

Fig. 1. The effect of bradykinin in varying doses on blood flow and heat production in the rabbit myocardium.

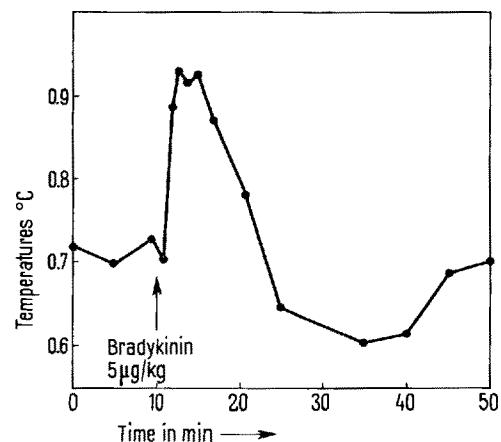


Fig. 2. Record of the difference in temperature between rabbit myocardium and aorta. The myocardium was hotter throughout than the aortic blood. Bradykinin raised its temperature still further with little effect on aorta blood temperature.

doses having no effect, large doses having a marked action in raising local heat production. This effect differs from the vascular action since bradykinin lowers vascular resistance in proportion to the dose. These effects may well be evidence of true vasodilatation in the coronary vessels but the present work does not exclude the possibility of extravascular factors.

Similar experiments have also been performed on the Patas monkey (*Erythrocebus patas*) and the cat. In all experiment the findings were the same as for the rabbit, bradykinin lowering vascular resistance in proportion to the dose and raising local heat production when the dose was large enough.

**Résumé.** En utilisant comme méthode la calorimétrie interne, nous avons montré que la bradykinine synthé-

tique abaisse la résistance vasculaire dans le myocarde du lapin, du chat et du singe, même à doses aussi réduites que 0,05 µg/kg. Des doses plus fortes (5 µg/kg) augmentent aussi l'activité métabolique du myocarde<sup>3</sup>.

J. R. PARRATT and J. GRAYSON

Department of Physiology, University College, Ibadan (Nigeria), June 18, 1962.

<sup>3</sup> The bradykinin was kindly donated by Dr. H. HOLGATE, Sandoz, Ltd. (England).

## PRO EXPERIMENTIS

### Avantages et inconvénients de la fixation par perfusion du tissu nerveux à la lumière d'une donnée de cytochimie

Un grand nombre de travaux de microscopie optique auront été nécessaires pour attirer l'attention sur les nombreux artefacts qui peuvent être liés au mode de fixation du tissu nerveux et particulièrement du système nerveux central (SCHARRER<sup>1</sup>, COTTE<sup>2</sup>, CAMMERMEYER<sup>3</sup>). Du point de vue *morphologique*, il est devenu évident que la fixation par perfusion, effectuée dans des conditions toujours plus précises<sup>3</sup> permet d'éviter ces artefacts. Dès lors ce procédé est d'une importance capitale en neurohistologie et surtout en neuropathologie expérimentale. Dans le domaine de la microscopie électronique, les inconvénients de la fixation du système nerveux central par immersion ont incité les chercheurs à surmonter un grand nombre de difficultés pour mettre au point des techniques de perfusion (PALAY et al.<sup>4</sup>).

Quelles que soient les modalités inhérentes à la microscopie optique ou électronique, la fixation par perfusion comporte très généralement, comme on le sait, l'utilisation de deux perfusats: le premier, destiné à «laver» les vais-

seaux, peut aller du simple sérum physiologique à des solutions salines complexes<sup>3,4</sup>; le second, constitué par un fixateur approprié.

A l'heure actuelle, l'on peut admettre avec la plupart des auteurs, et nous l'avons nous-même vérifié, que du point de vue *morphologique* le procédé par perfusion est incontestablement le meilleur, au moins en matière de système nerveux central. La question se pose alors de savoir si ce procédé conserve cette supériorité du point de vue *cytochimique*.

Dans le but de répondre à cette question, nous avons pris en considération des phénomènes qui ont fait l'objet d'une série de travaux antérieurs<sup>5-9</sup>; dans les ganglions

<sup>1</sup> E. SCHARRER, Anat. Rec. 72, 53 (1938).

<sup>2</sup> G. COTTE, Arch. Biol. 68, 297 (1957).

<sup>3</sup> J. CAMMERMEYER, Acta Neuropathol. 1, 245 (1961).

<sup>4</sup> S. L. PALAY, S. M. McGEE-RUSSEL, S. GORDON et M. A. GRILLO, J. Cell Biol. 12, 385 (1962).

<sup>5</sup> R. SEITE, Arch. Anat. Micr. 44, 89 (1955).

<sup>6</sup> R. SEITE, Arch. Anat. Micr. 45, 261 (1956).

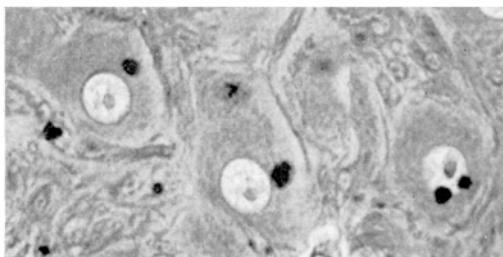
<sup>7</sup> R. SEITE et G. CHAMBOST, Z. Zellforsch. 47, 498 (1958).

<sup>8</sup> R. SEITE, 1er Congrès Intern. Histochim. Cytochim. (Paris 1960), sous presse.

