

The search for mitosis on the sections of the adrenal medulla of young rats treated with colchicine demonstrates the occurrence of mitotic figures in a percentage that agrees with that of labelled nuclei (Table I). In adult rats no mitosis was ever found, either in normal or experimental conditions, i.e. during cold exposure and recovery period.

These experiments show that the adrenal medulla cells in the adult animal have irreversibly lost the ability to multiply, but are still capable of synthesizing DNA if subjected to appropriate stimuli.

After the marked decrease induced by exposure to cold<sup>7</sup>, synthesis of DNA ex novo takes place when the animals are kept at room temperature (Table II). This is in full agreement with the results of histophotometric determination<sup>10</sup>. After 8–10 h of recovery, the nuclei generally show numerous grains and only a few are weakly marked. In the following hours (up to 56 h), the nuclei are weakly marked (Figure). This means that a rapid synthesis takes place in the first hours of exposure to room temperature and slow synthesis in the following hours. No labelled nuclei are found when  $H^3$ -thymidine is given after 5 or 10 days at room temperature.

It can be concluded that the decrease of the content of DNA/nucleus, observed during exposure to low temperature, is real and that during the recovery period a synthesis ex novo of DNA takes place in the nuclei in the absence of any mitotic process<sup>11</sup>.

**Riassunto.** In questa ricerca si dimostra sintesi di DNA con l'uso di timidina  $H^3$  non accompagnata a mitosi nella midollare surrenale di ratto adulto in seguito ad esposizione a bassa temperatura.

MARIPIA VIOLA-MAGNI

*Istituto di Patologia Generale, Università di Pisa (Italy), April 21, 1965.*

<sup>10</sup> M. P. VIOLA-MAGNI, submitted to *J. Cell Biol.*

<sup>11</sup> I wish to thank Professors E. PUCCINELLI and C. PELLEGRINO for stimulating discussion during the work and the preparation of the manuscript. I am also indebted to Mr. C. PUCCINI and Miss G. VALLINI for valuable technical assistance.

### Effetto della ouabaina sul tessuto nervoso in coltura in vitro

Dalla letteratura recente (BELKIN et al.<sup>1</sup>, YANG et al.<sup>2</sup>) sono noti vari casi di vacuolizzazione di cellule in coltura (fibroblasti di pollo, cellule ascitiche, cellule HeLa) provocata da sostanze di natura diversa, quali gli anestetici del gruppo della procaina, l'atropina, l'efedrina, la pilocarpina ed i sali di basi deboli quale il cloruro d'ammonio. Vacuolizzazioni naturali sono state riscontrate in alcune forme morbose quali la *malattia di Jakob-Creutzfeldt*, il *Kuru* (umane) e lo *Scrapie* (degli ovini). Recentissime ricerche eseguite nel nostro Istituto (BIGNAMI e PALLADINI<sup>3-5</sup>) hanno permesso di constatare l'identità delle alterazioni cerebrali morfologiche ed elettroencefalografiche (EEG) della malattia di Jakob-Creutzfeldt con quelle ottenute trattando animali (ratti, cavie) con iniezioni intracraniche di un glucoside, la *ouabaina* (g-strofantina). In entrambi i casi, associata alla comparsa di un *ritmo periodico* EEG, si ha uno *stato spongioso* di zone corticali. Microscopicamente lo stato spongioso, sia naturale che artificialmente provocato, consiste nella vacuolizzazione della cosiddetta «sostanza fondamentale» della sostanza grigia corticale.

Recentissime osservazioni di GONATAS et al.<sup>6</sup> studiando tale tessuto di casi di malattia umana al microscopio elettronico, hanno accertato che lo stato spongioso è dovuto a rigonfiamento di processi cellulari di astrociti e di neuroni. A questo quadro si accompagna la sparizione del reticolo endoplasmico e dei ribosomi; non vi sarebbero alterazioni a carico dei mitocondri; gli astrociti colpiti sono ipertrofici. Vi sarebbero inoltre varie alterazioni della mielina, del pericarion e dei bottoni sinaptici. Va ricordato che questi dati sono stati ricavati da materiale biotico e quindi inevitabilmente alterato.

