

Fig. 2. 'Häutchen'-preparation of mesothelial cells (abdominal wall) 48 h after i.p. injection of endotoxin. Note mesothelial cells with caryokinetic figures. Staining HE, silver impregnation of cell borders  $\times 350$ .

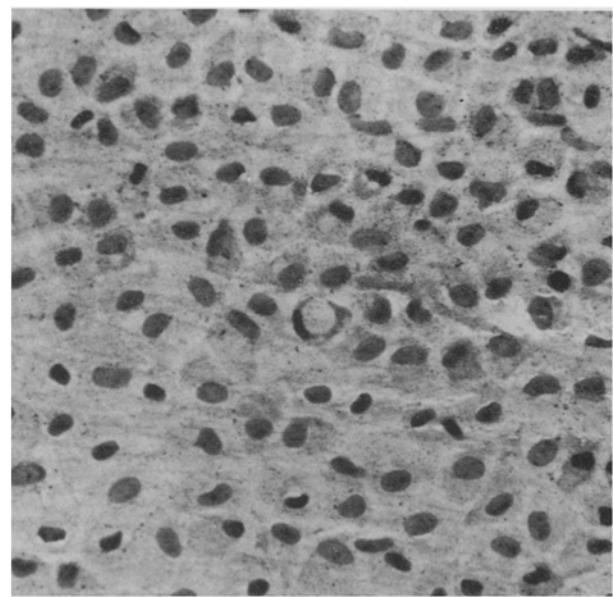


Fig. 3. 'Häutchen'-preparation of mesothelial cells (diaphragma) 48 h after i.p. injection of endotoxin. Note signet ring cell in the center. Staining: HE,  $\times 350$ .

endothelial cells upon i.v. injection of endotoxin. GAY-NOR<sup>1</sup> described an increased rate of proliferating endothelial cells 72 h after i.v. endotoxin injection. Endothelial cell proliferation may be due to cell damage induced by endotoxin, since McGRAH and STEWART<sup>8</sup> found nuclear vacuolisation and loss of nuclei in endothelial cells. However, MCKAY et al.<sup>9</sup> did not observe damage of endothelial cells in endotoxemia. They only found a swelling of cytoplasma of the Kupffer cells. In the present investigations neither cytoplasmic vacuolization (signet ring cells were rarely observed), nor loss of mesothelial cell nuclei appeared. However, the loss of silver-stainable cell borders may indicate some injury of meso-thelial cells, which may be followed by an increased cell proliferation.

Further investigations are necessary to determine the relationship between intravascular coagulation and endothelial cell reaction in endotoxemia.

**Zusammenfassung:** Die i.p. Injektion von Endotoxin führt bei der Ratte zum vermehrten Auftreten von Mitosen in Mesothelzellen. Vereinzelt kommt es zur Verbreiterung der Interzellularräume, äußerst selten treten Siegelringzellen auf. Es wird vermutet, dass eine geringe endotoxinbedingte Zellschädigung den Stimulus zur Mesothellzellproliferation darstellt.

M. MOHR and G. BENEKE

Abteilung Pathologie II des Zentrums für Biologie und Theoretische Medizin der Universität,  
Steinhövelstrasse 9, D-7900 Ulm (Germany),  
28 July 1971.

<sup>8</sup> J. M. McGRAH and G. J. STEWART, J. exp. Med. 129, 833 (1969).  
<sup>9</sup> D. G. MCKAY, W. MARGARETTEN and I. CSAVOSSY, Lab. Invest. 15, 1815 (1966).

