

Cyclic AMP in neuroblastoma, ganglioneuroma and sympathetic ganglia

S. Imashuku, S. Todo, T. Amano, K. Mizukawa, T. Sugimoto and T. Kusunoki

Department of Pediatrics, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kawaramachi, Kamikyo-Ku, Kyoto (Japan),
5 April 1977

Summary. Tissue content of cyclic AMP was as much as 10 times greater in ganglioneuroma than in neuroblastoma. This high cyclic AMP in ganglioneuroma was not significantly different from that of sympathetic ganglia.

The differentiation of neuroblastoma has been reported, both clinically and in vitro¹⁻⁴. An elevation of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (cyclic AMP) has been confirmed to induce irreversibly several differentiated functions in cultured murine or human neuroblastoma cells⁵. In addition, it has also been suggested that the transformation of neuroblastoma cells to ganglioneuroma may be mediated by cyclic AMP⁶. At present it would be of great interest to determine whether cyclic AMP is actually deficient in neuroblastoma, and if it is significantly high in ganglioneuroma. We have assayed tissue levels of cyclic AMP in 7 mouse neuroblastoma Cl300, 10 human neuroblastomas, 3 ganglioneuromas and 4 human sympathetic ganglia which we present in this report.

Mouse neuroblastoma, weighing average 2 g, which developed 2-3 weeks after inoculation of tumor cells, was dissected from the s.c. area. Human tumors were surgically obtained from patients and sympathetic ganglia, 3 lumbar and 1 thoracic, were obtained at sympathectomy of patients with Buerger's and other related disease. For cyclic AMP assay, portions of all tissues were promptly frozen in liquid nitrogen. Other portions were histologically studied.

Frozen tissue was homogenized in cold 6% trichloroacetic acid. After centrifugation, the supernatant was acidified with HCl, extracted with ether. The aqueous phase was lyophilized and then dissolved in 50 mM acetate buffer, pH 4.0. Cyclic AMP was determined by Gilman's method⁷ (Boehringer Mannheim GmbH Biochemica) and

the trichloroacetate precipitable protein was determined according to the Lowry procedure⁸. The values were presented as pmoles of cyclic AMP per mg of protein. As shown in the table, it was found that cyclic AMP in neuroblastoma tissues, either human or mouse, was significantly lower ($p < 0.005$) than that in ganglioneuroma or sympathetic ganglia. The high cyclic AMP in ganglioneuroma was not significantly different from that of sympathetic ganglia. Cyclic AMP was as much as 10 times greater in ganglioneuroma than in neuroblastoma.

These results indicate that neuroblastoma is a tumor with a relatively low level of cyclic AMP and again raises the question whether the correction of this condition would result in benign ganglioneuroma. Prasad et al.⁹ proposed the new therapeutic approach, which aims at raising cyclic AMP level in tumor cells for the treatment of neuroblastoma. It was reported by them and others⁶ that some agents, such as prostaglandin and/or phosphodiesterase inhibitor, were effective for that purpose. Our data provides a basis for such a therapeutic trial. A clinical evaluation of the effectiveness of the combined administration of PGE₁ and papaverine to patients with stage IV neuroblastoma is currently under study in our clinic.

Specimens	n	cAMP (pmoles/mg protein) Range	Mean \pm SD
Mouse neuroblastoma	7	0.8- 7.5	3.2 \pm 2.2
Human neuroblastoma	10	1.5-12.8	5.3 \pm 4.0
Human ganglioneuroma	3	28.5-54.5	39.9 \pm 10.8
Human sympathetic ganglia	4	17.8-42.8	32.3 \pm 9.1

- 1 H. Cushing and S. B. Wolbach, Am. J. Path. 3, 203 (1927).
- 2 R. L. Goldman, A. N. Winterling and C. C. Winterling, Cancer 18, 1510 (1965).
- 3 D. Schubert, S. Humphreys, C. Baroni and M. Cohn, Proc. nat. Acad. Sci. 64, 316 (1969).
- 4 K. N. Prasad, in: Differentiation and Control of Malignancy of Tumor Cells, p. 287. Ed. W. Nakahara. University of Tokyo Press, Tokyo 1973.
- 5 K. N. Prasad and S. Kumar, Cancer 36, 1338 (1975).
- 6 L. Helson, C. Helson, K. B. Lai and K. Pih, Proc. Am. Ass. Cancer Res. 15, 172 (1974).
- 7 A. G. Gilman, Proc. nat. Acad. Sci. 67, 305 (1970).
- 8 O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, J. biol. Chem. 193, 265 (1951).
- 9 K. N. Prasad, Differentiation 2, 367 (1974).