È ormai chiaramente dimostrato (SKOU<sup>7,8</sup>, BECKER et al.<sup>9</sup>, GARDOS<sup>10</sup>, BONTING<sup>11</sup>, POST e SEN<sup>12</sup> e molti altri) che la g-strofantina (ouabaina) è un potente inibitore di

un complesso enzimatico di membrana, l'ATP-asi  $Na^+-K^+$  dipendente, deputato al trasporto attivo di acqua e cationi, studiato nel sistema nervoso da TORACK e BARNETT<sup>13,14</sup>. Dalle osservazioni di JUDAH e AHMED<sup>15</sup> risulta che questo farmaco ha una azione elettiva sulla ATP-asi della membrana degli elementi del tessuto nervoso. A seguito degli incoraggianti risultati ottenuti da BIGNAMI e PALLADINI in vivo ed in toto, mentre proseguono le ricerche tendenti a chiarire nella spongiosi indotta a quali elementi della «sostanza fondamentale» vada riferita la vacuolizzazione, essendo ancora non molto probatorie le osservazioni succitate su materiale biotico umano, si è ritenuto importante accettare l'effetto del glucoside sugli elementi di tessuto nervoso coltivato in vitro, sia per la

- <sup>1</sup> M. BELKIN, W. G. HARDY, H. C. ORR e A. B. LACHMAN, *J. nat. Cancer Inst.* 28, 187 (1962).
- <sup>2</sup> W. C. T. YANG, F. F. STRASSER e C. M. POMERAT, *Exp. Cell Res.* 38, 495 (1965).
- <sup>3</sup> A. BIGNAMI e G. PALLADINI, *Rend. Acc. Naz. Lincei s. VIII* 38, 253 (1965).
- <sup>4</sup> A. BIGNAMI e G. PALLADINI, *Nature*, in press.
- <sup>5</sup> A. BIGNAMI e G. PALLADINI, *V. Intern. Congr. Neuropath. Exp. Med.*, in press.
- <sup>6</sup> N. K. GONATAS, R. D. TERRY e M. WEISS, *Trans. Am. Neur. Ass.* 89, 13 (1964).
- <sup>7</sup> J. C. SKOU, *Biochim. biophys. Acta* 23, 394 (1957).
- <sup>8</sup> J. C. SKOU, *Biochim. biophys. Acta* 42, 6 (1960).
- <sup>9</sup> N. H. BECKER, S. GOLDFISCHER, W. Y. SHIN e A. B. NOVIKOFF, *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 8, 649 (1960).
- <sup>10</sup> G. GARDOS, *Exper.* 20, 127 (1964).
- <sup>11</sup> S. L. BONTING, in *Water and Electrolyte Metabolism* (Elsevier, Amsterdam 1964), vol. II, p. 35.
- <sup>12</sup> R. L. POST e A. K. SEN, *J. Histochem. Cytochem.* 13, 105 (1965).
- <sup>13</sup> R. M. TORACK e R. J. BARNETT, *J. Histochem. Cytochem.* 11, 763 (1963).
- <sup>14</sup> R. M. TORACK e R. J. BARNETT, *J. Neuropath. exp. Neurol.* 23, 46 (1964).
- <sup>15</sup> J. D. JUDAH e K. AHMED, *J. cell. comp. Physiol.* 64, 355 (1964).

possibilità di seguire tutto il processo delle alterazioni, sia perché *in vitro* l'azione del farmaco sui diversi elementi è diretta.

In queste prime osservazioni ci siamo riferiti agli elementi di gangli embrionali di pollo (di 11/12 giorni di incubazione) per la maggior conoscenza da parte nostra di questo materiale in coltura, ripromettendoci naturalmente di passare in seguito allo studio di colture di tessuto nervoso di mammiferi. D'altra parte, ricerche in corso dimostrano che nel pollo si ha in seguito a trattamento con

la ouabaina un quadro clinico perfettamente sovrapponibile a quello ottenuto nel ratto. Si è preferito lavorare su culture disgregate (in tripsina 3:10000 per h) per la maggiore uniformità delle colture da confrontare, la maggiore facilità di osservazione ed il più omogeneo contatto della droga con gli elementi coltivati.