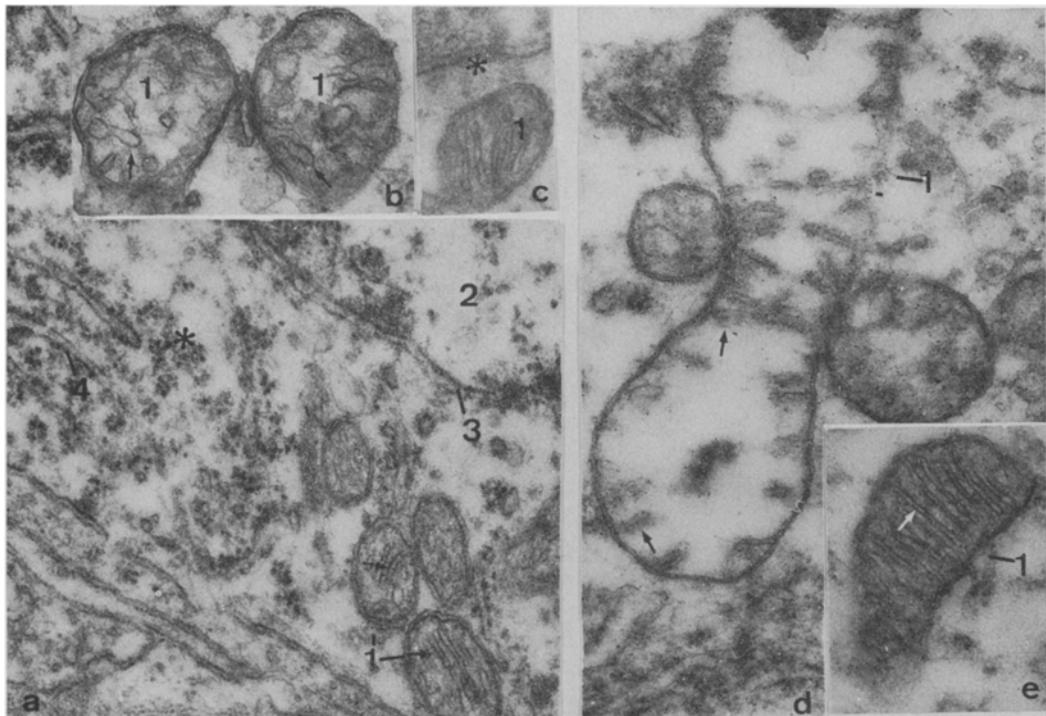
## Physiologische und ultrastrukturelle Testung der neuen Substanz Silymarin an den Vorderhorn-ganglienzellen des Kaninchens

Seit über 2 Jahren findet auf dem Gebiet der Lebertherapie der Wirkstoff Silymarin<sup>1,2</sup> starke Beachtung. In pharmakologischen<sup>3-7</sup> und klinischen<sup>8-10</sup> Studien wurde darüber berichtet.

Nach elektronenoptischen Untersuchungen ist Silymarin in der Lage, die durch Tetrachlorkohlenstoff geschädigte Struktur von Mitochondrien und endoplasmatischem Retikulum in der Leberzelle günstig zu beeinflussen. Klinische Erfahrungen<sup>9,10</sup> bestätigen zusammen mit elektronenmikroskopischen Kontrollen diese Befunde. VARKONYI et al.<sup>4</sup> berichten, dass Silymarin die mit Triethylzinnssulfat (Tzs) herbeigeführte Verschlechte-

rung der Funktion (konditionierte Reflexfähigkeit) und entsprechende ultrastrukturelle Veränderungen im Bereich des ZNS verhindern kann. Es lag daher nahe zu prüfen, ob und wie Silymarin die Strukturelemente anderer Bereiche des ZNS beeinflusst.

Anknüpfend an verschiedene physiologische, histochimische und elektronenoptische Untersuchungen<sup>11-14</sup>, bei denen die funktionellen und strukturellen Änderungen motorischer Vorderhornzellen im Lumbalmark von Kaninchen unter abgestufter Ischaemie eingehend beschrieben wurden, erschien es uns aufschlussreich zu prüfen, ob Silymarin solche Veränderungen beeinflussen kann.



Ultrastruktur normaler und ischaemischer Motoneuren und ihrer Mitochondrien aus dem Lumbalmark von Kaninchen bei Gaben von Silymarin vor bzw. nach Setzen von experimentellen Schäden. Glutaraldehyd-Perfusion, Araldit-Einbettung.

a) Ausschnitt einer intakten motorischen Vorderhornzelle ( $L_6$ ) nach dreitägiger Medikation von 100 mg Silymarin/kg. Keine Ischaemie. Die Membranen der Cristae ( $\uparrow$ ) in den Mitochondrien (1) verlaufen parallel. Die rosettenartige Gruppierung der Ribosomen (\*) ist sehr deutlich zu erkennen. 2, Kern, 3, Kernmembran, 4, endoplasmatisches Retikulum.

