

In this work, we have studied the early detection of cell damage by supravital acridine orange staining. The cell damage was caused by injecting 0.25 µg of vincristine (Eli Lilly and Co., Indianapolis, Ind., USA) intratesticularly in the rat. This drug causes an arrest of the cells in metaphase during the meiotic divisions, which is followed by a progressive degeneration and death of these cells. The rat was killed by a blow on the head 24 h after the injection and the seminiferous tubules of the testis were dissected free from the interstitial tissue³. The isolated tubules were observed under transmitted light in a preparation microscope. The different stages of the seminiferous epithelium containing constant accurately known cell associations⁴ absorb light in a different way, permitting the identification of individual stages^{5,6}. The stages XIV and I containing the meiotic and early postmeiotic cells were identified and a 1–2 mm long segment was cut and placed on a microscope glass slide together with a few drops of 0.9% NaCl with AO (0.1 mg/ml). A cover-glass was placed on the specimen and the cells were allowed to squeeze out of the tubulus so that a monolayer was formed. The observations were done with an Olympus Vanox microscope, permitting successive phase contrast and fluorescence observations of the same field.

From previous studies, it is known that the death of the spermatogenic cells can be rapidly detected because of the increased negative phase change⁷. The results in this study show that by using AO fluorescence it is possible to detect cell damage much earlier than by phase contrast optics or by conventional histological methods. Figure 1 shows the phase contrast appearance of early postmeiotic cells from the testis treated for 24 h with 0.25 µg of vincristine. The AO fluorescence of the same cells is seen in figure 2. The nuclei of living cells are characterized by a green fluorescence typical to double helical DNA (cells a and b), whereas with progressive cell damage the red fluorescence of the cell nuclei increases (cells c, d and f).

The red fluorescence appears in the damaged cells before any morphological changes or increase in the negative phase contrast can be observed (cell d).

The change in the AO fluorescence during cell death could be explained by the occurrence of a change in the secondary structure of the DNA. During the cell degeneration, the double stranded DNA could be split into pieces of single stranded DNA molecules which would result in a changed AO binding with a red fluorescence. The appearance of the red fluorescence in the cells before morphological or phase contrast changes can be seen indicates that the damage of DNA is a very early phenomenon in the mechanism of this type of cell death.

That the change in the AO fluorescence is a general phenomenon and not specific to cell death caused by vincristine was shown by studies in which cell death was caused by chryptorchism. In the dying cells the same red fluorescence could be observed. It is also known that an increased concentration of AO causes the appearance of a red fluorescence². The red fluorescence in this study was, however, not caused by a concentration effect because cells which were localized closely together showed quite a different fluorescence (figure 2).

This technique for the early detection of cell damage might have important practical applications, while it also gives new information about the order of events in the process of cell death.

3 A. K. Christensen and N. R. Mason, *Endocrinology* 76, 646 (1965).

4 C. P. Leblond and Y. Clermont, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 55, 548 (1952).

5 M. Paarvinen and T. Vanha-Perttula, *Anat. Rec.* 174, 435 (1972).

6 K.-O. Söderström and M. Parvinen, *Mol. Cell Endocr.* 5, 181 (1976).

7 M. Parvinen, *Virchows Arch.* 13, 38 (1973).

Etude cytofluorométrique et histoautoradiographique de la synthèse d'ADN et de protéines sur des cellules mésothéliales humaines

Cytofluorometric and histoautoradiographic study on DNA and protein synthesis of human mesothelial cells

V. Gotzos, B. Cappelli-Gotzos et R. Bovet

Institut d'Histologie et d'Embryologie générale de l'Université, CH-1700 Fribourg (Suisse), 12 juillet 1976

Summary. The study of nuclear DNA synthesis of human mesothelial cells showed that cells do not divide by mitosis, even if an important percentage of them have a tetraploid amount of DNA. Concerning the cell cycle of mesothelial cells, the authors conclude that some of them are blocked in postsynthesis.

Le problème de la multiplication des cellules mésothéliales dans la cavité péritonéale n'est pas encore entièrement élucidé¹. Différents auteurs^{2,3} ont observé, sur frottis, des cellules en mitose. Il a aussi été décrit⁴ que dans certains cas, tel qu'une ascite d'origine cirrhotique, les cellules mésothéliales présentent une plus forte activité mitotique.