Per controllo, sono state trattate anche colture di fibroblasti ottenuti dagli abbozzi tripsinizzati degli arti degli stessi animali. Le colture sono state allestite su vetro di Jena, sia in goccia tra vetro porta- e copri-oggetto distanziati da un anellino, sia in capsule di Petri, in atmosfera al 5% di  $\text{CO}_2$ , alla temperatura di 38,5–39°C. La concentrazione della ouabaina è stata di  $1 \cdot 10^{-4} M$ . Il trattamento è stato fatto nei seguenti tempi: dopo 24 h di coltura nel mezzo normale (Eagle con siero di vitello al 10% + 50 U/ml di penicillina), questo è stato sostituito con mezzo nuovo addizionato con la ouabaina. La coltura è stata fissata 24–48 h dopo l'aggiunta del glucoside.

Nelle colture di gangli le prime vacuolizzazioni compaiono in molte delle cellule a carattere fibroblastico dopo 6 h. La vacuolizzazione raggiunge il suo massimo dopo 24 h; non abbiamo controllato un eventuale *recovery*. I vacuoli, inizialmente piccoli, divengono poi numerosi e dilatati, occupando quasi tutto il citoplasma. Le cellule nervose non appaiono colpite né sembra alterata la proliferazione delle fibre nervose. Un certo numero di cellule a carattere fibroblastico non manifesta segni di vacuolizzazione. Il sospetto che gli elementi colpiti siano cellule di glia che in coltura hanno assunto aspetto fibroblastico è stato convalidato in senso positivo dalle esperienze di controllo su fibroblasti tipici, ottenuti dalla disgregazione di abbozzi di arti. Infatti queste colture, trattate con la droga con le stesse modalità di quelle di tessuto nervoso, non presentano segni di vacuolizzazione. Esperienze in corso decideranno se tale resistenza sia legata alla concentrazione usata dell'inibitore od alla sua specificità di azione su cellule con diverse ATP-asi (JUDAH e AHMED<sup>15</sup>). La conoscenza che abbiamo in questo caso sulle modalità di azione del glucoside, ci permette di affermare che i vacuoli cellulari non sono dovuti alla penetrazione ed accumulo del farmaco (come ammesso per altre sostanze da YANG et al.<sup>2</sup>), ma sono legati alla penetrazione d'acqua per l'alterata permeabilità della membrana. Rimane chiaramente dimostrato, pertanto, che in colture disgregate la ouabaina in concentrazione  $1 \cdot 10^{-4} M$ , pari a quella usata in esperienze di inibizione *in vitro* (BONTING<sup>11</sup>) agisce inibendo specificatamente l'ATP-asi  $\text{Na}^+ \text{-K}^+$  dipendente delle cellule gliali risultando inefficace a questa concentrazione, sia sui fibroblasti che sulle cellule nervose.

