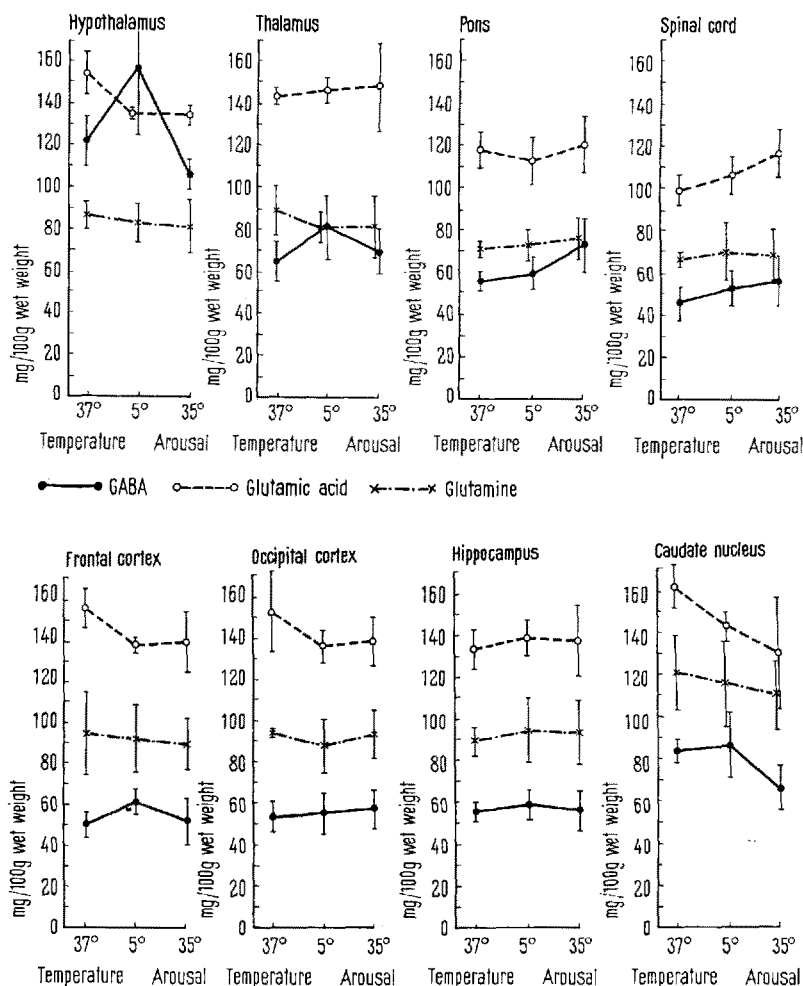


## Changes of Glutamine, Glutamic Acid and GABA in Cortical and Subcortical Brain Structures of Hibernating and Fully Aroused Ground Squirrels (*Citellus citellus*)

It has been demonstrated by previous experiments that (GABA)  $\gamma$ -aminobutyric acid, estimated in the whole ground-squirrel brain, exhibits a significant tendency to decrease as the animal approaches full arousal from the hibernating state<sup>1</sup>. Considering that differences in amino acid content of different brain regions<sup>2</sup> reflect variations in the metabolism of these compounds related to the functional state of the respective part of the brain, and bearing in mind the differential role of various cerebral structures in the mechanism of arousal as revealed by classical neurophysiological<sup>3</sup> and contemporary electrophysiological<sup>4</sup> studies, we proposed to investigate the possible changes in glutamine, glutamic acid and GABA in a num-

others were allowed to enter the state of hibernation. Five of them were sacrificed while hibernating with a rectal temperature of 5°C. The remaining five were transferred from the cold room into the laboratory at a higher temperature. Thus initiated, the process of arousal was allowed to proceed until a rectal temperature of 35°C was attained (within 1.5–2.5 h). Following decapitation, the tissue samples from various brain regions were carefully excised and immediately processed in order to identify and quantitatively estimate the cerebral amino acids as previously described<sup>1,2</sup>.

Results are summarized in the Figure. The highest concentrations of both glutamine and glutamic acid in the brain of control animals was found in the caudate nucleus. The concentrations were lower in neocortical, allocortical and diencephalic areas and lowest in the pons and the spinal cord. Distribution of GABA presented an entirely different pattern. By far the highest concentration was estimated in the hypothalamus. The order of concentration



ber of cortical and subcortical areas of the brain in hibernation and following arousal.

16 European ground squirrels (*Citellus citellus*) were used. Taking into consideration the importance of seasonal variations of the amino acid content of the brain of ground squirrels<sup>5</sup>, both control and experimental animals were sacrificed at the same time of the year. Six animals were kept and killed in the state of euthermia, while the

<sup>1</sup> Lj. T. MIHAILOVIĆ, Lj. KRŽALIĆ, D. ČUPIĆ, and B. BELESIN, *Exper.* 21, 100 (1965).

<sup>2</sup> Lj. KRŽALIĆ, V. MANDIĆ, and Lj. MIHAILOVIĆ, *Exper.* 18, 368 (1962).

<sup>3</sup> L. MERZBACHER, *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 100, 568 (1903).

<sup>4</sup> P. O. CHATFIELD and P. CH. LYMAN, *EEG Clin. Neurophysiol.* 6, 403 (1954).

<sup>5</sup> D. ČUPIĆ, Lj. KRŽALIĆ, B. BELESIN, and Lj. MIHAILOVIĆ, *Acta med. Yugosl.*, in press (1965).

from highest to lowest in other investigated regions was as follows: caudate nucleus, thalamus, pons, neocortical areas and hippocampus, and the spinal cord.