Pour ce travail, nous avons prélevé du liquide ascitique humain chez 6 patients porteurs d'une cirrhose alcoolique. Sur les frottis, tirés du culot après centrifugation du liquide à 1000 tours/min pendant 10 min et fixés avec de l'alcool-acétone (1:1), nous avons effectué les réactions

suivantes: BAO (bis-amino phényl-oxadizole) pour les mesures quantitatives d'ADN⁵; sulfaflavine à pH 2,8 pour les protéines totales⁶ et à pH 8,2 pour les protéines-histones⁶; isothiocyante de fluorescéine pour les protéines totales⁷. On a aussi étudié la synthèse d'ADN des cellules prélevées du même culot de centrifugation et maintenues en suspension dans un milieu nutritif (90% 199-Difco, 10% sérum de veau) contenant 0,5 µCi/ml de Thymidine-³H (Th-³H, activité spécifique: 5000 mCi/mmol) pendant 30, 60, 120 min et 12 h à 37°C. Après l'incubation, nous avons procédé à l'histoautoradiographie des frottis d'après la méthode décrite par Bogoroch⁸.

McGowan et al.⁹ ont groupé les cellules mésothéliales se trouvant dans le liquide péritonéal en trois types: les petites, les moyennes et les grandes ou «hypertrophiques». Cette classification est basée sur les modifications morphologiques que subissent les cellules dans le liquide de la cavité péritonéale. Nous avons mesuré les teneurs en ADN des 3 types séparément après réaction au BAO. La valeur diploïde de l'espèce (30 ± 1 u.a.) a été déterminée sur les leucocytes des mêmes lames que les cellules mésothéliales. Comme on peut le constater (figure 1), les cellules mésothéliales petites possèdent une teneur en ADN se situant autour de la valeur diploïde. Parmi les moyennes, on distingue des cellules avec valeur diploïde, une partie importante avec valeur tétraploïde et un faible pourcentage avec des valeurs nettement supérieures (cellules polyploïdes). Les cellules mésothéliales grandes sont situées autour de la valeur diploïde, quelques-unes vers la valeur tétraploïde; un pourcentage élevé des

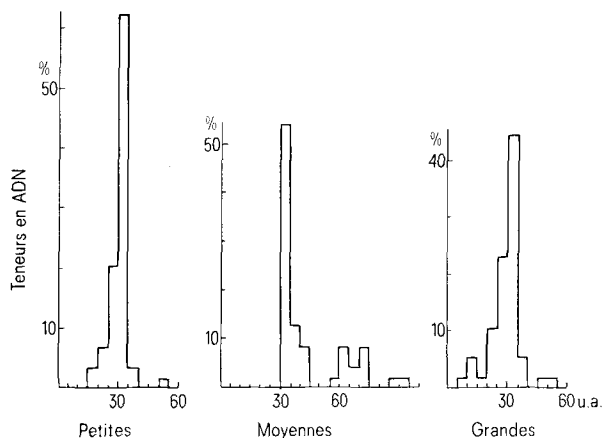


Fig. 1. Teneurs en ADN des cellules mésothéliales petites, moyennes et grandes déterminées par cytofluorométrie après réaction au BAO. Pour chaque histogramme en ordonnée le pour-cent des cellules, en abscisse les teneurs en ADN exprimées en unités arbitraires (u.a.).

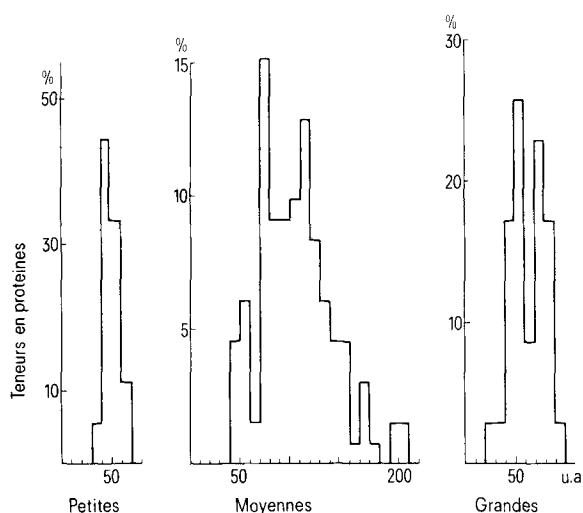


Fig. 2. Teneurs en protéines totales, déterminées par cytofluorométrie après réaction à la sulfaflavine à pH 2,8, des cellules mésothéliales petites, moyennes et grandes. Pour chaque histogramme en ordonnée le pour-cent des cellules, en abscisse les teneurs en protéines en unités arbitraires (u.a.).

grandes cellules se trouve à gauche de la valeur diploïde. L'index mitotique (I.M.), calculé sur plus de 20 000 cellules, est nul pour les 3 types cellulaires.

En ce qui concerne le contenu en protéines totales, après réaction à la sulfaflavine à pH 2,8 et à l'isothiocyanate de fluorescéine, nous avons obtenu des résultats superposables. Comme on peut le constater dans la figure 2, les teneurs en protéines des cellules petites et grandes sont situées entre 20 et 100 u.a.; celles des cellules moyennes dépassent nettement 100 pour atteindre jusqu'à 200 u.a. Ces mesures montrent donc que les cellules moyennes sont plus riches en protéines que les petites et les grandes.