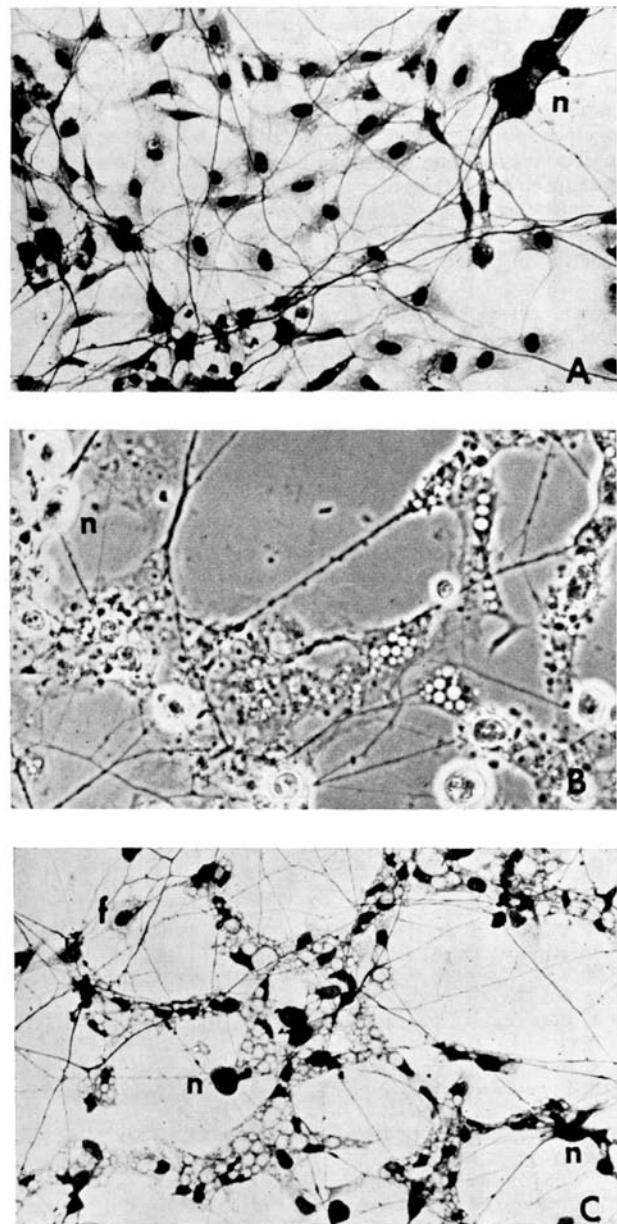
Questa osservazione, se da un lato avvalorà la importanza della glia nei rapporti glia-neurone nella estrinsecazione dell'attività nervosa, in appoggio alle vedute di HYDEN<sup>16</sup> e a quelle di MARTINO e TERIO<sup>17,18</sup>, dall'altra conferma l'esistenza di una specificità a livello biochimico delle membrane cellulari che sopravvive alla scomparsa della differenziazione morfologica.

**Summary.** The addition of  $1 \cdot 10^{-4}$  ouabain (strophanthidin-G), a  $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -dependent ATP-ase inhibitor, to the cultivating medium of chick embryo spinal ganglia *in vitro* cultures caused the vacuolization of the cytoplasm of the fibroblast-like cells, but not of the nervous ones, after 6 h of culture, with a maximum after 24 h.

<sup>16</sup> H. HYDEN, Endeavour 21, 83 (1962).

<sup>17</sup> L. MARTINO e B. TERIO, Arch. Zool. 47, 27 (1962).

<sup>18</sup> B. TERIO e L. MARTINO, Riv. Neurobiol. 9, 664 (1963).



A, Coltura di ganglio spinale di pollo, disgregato con tripsina e coltivato su vetro in mezzo liquido. Dopo 36 h di coltura. Fissato e colorato con il metodo di Bodian. B, Stesso tipo di coltura, trattato con ouabaina dopo 24 h di coltura ed osservato in contrasto di fase a 12 h dal trattamento. Notare la vacuolizzazione già notevole degli elementi fibroblastici di natura gliale mentre sono indenni le cellule nervose (n). C, Come sopra, fissato e colorato con il metodo di Bodian, dopo 40 h dal trattamento. Notevole vacuolizzazione degli elementi gliali, indenni le cellule nervose (n) e i fibroblasti tipici (f).

The vacuolization, due to water assumption by the cell membrane, whose permeability was altered by the inhibition of its enzymatic systems, was not reproducible in typical fibroblast cultures, suggesting that the cells vacuolized in the cultures of spinal ganglia had to be identified with glial cells that had lost in vitro their morphological but not biochemical differentiation. This supports the view that the  $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -dependent ouabain-sensitive ATPase is mainly localized on the glial cell membrane.

The relationship between these researches and the previous ones by BIGNAMI and PALLADINI on the in vivo

and in toto inhibition of the central nervous system transport enzymes is discussed in connection with the problem of glial-neuronal interrelations.

