

conditions. In preliminary experiments using perchloric acid extraction³², about 6% of the isotope was associated with acid insoluble material in cultures incubated with [³H]-glycine ($10^{-5} M$, 15 min). It is therefore possible that protein-bound glycine may contribute to the autoradiographic pattern, although only to a limited extent.

It has previously been speculated that the uptake of GABA and glycine as revealed in autoradiographic studies may occur in those neurones utilizing these amino acids as neurotransmitters¹⁻⁹. Although the neuronal uptake of these amino acids clearly occurs only in a limited number of neurones of the explant – indicating specificity of the uptake mechanisms – it is at present not possible to decide whether glycine and GABA are taken up in the same or in separate neurone populations. The studies of IVERSEN and BLOOM⁷ on spinal cord homogenates, however, show that the two amino acids are selectively taken up in separate nerve endings. These data would thus favour the view of two spinal cord neurone populations, each characterized by a different inhibitory amino acid transmitter. These two neurone populations could thus represent the morphological correlate to spinal inhibitory neurones postulated in neurophysiological studies^{21, 22, 26, 33}.

Uptake of amino acid neurotransmitters into glial cells has previously been demonstrated with autoradiography^{2, 3, 5, 10, 34, 35}, and it is also evident from the present results. The intense labelling of glial cells may indicate an efficient uptake mechanism, which could be of physiological importance for the transmitter inactivation³⁶.

Zusammenfassung. Autoradiographische Untersuchungen haben gezeigt, dass ³H-Glycin und ³H-GABA in kultivierte Neurone und Gliazellen des Rückenmarks der Ratte aufgenommen werden. Aus unseren licht- und elektronenmikroskopischen Befunden geht hervor, dass die Nervengewebekultur ein geeignetes Versuchsmodell für Aufnahme und zelluläre Lokalisation von Überträger-substanzen ist.

E. HÖSLI, Å. LJUNDAHL,
T. HÖKFELT and L. HÖSLI

*Department of Neurophysiology,
Neurological Clinic of the University of Basel,
CH-4051 Basel (Switzerland); and
Department of Histology, Karolinska Institutet,
S-104 01 Stockholm 60 (Sweden),
22 August 1972.*

³² We would like to thank Dr. H. P. von HAHN and Miss V. STEINMANN for carrying out the perchloric acid extractions.

³³ L. HÖSLI, P. F. ANDRÈS and E. HÖSLI, *Brain Res.* **34**, 399 (1971).

³⁴ I. R. FAEDER and M. M. SALPETER, *J. Cell Biol.* **46**, 300 (1970).

³⁵ P. M. ORKAND and E. A. KRAVITZ, *J. Cell Biol.* **49**, 75 (1971).

³⁶ Acknowledgments: This study was supported by grants No. B 72-14 X-2887-3 B and No. B 72-14 P-3662-02 B) from the Swedish Medical Research Council and by grants from Karolinska Institutets Forskningsfonder, Ollie och Elof Ericssons Stiftelse, Stiftelsen Margaretha hemmet and from Magn. Bergvalls Stiftelse. The skillful technical assistance of Mrs. W. HIORT and Miss A.-C. SWENSON is gratefully acknowledged.

Zur Feinstruktur früher Veränderungen an Rattenhirngewebe nach Injektion von Methylnitrosoharnstoff

Bestimmte N-Nitrosoverbindungen erzeugen nach Untersuchungen von DRUCKREY et al.^{1, 2} und JÄNISCH et al.³ bei wiederholter Applikation Tumoren des Zentralnervensystems von Versuchstieren. Obwohl umfangreiche Untersuchungen an solchen experimentellen Geschwülsten vorliegen, wurde bisher noch nicht über präblastomatöse Veränderungen am Gehirn nach Einwirkung neurotroper Resorptivkanzerogene berichtet. Degenerative Veränderungen an perivaskulären Zellen und an Gliazellen, die innerhalb 24 h nach Applikationen einer einmaligen hohen Dosis Äthylnitrosoharnstoff auftraten, beobachtete LANTOS⁴. Wir haben mit Hilfe einer geeigneten Präparationsmethode Veränderungen an Rattengehirnen nach wiederholter Applikation von Methylnitrosoharnstoff (MNH) untersucht und berichten über erste Ergebnisse.

Material und Methode. 130–150 g schweren Wistaratten wurden in 4wöchigem Abstand 30 mg/kg Körpergewicht MNH i.p. injiziert. 12 Tage nach der ersten Injektion sowie 8 und 14 Tage nach der zweiten Injektion Perfusionsfixation des Gehirns, Einbettung von drei ca. 2 mm dicken Frontalscheiben des ganzen Gehirns je Versuchstier in Epon, dreidimensionale Zielpräparation mit Anfertigung von lichtmikroskopischen Übersichtsschnitten, Semidünnsschnitten und Ultradünnsschnitten (DIETZ und WIEGAND⁵).