Les résultats des dosages des histones de la cellule entière, effectués uniquement sur les cellules mésothéliales moyennes, sont rapportés dans la figure 3. L'histogramme nous montre qu'il existe un pic très important de cellules situées autour de la valeur 14 (u.a.) suivi par un plateau qui arrive jusqu'au double (28 u.a.) de la valeur du premier pic. En plus il existe des cellules qui contiennent des teneurs en histones beaucoup plus élevées.

L'histoautoradiographie après incorporation de Th-³H nous a montré que jusqu'à 120 min d'incubation il n'y a pas de synthèse nucléaire d'ADN. Après 12 h un très faible pourcentage de moyennes (0,8-1,0%) et de grandes cellules (0,2%) est marqué. Il est à relever qu'un grand pourcentage de toutes les cellules mésothéliales, parfois jusqu'à 50%, montrent une synthèse cytoplasmique d'ADN.

Les résultats de ce travail s'opposent à ceux obtenus par d'autres auteurs qui admettent une activité mitotique des cellules mésothéliales dans le liquide ascitique et surtout la possibilité que dans la cirrhose alcoolique cette

- 1 M. Chèvremont, dans: Cytologie et histologie, vol. II, p. 643. Desoer, Liège 1966.
- 2 Y. T. Chang, J. Nat. Cancer Inst. 32, 19 (1964).
- 3 A. Bakalos, N. Constantakis et Th. Tsicricas, Acta cytol. 18, 118 (1974).
- 4 A. Spriggs, dans: The Cytology of Effusions. William Heinemann, London 1957.
- 5 F. Ruch, dans: Introduction to Quantitative Cytochemistry, vol. II, p. 443. Ed. G. L. Wied and G. F. Bahr. Acad. Press, London 1970.
- 6 U. Leemann et F. Ruch, J. Histochem. Cytochem. 20, 659 (1972).
- 7 H. A. Crissmann and J. A. Steinkamp, J. Cell Biol. 59, 766 (1973).
- 8 R. Bogoroch, dans: Autoradiography for Biologists, p. 65. Ed. P. B. Gahan Acad. Press, London 1972.
- 9 L. McGowan et B. Bunnag, Acta cytol. 18, 205 (1974).

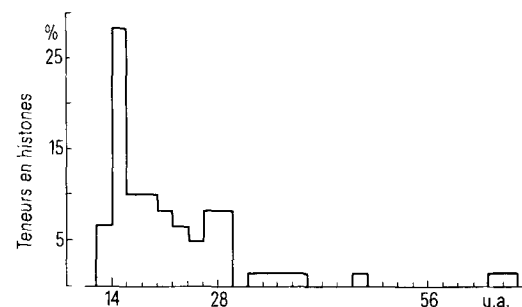


Fig. 3. Teneurs en histones déterminées par cytofluorométrie après réaction à la sulfaflavine à pH 8,2 des cellules mésothéliales moyennes. En ordonnée le pour-cent des cellules, en abscisse les teneurs en histones en unités arbitraires (u.a.).

activité puisse être augmentée. Puisque l'I.M. de nos cellules est nul, l'important pourcentage de cellules tétraploïdes que nous trouvons dans nos histogrammes (cellules mésothéliales moyennes) ne peut pas exprimer une intense prolifération cellulaire par mitose. Nous pensons donc qu'il s'agit là d'un blocage des cellules en post-synthèse ou G₂.

Au point de vue de l'ADN, nos résultats nous permettent de penser qu'au moment du prélèvement les petites cellules mésothéliales se trouvent en période de «repos» (R₁, diploïdes en ADN). Les cellules mésothéliales moyennes doublent leur ADN (synthèse d'ADN) mais ne peuvent pas entrer en mitose. Certaines d'entre elles stationnent en période de «repos» (R₂, tétraploïdes en ADN) pendant un laps de temps plus ou moins long; d'autres peuvent de nouveau entrer en synthèse pour former des cellules hypertétraploïdes (voir histogrammes, figure 1). Pour les grandes cellules mésothéliales, un pourcentage assez important subit des processus dégénératifs (picnose nucléaire, vacuolisation du cytoplasme) et se situe dans l'histogramme à gauche de la valeur diploïde comme il fallait s'y attendre. Il existe, également pour ces cellules, un pourcentage qui peut doubler son ADN (incorporation de la Th-³H) et se trouver en post-synthèse ou G₂. Comme les moyennes, ces cellules ne peuvent pas entrer en mitose

et stationnent, peut-être pendant une période moins longue, en période de «repos» (R₂, tétraploïdes en ADN). Les histogrammes du contenu en protéines (figure 2) des cellules moyennes et grandes ont la même allure: ils présentent en effet 2 pics distincts correspondant à des valeurs simples (2p) et doubles (4p). Les petites cellules mésothéliales sont toutes groupées autour d'un pic. Ces résultats s'accordent avec ceux obtenus pour le contenu en ADN des mêmes cellules, puisque là aussi nous avons pour les cellules moyennes et grandes des valeurs diploïdes et tétraploïdes et pour les petites uniquement des valeurs diploïdes.