<sup>9</sup> D. PICARD, R. SEITE et S. DURAND, Proceedings of the IVth Intern. Congr. Neuropathol. (München) 1, 222 (1962).

sympathiques et rachidiens, dans la moelle, le cortex cérébral et le cortex cérébelleux, nous avons décrit (Figure) un produit d'élaboration figuré d'origine nucléaire gagnant le péricaryon et les prolongements cellulaires; il représente sans doute non pas une entité structurale, mais plutôt l'apparence figurée, dans des conditions techniques déterminées, d'un complexe chimique lié au métabolisme des neurones considérés.

En effet, sans pouvoir entrer ici dans l'exposé de détails pourtant importants, une étude approfondie<sup>10</sup> du point de vue histochimique et du point de vue des conditions de fixation (en ce qui concerne la nature du liquide fixateur) nous a appris que ce produit est un complexe lipoprotéique contenant des ribonucléoprotéines, une fraction glycogénique et des protéines soufrées. Après une fixation par *immersion*, une étude statistique dont les résultats seront publiés *in extenso* par ailleurs nous a montré<sup>10</sup> qu'environ 25% des neurones du ganglion cervical supérieur, par exemple, contiennent ce complexe sous forme d'inclusions nucléaires ou cytoplasmiques. Or nous avons été frappé par les proportions très variables obtenues sur le matériel provenant d'animaux *perfusés*; nous avons alors pu montrer que ces variations sont directement liées à la quantité de sérum physiologique perfusé dans un premier temps, avant le fixateur. C'est ainsi: qu'après une perfusion préalable de 300 ml (ce qui représentait environ, en ml, 15% du poids de l'animal exprimé en grammes, alors que CAMMERMEYER<sup>3</sup> fixe le taux optimum à 14%) nous n'avons retrouvé ce complexe chimique que dans 10% des cellules; après 800 ml de sérum physiologique cette proportion tombe à 1-2%. Ces énormes différences enregistrées en fonction du volume du perfusat sont vraisemblablement dues à une diffusion dans le sérum physiologique du complexe chimique considéré; or il faut remarquer qu'il représente non pas une substance de faible poids moléculaire facilement diffusible *a priori* mais sans aucun doute un édifice macromoléculaire.



Ganglion cervical supérieur. Helly. Noir Soudan. Inclusions intranucléaires et intracytoplasmiques fortement soudanophiles.

Ainsi la perfusion nous avait permis d'obtenir un matériel parfait du point de vue morphologique, mais il est par contre inadéquat du point de vue cytochimique et totalement inutilisable en ce qui concerne l'étude de variations quantitatives expérimentales. Il faut rappeler ici que RACADOT<sup>11</sup> a montré que la fixation par perfusion provoque une dégranulation artificielle des cellules adénohypophysaires.

Il n'est évidemment nullement question de généraliser nos résultats, obtenus dans un cas particulier, à n'importe lequel des constituants cellulaires, mais simplement d'apporter un élément quantitatif de réponse au problème posé. C'est un truisme que de dire avec de nombreux auteurs (WOLMAN<sup>12</sup>) qu'aucune formule de fixateur ne peut prétendre être parfaite, aussi bien du point de vue morphologique que cytochimique; mais les résultats préliminaires que nous rapportons tendent à appuyer en outre la notion moins habituellement reconnue semble-t-il, selon laquelle aucun des deux procédés de fixation (perfusion ou immersion) ne peut être considéré comme parfait. Dans l'ignorance où nous sommes souvent quant au comportement de tel ou tel constituant cellulaire vis-à-vis du mode de fixation, il paraît prudent, non pas de choisir exclusivement l'un ou l'autre de ces procédés, mais bien de les confronter en les utilisant parallèlement de façon systématique dans toute recherche morphologique et histochimique.

**Summary.** It has been extensively demonstrated that perfusion is the best fixation procedure for providing good morphological evidence of *structures*, especially in the case of nervous tissue. But it might be questioned if it should also be preferred when *cytochemical* data have to be obtained or compared.

As a preliminary attempt to answer this question, lipoproteic inclusions in nerve cells of vegetative ganglia of adult cat have been considered. These occur in about 25% of cells after immersion in fixative, whereas if perfusion is used, a relation appears between the amount of saline perfused before the fixative fluid and the percentage of cells containing inclusions: this falls to 10% after 300 ml saline, to 1% after 800 ml. In conclusion, though structural artefacts have been avoided and fixation appears excellent, perfusion is significantly responsible for a definite cytochemical alteration.

R. SEITE

*Laboratoire d'Histologie, Faculté de Médecine, Marseille (France), le 9 octobre 1962.*

<sup>10</sup> R. SEITE, en préparation.

<sup>11</sup> J. RACADOT, C. R. Ass. Anat. 79, 383 (1953).

<sup>12</sup> M. WOLMAN, Int. Rev. Cytol. 4, 79 (1955).

12  $\mu$ . (2) Highly mineralized tissues are cut with a band saw in pieces of not more than 10 mm thickness. They are fixed in neutral formaldehyde, dehydrated in graded ethanol, cleared in amyl acetate and transferred to unpolym-

<sup>1</sup> With financial assistance from the Medical Research Council of Canada.

<sup>2</sup> B. COMBIE and A. REOURT, Philips Technical Rev. 19, 221 (1957-58).

<sup>3</sup> G. A. BOYD, *Autoradiography in Biology and Medicine* (Academic Press, New York 1955).

## Mounting Hard Tissues for Microradiography<sup>1</sup>

The simple and rugged apparatus for contact microradiography described by COMBIE and REOURT<sup>2</sup> has seen extensive use in our laboratory. However, the procedure which these authors prescribe for mounting sections on celloidin or formvar films has been found awkward and hazardous. The following simple technique has then been developed:

*Embedding and Cutting.* (1) Tissues of low mineral content embedded in nitrocellulose (BOYD<sup>3</sup>) are cut at 10 to