The most conspicuous change found in the brain of animals killed while deeply hibernating at a rectal temperature of 5°C, as compared with the controls, was a considerable and statistically highly significant increase of GABA in the hypothalamus (28.4%;  $p > 0.001$ ), thalamus (25.1%;  $p > 0.001$ ) and the frontal cortex (23.8%;  $p > 0.001$ ). This was associated with an equally significant decrease of glutamic acid in the frontal cortex, caudate nucleus and hypothalamus.

The process of arousal, on the other hand, was found to be characterized by a remarkable decrease of GABA undershooting the control values in the hypothalamus (13.9%;  $p > 0.01$ ) and caudate nucleus (22.1%;  $p > 0.001$ ), a return to control levels in the thalamus and frontal cortex, and a highly significant increase of this compound in the pons (31.5%;  $p > 0.001$ ) and the spinal cord (22.1%;  $p > 0.01$ ). With the exception of the two latter structures, where it increased, and the caudate nucleus, where it exhibited further decrease, glutamic acid remained at levels determined in hibernation at 5°C in all other investigated regions.

Glutamine was practically unchanged throughout.

It was tempting to interpret the differential changes of GABA observed in various cerebral structures following arousal in specific functional terms. This, however, would not at the present time lead to anything but another more or less plausible speculation. Some general conclusions, however, seem to be warranted. Results presented provide good further evidence for the considerable hetero-

geneity of amino acid pools in morphologically and functionally differentiated areas of the brain under normal and varying physiological conditions. In hibernation and following arousal, the most remarkable and apparently most dynamic changes of GABA occurred in those subcortical (diencephalic and brain stem) structures which have been implicated as essential for control of these co-ordinated physiological processes. This gives further support to the assumption that the glutamate-GABA system is of paramount importance in the regulation and maintenance of cerebral excitability<sup>6</sup>.

**Résumé.** On étudie ici la teneur en glutamine, en acide glutamique et en GABA dans des différentes parties du cerveau chez le *Spermophile* en sommeil hivernal profond et après le réveil de l'hibernation. Les changements les plus remarquables de l'acide glutamique et du GABA ont été constatés dans les structures sous-corticales regardées comme essentielles pour la régulation de ces processus physiologiques coordonnés.

LJ. T. MIHAILOVIĆ, LJ. KRŽALIĆ,  
and D. ČUPIĆ

*Institute of Pathological Physiology, Faculty of Medicine,  
University of Belgrade (Yugoslavia), July 16, 1965.*

<sup>6</sup> This work has been supported by a grant from the Medical Research Foundation of S. R. Srbija.

### Sur les effets du 5-fluoruracile injecté à l'embryon de Poulet à des stades avancés de l'incubation<sup>1</sup>

Dans une note, parue précédemment dans cette revue<sup>2</sup>, nous avons publié les premiers résultats obtenus en injectant à l'embryon de Poulet, à des stades précoces de son développement (avant l'incubation, 24 et 48 h après le début de l'incubation), différentes doses de 5-fluoruracile (5-FU). On a constaté que la substance a trois effets importants: un effet léthal immédiat, un effet léthal tardif et un effet tératogène. Il nous a paru intéressant de contrôler si ces trois effets se manifestent encore lorsque la substance est injectée à des stades avancés de l'incubation et cela dans le but de mieux préciser si ces effets sont spécifiques pour la substance ou s'ils sont plutôt en rapport avec une période particulièrement critique du développement embryonnaire.

Nos expériences portent sur un ensemble de 2500 embryons de Poulet, divisés en deux groupes: dans le premier, la substance a été injectée à la fin du cinquième, dans le second, à la fin du huitième jour de l'incubation. Le nombre des séries (embryons injectés et embryons-témoins), les quantités de substance et la modalité de l'injection sont exactement les mêmes que ceux employés au cours des expériences précédentes.

Les résultats sont les suivants:

**Effet léthal immédiat.** L'embryon supporte très bien l'injection de la substance et le % des embryons qui

meurent dans les trois jours qui suivent l'injection est minime, sauf pour les doses élevées. Si le 5-FU est injecté à la fin du cinquième jour de l'incubation, les doses élevées de 800 µg et de 1 mg sont assez fortement toxiques: le 36 et le 68% des embryons meurent. Mais avec les doses inférieures de substance, comme d'ailleurs avec toutes les doses, faibles et élevées, injectées à la fin du huitième jour, le nombre des morts est très bas, presque toujours superposable aux valeurs des séries de contrôle.

**Effet léthal tardif.** Nos expériences montrent que le nombre des embryons qui arrivent vivants le vingt-et-unième jour s'accroît sensiblement au fur et à mesure que l'injection de la substance est faite à des périodes plus avancées de l'incubation. Jusqu'à la dose de 400 µg, le % des embryons vivants correspond environ à celui des séries de contrôle; avec des doses plus élevées, les valeurs baissent. Mais, même avec les trois doses les plus élevées (600, 800 et 1000 µg), il y a toujours un certain nombre d'embryons (du 5 au 36%) qui arrivent vivants au terme de l'incubation; ce nombre est d'environ trois fois plus élevé lorsque l'injection est faite à la fin du huitième jour. Dans nos premières expériences (injection de la substance à des stades très précoces), aucun embryon n'était arrivé vivant avec les trois doses les plus élevées.

<sup>1</sup> Ces recherches ont été faites grâce à un subside du Fonds National Suisse de la recherche scientifique et de la Fondation E. Barell.

<sup>2</sup> G. CONTI et M. ARTA, *Exper.* 21, 479 (1965).