Si l'on juge l'histogramme (figure 3) d'après la répartition du contenu en histones des cellules mésothéliales moyennes; on s'aperçoit que (comme il a été démontré pour d'autres cellules¹⁰) ce contenu est en rapport avec les teneurs en ADN et en protéines totales des mêmes cellules. En effet il existe un pourcentage de cellules avec un contenu en histones double, et plus, de celui des cellules du premier pic du même histogramme. Par conséquent on peut admettre que les cellules tétraploïdes en ADN contiennent le double d'histones par rapport aux cellules diploïdes.

10 R. Bassleer et M. Chèvremont, Bull. Ass. Anat. 57, n° 159 (1973).

Demonstration of a tryptaminergic mechanism in the rat β -cell¹

Olga Pulido, A. de Bold, M. de Bold and S. Bencosme

Department of Pathology, Queen's University and Kingston General Hospital, Kingston (Ontario, Canada K7L 3N6), 12 May 1976

Summary. Yellow 5-HT fluorescence has been histochemically demonstrated in rat pancreatic islet cells in animals injected with L-5-HTP with or without pretreatment with the monoaminooxidase inhibitor nialamide. This fluorescence was not observed after inhibition of the aromatic amino acid decarboxylase. The results strongly suggest the presence of a tryptaminergic mechanism in the rat islet cells.

The presence of some of the biogenic amines within pancreatic islet cells in several species is now well established²⁻⁴. However, great species differences appear to exist regarding the nature, location and relative concentration of these amines as well as with regard to the methodology required for their demonstration^{3,4}. Serotonin (5-HT) has been demonstrated in pancreatic islets of mice both by histochemistry and autoradiography after the administration of L-5-hydroxytryptophan (L-5-HTP)^{2,5-7}. In the rat, however, the presence of tryptaminergic mechanism in the pancreatic islets is an unsettled question. Cegrell³ has mentioned that after treatment with L-5-HTP, serotonin can be demonstrated histochemically in this species. In contrast, Gagliardino et al.⁸ were unable to find any histochemically demonstrable 5-HT in pancreatic islets of rats after administration of tryptophan by gastric tube. From this study, the above authors concluded that rat islet cells do not contain tryptaminergic mechanism. In the present work, we have investigated the question of whether or not serotonin is present in rat pancreatic islet as revealed by fluorescence histochemistry.

Materials and methods. Sprague-Dawley male albino rats, weighing approximately 400 g were employed. The animals were divided into 5 experimental groups of 6 rats each; the different substances used were administered intraperitoneally. The time intervals between injections in all groups were the same as described below for the first group and the doses for each given substance were constant.

Group 1: Received nialamide (5 mg/kg BW) a monoaminooxidase inhibitor, followed at 60 min by L-5-HTP (100 mg/kg BW).

Group 2: Saline and L-5-HTP.

Group 3: Nialamide and saline.

Group 4: As group 1 but prior to nialamide, the animals received RO 4-4602 (100 mg/kg BW) an aromatic amino acid decarboxylase inhibitor.

Group 5: RO 4-4602 and L-5-HTP.

For each of the groups above 2 animals were injected with saline alone following the same schedules used for the experimental groups. 2 hours after the first injection all animals were anesthetized with Na amytal® (100 mg/kg BW) and pieces of pancreas were taken and frozen in isopentane/liquid nitrogen, freeze-dried, and treated according to the formaldehyde condensation technique for the demonstration of 5-HT⁹. Pancreas from treated and control animals were processed at the same time and studied using a fluorescence microscope equipped with an exciting filter BG3-S405 and barrier filter K460. This combination of filters gives a blue fluorescence on catecholamines and yellow fluorescence for 5-HT.

Chemicals. L-5-HTP and nialamide were obtained from Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo. 63178, USA, and RO 4-4602 was a gift from Hoffmann-La Roche Limitee, Vaudreuil, Quebec, Canada.

Results. Pancreatic tissue from saline injected animals and from those which received nialamide alone failed to show any fluorescence within the islet cells or the acinar pancreas. Treatment with both L-5-HTP or nialamide and