Befunde. 12 Tage nach der ersten Injektion sowie 8 und 14 Tage nach der zweiten Injektion von MNH finden sich lichtmikroskopisch erkennbare perivaskuläre Zellproliferationen (Figur 1, Inset). Gehirne von Kontrolltieren, die nach der gleichen Methode präpariert wurden, zeigen keine derartigen Veränderungen. Elektronenmikroskopisch lassen sich die proliferierenden Zellen als Adventitiellen kleiner Gefäße identifizieren (Figur 1). Sie sind

gegen die Gefäßendothelen durch eine Basalmembran abgegrenzt. Der perivaskuläre Raum ist erweitert und in der ganzen Zirkumferenz der Gefäße von proliferierenden Adventitiellen ausfüllt. Durch eine zweite äussere Basalmembran wird er gegen die erheblich geschwollenen perivaskulären Astrozytenfortsätze begrenzt. Bei den nach der zweiten Injektion untersuchten Tieren finden sich Lücken in dieser äusseren Basalmembran (Figur 2). Adventitiellen, welche offenbar durch solche Basalmembranlücken in den Bereich des Hirngewebes gelangen, zeigen die gleiche Proliferationstendenz wie die Zellen im perivaskulären Raum. Sie breiten sich unter Verdrängung der Hirngewebsstrukturen konzentrisch um die Gefäße aus, besitzen aber keine insbesondere gegen das Neuropil abgrenzende Basalmembran mehr. Der Grundcharakter der Zellen im perivaskulären Raum und in der Peripherie der Proliferationsherde unterscheidet sich nicht. Von Einzelzelle zu Einzelzelle finden sich jedoch beträchtliche Variationen des Organellengehaltes des Zytosplasmas. Die Mehrzahl der Zellen mit langgestreckten, vielfach untereinander verschlungenen Fortsätzen enthält wenig RER und Ribosomen und gelegentlich feine intrazytoplasmatische Filamente. Weiterhin findet man Zellen mit einem ausserordentlich hohen Ribosomengehalt, andere mit ei-

¹ H. DRUCKREY, S. IVANCOVIC und R. PREUSSMANN, *Naturwissenschaften* **51**, 144 (1964).

² H. DRUCKREY, S. IVANCOVIC und R. PREUSSMANN, *Z. Krebsforsch.* **66**, 389 (1965).

³ W. JÄNISCH, D. SCHREIBER, R. STENGEL und V. STEFFEN, *Exp. Path.* **1**, 243 (1967).

⁴ P. L. LANTOS, *Experientia* **27**, 1322 (1971).

⁵ W. DIETZ und K. WIEGAND, *Zentbl. allg. Path.* **115**, 22 (1972).

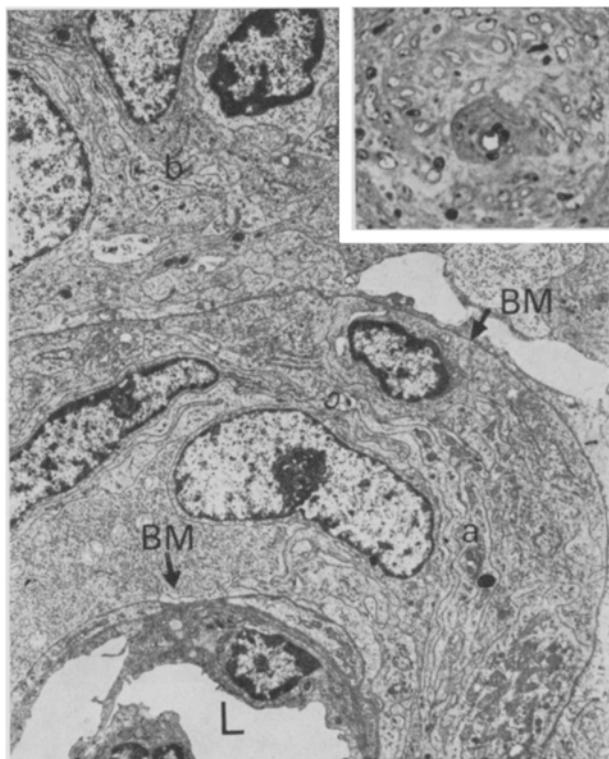


Fig. 1. Gefäss (L) mit Adventitiazellproliferation innerhalb (a) und ausserhalb (b) des perivaskulären Raumes. Basalmembran (BM). $\times 4000$. Inset: Proliferationsherd im Semidünnsschnitt. $\times 300$.