d-e) Medikation von 100 mg Silymarin/kg. Medikationsdauer 4 Tage. d) Gequollenes Mitochondrion (1) aus ( $L_6$ ) nach einer Ischaemie von 20 min. Typisch reduzierte Cristae ( $\uparrow$ ) entsprechend dieser Ischaemiedauer. Aus dem nichtischämischen Bereich desselben Tieres stammt das Mitochondrion (1) in Figur e), bei dem die parallel verlaufenden Membranen der Cristae ( $\uparrow$ ) gut zu erkennen sind.

b-c) Medikation von 150 mg Silymarin/kg. Medikationsdauer 9 Tage. b) Mitochondrien einer ischaemischen Ganglienzelle aus  $L_6$ ; Ischaemie von 10 min. Die keulenartigen Aufreibungen der Cristae ( $\uparrow$ ) sind charakteristisch für diese Ischaemiedauer. Daneben c) intaktes Mitochondrion (1) aus dem nichtischämischen Abschnitt des Lumbalmarkes ( $L_1$ ) des gleichen Tieres. \*) ungeschädigte Synapse.

**Methodik.** Bei 9 Kaninchen klemmten wir die Aorta oberhalb des Tripus Halleri ab<sup>11</sup> (1). Dabei wurde der Quadrizepseigenreflex in gleichmässigem Takt ausgelöst und laufend registriert. Die Höhe der Aortenabklemmung entspricht etwa der Stelle des Lumbalmarkes, unterhalb derer die Ischaemie wirksam wird. Als Kriterien galten die maximale Funktionszeit (gemessen vom Beginn der Aortenabklemmung bis zum Verschwinden des Reflexes) und die Schwundzeit (gemessen vom Zeitpunkt der Aufhebung der Aortenklemme bis zur Rückkehr des Reflexes).

Um mit Sicherheit eine mögliche Einwirkung des Silymarins auf die Struktur der Motoneuren erfassen zu können, war eine lückenlose elektronenmikroskopische Überprüfung des Vorderhornbereiches<sup>14</sup> aller Abschnitte des Lumbalmarkes unerlässlich.

Während die Kontrolltiere kein Silymarin erhielten, verfütterten wir täglich an den einen Teil der Versuchstiere 3-9 Tage vor der Abklemmung 100 bis 150 mg/kg per os. Andere Tiere wurden nach der Abklemmung 6 bzw. 7 Tage lang täglich mit 100 bzw. 200 mg/kg Silymarin behandelt.

**Ergebnisse.** Bei allen untersuchten Tieren lagen maximale Funktionszeit und Schwundzeit unabhängig von der Einzeldosis und der Medikationsdauer des Silymarins im Normalbereich. Auf keinen Fall konnte aus den Ergebnissen der Funktionsprüfung der Ganglienzellen auf eine Beeinträchtigung der Funktionsfähigkeit der motorischen

Vorderhornzellen unter Einwirkung von Silymarin geschlossen werden.

Wie die elektronenmikroskopische Prüfung zunächst zeigte, waren im gesamten Lumbalmark eines Versuchstieres, das an 3 Tagen regelmässig in gleichbleibender Dosierung 100 mg/kg Silymarin erhielt, keinerlei Abweichungen von der normalen Struktur der motorischen Vorderhornzellen zu erkennen (Figur a).

Nach einer temporären Ischaemie von 10 bzw. 20 min war die Ultrastruktur bei allen untersuchten Tieren oberhalb der Abklemmstelle intakt. Weder am Kern noch an den Organellen (Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Komplexe) der motorischen

<sup>1</sup> H. WAGNER, L. HÖRHAMMER und R. MÜNSTER, Arzneimittel-Forsch. 18, 688 (1968).

<sup>2</sup> H. WAGNER, L. HÖRHAMMER und M. SEITZ, Arzneimittel-Forsch. 18, 696 (1968).

<sup>3</sup> G. HAHN, H. D. LEHMANN, H. UEBEL und G. VOGEL, Arzneimittel-Forsch. 18, 698 (1968).

