionnelles, T. 13, No. 1, 1952.
16. Plicard A.: La granulomatose béryllique. — La Medicina del Lavoro, vol. 43, No. 2, 1952.
17. Policard A.: Les bases biologiques de la pathogénie des pneumoconioses. — Concours Médical, No. 10, 1952.
18. Prenant A., Bouin P. et Maillard L.: Traité d' Histologie, T. II, 1911.
19. Segal S. J.: Morphogenesis of the estrogen induced hyperplasia of the adrenals in larval frogs. — The Anatomical Record, vol. 115, No. 2, 1953.
20. Sluczewski A. et Roth C. J. P.: Action de la cortisone et de l' ACTH sur les axolotls en fonction du pH du milieu ambiant. — C. R. Soc. de Biol., T. CXLVI, 1952.
21. Spandau H. und Jander G.: Anorganische Chemie, Berlin, 1943.
22. Tredwell: Tabellen zur qualitativen Analyse, Wien, 1947.
23. Tuchmann-Duplessis H.: Action des sels de béryllium sur la régénération chez le Triton. — Bulletin d' Histologie appliquée, No. 7, 1950.
24. Tusques J.: Recherche sur l' effet morphogenetique de la thyroxine chez les Mammifères, C. R. Ass. des Anatomistes, No. 75, 1953.
25. Verne J.: Sensibilité et accoutumance aux toxiques des cellules cultivées in vitro. — J. Physiologie, T. 40, 1948.