A. STEFANELLI, G. PALLADINI  
e L. IERADI

*Istituto di Anatomia Comparata «G. B. Grassi» della  
Università di Roma (Italia), il 20 luglio 1965.*

### The Number of Neurons, Glial and Perineurium Cells in an Insect Ganglion

The number of neurons, glial and perineurium cells was counted in a complete series of microscopic sections of the second abdominal ganglion of the stick insect (*Carausius morosus* Br.). The series consisted of 34 sections embedded in paraffin, cut sagittally at  $7 \mu$  and stained with methyl blue-eosin. Each cell was identified by direct high power ( $\times 900$ ) microscopy and marked on a photomicrograph ( $\times 327$ ) of the same section. Three different methods (counts A, B and C) were used for counting. All methods were based on the presence of the nucleolus<sup>1</sup>. Since the mean diameter of the nucleoli was about  $2.5 \mu$ , there was little probability of counting the same cell more than once in serial sections. In count A all cells with a clearly visible nucleolus were counted (Table I).

Often it was impossible to ascertain the nucleolus of a given cell; therefore count B was undertaken, in which all cells with a nucleolus were counted, and in addition, if it was not visible, the cell was counted on the section where the largest diameter of the nucleus was lying. This count, also presented in Table I, yielded a smaller number of glial cells because these cells are often densely crowded together, their nuclei are of smaller diameter, and the chromatin of the nuclei is sometimes densely packed, so that the nucleolus could not be discriminated. In some cases there were two or three nucleoli in one nucleus.

A reliability test was made in count C: in a single section which contained a large cell population each cell was counted, if the nucleolus was visible or the maximum diameter of the nucleus was lying on this section. In some instances, up to ten adjacent sections were compared. Poorly stained cells, not counted in count A and B, were also counted by this method. Table II demonstrates the result of this count and of count B obtained from the same section. Comparison of the two counts indicates that count B yielded 9% fewer neurons, 27% fewer glial cells, and 4% fewer perineurium cells. By extrapolation of the data of count C one finds for the whole ganglion: 663

neurons, 1184 glial cells and 539 perineurium cells; total 2386 cells.

FIELDEN and HUGHES<sup>2</sup> found 600 neurons in a typical abdominal ganglion of a dragonfly nymph. However, in their study, as well as in other investigations by previous authors, glial and perineurium cells have not been included.

The following ratio between the three types of cells was found:

Count	Neurons	Glial cells	Perineurium cells
B	1	1.5	0.8
C	1	1.8	0.8

With a compensation polarimeter the total cross-sectional area of the whole ganglion was measured and multiplied by the thickness ( $7 \mu$ ) of the sections. The volume of the ganglion was  $140 \cdot 10^{-4} \text{ mm}^3$ . The volume of the neuropil was determined analogously and found to be  $77 \cdot 10^{-4} \text{ mm}^3$ . By subtraction, the volume of the cell cortex turned out to be  $63 \cdot 10^{-4} \text{ mm}^3$ .

Table II. Sample count

	Neurons	Glial cells	Perineurium cells	Total
Count B	22	41	26	89
Count C	24	52	27	103

**Zusammenfassung.** Im zweiten Abdominalganglion der Indischen Stabheuschrecke (*Carausius morosus* Br.) wurden  $600 \pm 50$  Neurone,  $1000 \pm 100$  Gliazellen und  $500 \pm 30$  Perineuriumzellen, zusammen etwa 2100 Zellen gezählt. Die Volumina des Ganglions, des Neuropilems und des Zellcortex betragen etwa:  $140 \cdot 10^{-4} \text{ mm}^3$ ,  $75 \cdot 10^{-4} \text{ mm}^3$  und  $65 \cdot 10^{-4} \text{ mm}^3$ .

H. W. BECKER<sup>3</sup>

Table I. Total count

	Neurons	Glial cells	Perineurium cells	Total
Count A	443	1007	304	1754
Count B	608	934	519	2061

<sup>1</sup> C. A. G. WIERNSMA, *Acta physiol. pharmacol. neerl.* 6, 135 (1957).

<sup>2</sup> A. FIELDEN and G. M. HUGHES, *J. exp. Biol.* 39, 31 (1962).

<sup>3</sup> Present address: Hirnforschungsinstitut der Universität Zürich (Switzerland).

*Zoologisches Institut der Universität Freiburg i. Br.  
(West Germany), August 10, 1965*