<sup>4</sup> T. VARKONYI, M. MAURER, Ö. T. ZOLTAN und B. CSILLIK, Arzneimittel-Forsch. 21, 148 (1971).

<sup>5</sup> G. VOGEL, Arzneimittel-Forsch. 18, 1063 (1968).

<sup>6</sup> G. VOGEL und I. TEMME, Arzneimittel-Forsch. 19, 613 (1969).

<sup>7</sup> G. WEIL und M. FRIMMER, Arzneimittel-Forsch. 20, 862 (1970).

<sup>8</sup> V. FINTELmann, Therapiewoche 20, 1055 (1970).

<sup>9</sup> M. SCHILDER, Therapiewoche 20, 3446 (1970).

<sup>10</sup> R.-D. Schopen und O.-K. LANGE, Med. Welt 21, 691 (1970).

Vorderhornzellen konnten hier irgendwelche Veränderungen nachgewiesen werden (Figur c und e).

Hinsichtlich der Strukturveränderungen an den motorischen Vorderhornzellen im Ischaemiebereich waren besonders charakteristisch für die verschiedenen Ischaemiezeiten die Veränderungen der Mitochondrien und des endoplasmatischen Retikulum (Figur b und d). Nach einer Ischaemie von 10 min, die noch im Bereich der Strukturerhaltung liegt, zeigten die Cristae der Mitochondrien kolbenartige Aufreibungen. In der Mitochondrienmatrix waren wolkenartige Substanzverdichtungen zu erkennen. Die Zisternen des endoplasmatischen Retikulums waren deutlich erweitert.

Nach einer Ischaemiedauer von 20 min, bei welcher die Strukturerhaltungszeit der motorischen Vorderhornzellen überschritten ist und die deshalb zu irreversiblen Schädigungen an diesen Zellen führt, waren die Cristae der stark gequollenen Mitochondrien reduziert. Ein Zerfall der Zisternen des endoplasmatischen Retikulum und eine Auflösung der rosettenartigen Gruppierung der Ribosomen sind kennzeichnend für die Veränderungen bei dieser Ischaemiedauer.

Weder vorher noch nachher verabreichtes Silymarin beeinflusste die geschilderten Änderungen der Ultrastruktur.

**Schlussfolgerung.** Mit einer Funktionsprüfung der motorischen Vorderhornganglienzenellen nach BLASIUS und einer elektronenmikroskopischen Untersuchung dieser Zellen

nach abgestufter Ischaemie und entsprechenden Kontrollen ist eine umfassende Möglichkeit gegeben, den Einfluss von Substanzen auf die normale und auf die geschädigte Ganglienzellfunktion und -struktur zu bestimmen<sup>11,14,15</sup>. Silymarin übte keinen solchen Einfluss aus. Auch eine schädigende Wirkung durch Silymarin liess sich nicht feststellen, womit alle bisherigen Untersuchungen über die Verträglichkeit des Silymarins bestätigt wurden.

**Summary.** The effect of Silymarin on the function and structure of lumbar anterior horn cells in the rabbit was studied under graduated ischemia. It was shown that Silymarin has neither useful nor injurious influence on the anterior horn cells examined.

W. BLASIUS, G. MERKER und C. PANNE

Abteilung für Angewandte Physiologie der Justus-Liebig-Universität, Friedrichstrasse 24, D-6300 Giessen (Deutschland), 23. Juli 1971.

<sup>11</sup> W. BLASIUS, Z. Biol. 103, 209 (1950).

<sup>12</sup> W. BLASIUS und H. THRON, Z. Biol. 107, 161 (1954).

<sup>13</sup> W. BLASIUS, R. REPGES und M. K. SCHAFÉ, Z. Biol. 117, 248 (1966).

<sup>14</sup> G. MERKER, Z. Zellforsch. 95, 568 (1969).

<sup>15</sup> W. BLASIUS, Z. Biol. 104, 121 (1951).