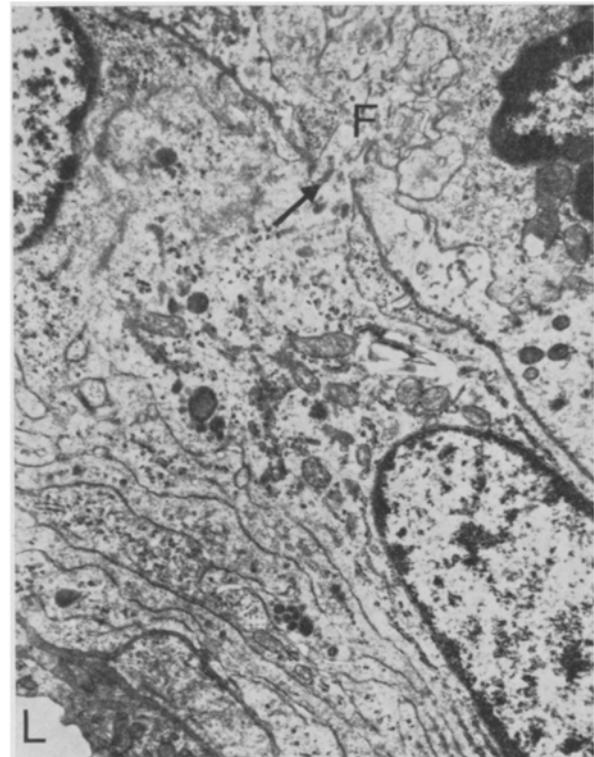


Fig. 2. Basalmembranlücke (↑) mit hindurchtretenden Adventitiazellfortsätzen (F). Gefässlumen (L). $\times 11000$.

nem ausgedehnten glatten ER und wieder andere mit auffällig parallel angeordneten, ribosomenreichen Membranen des RER. Die Zellkerne zeigen ebenfalls stärkere Formabweichungen. Das Chromatin ist nahe der Kernmembran angehäuft oder unregelmässig – schollig über das Karyoplasma verteilt. Sogenannte Sphaeridien (BÜTTNER und HORSTMANN⁶) finden sich in auffallend grosser Zahl in den Zellkernen.

Diskussion. Mit den beschriebenen Befunden vergleichbare proliferative Veränderungen des perivaskulären Mesenchyms des Hirngewebes sind uns weder aus der menschlichen Pathologie noch von tierexperimentellen Untersuchungen mit nicht kanzerogenen Stoffen bekannt. Auch nach Applikation von neurotropen Kanzerogenen liegen zu dem von uns untersuchten Zeitraum keine Befunde vor. Ähnliche lichtmikroskopisch beobachtete perivaskuläre Zellproliferationen fanden JÄNISCH et al.⁷ nach Ablauf der Tumorlatenzzeit bei MNU-Applikation neben voll ausgebildeten Tumoren des Gehirns und bezeichneten sie als Frühstadien intrazerebraler Sarkome.

HARD und BUTLER⁸ beobachteten nach einmaliger Injektion einer hohen Dosis Dimethylnitrosoharnstoff frühzeitig auftretende proliferative Veränderungen an mesenchymalen Zellen des Interstitiums der Nieren. Im Gegensatz zu unseren Befunden stehen dabei jedoch Wucherungen von Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen im Vordergrund.

Die Feinstruktur der von uns beobachteten proliferierenden Zellen zeigt, ebenso wie bei bisherigen Untersuchungen während der Kanzerogenese an anderen Organen, insbesondere der Leber (SVOBODA und HIGGINSON⁹; FLAKS¹⁰ und andere), keine mit Sicherheit für die Kanzerogenese charakteristischen Einzelmerkmale. Einige der mehrfach als bedingt spezifisch angesehenen Zytosplasmaveränderungen, wie die Ablösung der Ribosomen

vom RER und die Vermehrung des glatten ER in den Zellen, sind bei uns nebeneinander zu beobachten.

Versucht man jedoch die verschiedenen beobachteten Faktoren, wie die unterschiedliche Differenzierung der zytoplasmatischen Strukturen von Zellen gleicher Herkunft, die Gestaltvariationen der Zellkerne, die Proliferationstendenz der Zellen mit Neigung zum Durchdringen der Basalmembran und zur expansiven Ausbreitung im Hirngewebe, im Zusammenhang zu betrachten, so liegt die Annahme nahe, dass es sich um tiefgreifende, über die Reaktion auf eine toxische Zellschädigung hinausgehende, also um für die Reaktion des perivaskulären Mesenchyms des Gehirns auf das Kanzerogen Methylnitrosoharnstoff spezifische Veränderungen handelt.

Summary. Focal proliferations of adventitial cells of small blood vessels in the rat brain were found within 6 weeks after i.p. injection of methyl-nitroso-urea. The results of electron microscopic examination suggest the preneoplastic nature of the changes.

A. LAGEMAN und W. DIETZ¹¹

Pathologisches Institut der Medizinischen Akademie Erfurt, Nordhäuserstrasse 74, DDR-50 Erfurt (DDR), 12. April 1972.

⁶ D. W. BÜTTNER und E. HORSTMANN, Z. Zellforsch. 77, 589 (1967).

⁷ W. JÄNISCH, D. SCHREIBER, R. WARZOK und G. OSSKE, Expl. Path. 4, 60 (1970).

⁸ G. C. HARD und W. H. BUTLER, Cancer Res. 31, 337 (1971).

⁹ D. SVOBODA und J. HIGGINSON, Cancer Res. 28, 1703 (1968).

¹⁰ B. FLAKS, Chem. biol. interact. 2, 129 (1970).

¹¹ Frau K. WIEGAND danken wir für wertvolle technische Mitarbeit.