## Depletion of Cerebral Monoamines by *p*-Chlorophenylalanine in the Cat

*p*-Chlorophenylalanine (*p*CPA) produces a long-lasting depletion of cerebral serotonin (5HT) in several species<sup>1-3</sup>. This effect is related to the inhibition of tryptophan hydroxylase<sup>4</sup>. However, the levels of catecholamines in the brain of rat<sup>1,5,6</sup> and mouse<sup>7</sup> are also affected after a single administration of relatively low doses of the drug. In addition, norepinephrine (NE) has been found to be markedly diminished in various brain areas of the dog after repeated administrations of *p*CPA<sup>1</sup>. In the cat, a single dose of *p*CPA (500 mg/kg i.p.) does not seem to induce any detectable depletion of cerebral catecholamines within 40 h after administration<sup>8</sup>.

Recently, the effect of catecholamines on pontogeniculo-occipital spikes induced by *p*CPA was studied in cats<sup>9</sup>. The biochemical findings reported in this investigation indicate that *p*CPA lowers not only the levels of 5HT but also those of the endogenous catecholamines in cat brain.

**Methods.** Cats of either sex weighing 2-2.5 kg were injected twice with 300 mg/kg of DL-*p*CPA (suspended in saline) i.p. with an interval of 24 h. The animals were killed with 100 mg/kg of nembutal i.p. at various time intervals after the first injection of *p*CPA (see Figure). The brains (without cerebellum) were cut into 2 parts (i.e. forebrain and brain stem) by a prepontine-intercollicular section. One hemisphere of the forebrain and the brain stem were analyzed for their amine content. NE and dopamine (DA) were extracted according to the procedure of ANTON and SAYRE<sup>10</sup> with minor modification (using 2M Tris solution for pH adjustment) and measured spectrophotometrically as described by LAVERTY and TAYLOR<sup>11</sup>. 5HT was extracted by the method of BOGDANSKI et al.<sup>12</sup> and determined according to SNYDER et al.<sup>13</sup>. Saline-treated cats served as controls.

**Results.** The time course of *p*CPA-induced changes of monoamine levels in the two parts of cat brain is shown in the Figure. In the brain stem, 5HT depletion was almost maximal (reduction to 40% of controls) within 48 h, whereas in the forebrain, a significant decrease (to 60% of controls) was not observed before the 80th h after the first administration of the drug. In the latter brain part, 72 h after the first injection the 5HT content was slightly elevated over the control values.

<sup>1</sup> B. K. KOE and A. WEISSMAN, J. Pharmac. exp. Ther. 154, 499 (1966).

<sup>2</sup> W. P. KOELLA, A. FELDSTEIN and J. S. CZICMAN, Electroenceph. clin. Neurophysiol. 25, 481 (1968).

<sup>3</sup> E. D. WEITZMAN, M. M. RAPPORTE, P. McGREGOR and J. JACOBY, Science 160, 1361 (1968).

<sup>4</sup> E. JÉQUIER, W. LOVENBERG and A. SJOERDSMA, Molec. Pharmac. 3, 274 (1967).

<sup>5</sup> E. G. MCGEER, D. A. V. PETERS and P. L. MCGEER, Life Sci. 7, 605 (1968).

<sup>6</sup> F. P. MILLER, R. H. COX, W. R. SNODGRASS and R. P. MAICKEL, Biochem. Pharmac. 19, 435 (1970).

<sup>7</sup> A. S. WELCH and B. L. WELCH, Biochem. Pharmac. 17, 699 (1968).

<sup>8</sup> J.-F. PUJOL, A. BUGUET, J.-L. FROMENT, B. JONES and M. JOUVENT, Brain Res. 29, 195 (1971).

<sup>9</sup> M. JALFRE, M.-A. MONACHON, H. H. KELLER and W. HAEFELY, First International Congress of the Association for the Psychophysiological Study of Sleep, Bruges (Belgium) 1971, in press.

<sup>10</sup> A. ANTON and D. F. SAYRE, J. Pharmac. exp. Ther. 138, 360 (1962).

<sup>11</sup> R. LAVERTY and K. M. TAYLOR, Analyt. Biochem. 22, 269 (1968).

<sup>12</sup> D. F. BOGDANSKI, A. PLETSCHER, B. B. BRODIE and S. UDENFRIEND, J. Pharmac. exp. Ther. 117, 82 (1956).

<sup>13</sup> S. SNYDER, J. AXELROD and M. ZWEIG, Biochem. Pharmac. 14, 831 (1965).