Elektronenmikroskopische Untersuchung am Übergangsepithel der Hausspitzmaus (*Crocidura russula*)¹

Ultrastructural study of the transitional epithelium of the common European white-toothed shrew (*Crocidura russula*)

G. Scheidegger und K. S. Ludwig

Anatomisches Institut der Universität Basel, Pestalozzistrasse 20, CH-4056 Basel (Schweiz), 4. April 1977

Summary. The structure of the transitional epithelium of the common European white-toothed shrew (*Crocidura russula*) was examined by ultrathin serial sections. The epithelium consists of basal, intermediate and superficial cells. Basal and intermediate cells remain in contact with the basal lamina, whereas superficial cells have no connexion with the basal lamina.

Die bisher am ultradünnen Einzelschnitt oder an lichtmikroskopischen Serienschnitten erhobenen Befunde zur Schichtigkeit beziehungsweise Reihigkeit des Übergangsepithels sind bis heute widersprüchlich²⁻⁴. Petry und Amon² beschreiben das Übergangsepithel allgemein als

- 1 Herrn Prof. P. Vogel, Lausanne, danken wir für die Überlassung von Hausspitzmäusen aus seiner Zucht.
- 2 G. Petry und H. Amon, Z. Zellforsch. 69, 587 (1966).
- 3 R. M. Hicks, Biol. Rev. 50, 215 (1975).
- 4 B. F. Martin, Ann. Histochim. 7/3, 51 (1962).

einschichtig, mehrreihig. Hicks³ gibt für die Ratte Mehrschichtigkeit an, während Martin⁴ beim Meerschweinchen eine reihige Anordnung der Basal- und Intermediärzellen beobachtet, bei den Deckzellen jedoch keine mit der Basalmembran in Verbindung stehende Cytoplasmaausläufer findet. Die unterschiedlichen Befunde dürften nicht zuletzt auf der Beurteilung ultradünner Einzelschnitte oder lichtmikroskopischer Schnittserien beruhen; es wird deshalb in der vorliegenden Arbeit am Beispiel der Hausspitzmaus gezeigt, dass mittels ultradünner Serienschnitte der topographische Verlauf bestimmter Zellen verfolgt und ein eventuell vorhandener Kontakt von Zellausläufern mit der Basallamina aufgezeigt werden kann.

Methodik. Gewebepräparate der kontrahierten (entleerten) Harnblase wurden in einem von uns modifizierten Gemisch nach Hirsch und Fedorko⁵ 1 h bei 0°C fixiert. Stammlösung A: 2,5%ige Glutaraldehydlösung in 0,1 M

s-Collidinpuffer (pH 7,15; 500 mOsm), Stammlösung B: 1%ige OsO₄-Lösung in 0,1 M s-Collidinpuffer (pH 7,12; 160 mOsm). Das Fixiergemisch wurde unmittelbar vor Gebrauch aus 1 Teil A und 2 Teilen B zusammengesetzt (pH 7,32; 270 mOsm). Nach Entwässerung über Äthanol wurde in Epon 812 eingebettet. Um möglichst grossflächige Epithelabschnitte unbehindert durch Trägernetzstege im Elektronenmikroskop beobachten zu können, wurden kommerzielle Kupfer-Objektträger mit 1 mm Lochdurchmesser verwendet und mit Pioloform F (Stockem⁶) befilmt. Schnittbänder von hellgelber Interferenzfarbe wurden in Abschnitte von 1 mm Länge unterteilt und diese mit einer Platinöse (Drahtdicke 0,1 mm) von 1,2 mm innerem Durchmesser auf die Objektträger übertragen. Nachkontrastierung erfolgte mit

5 J. G. Hirsch und M. A. Fedorko, *J. cell Biol.* 38, 629 (1968).

6 W. Stockem, *Mikroskopie* 26, 185 (1970).

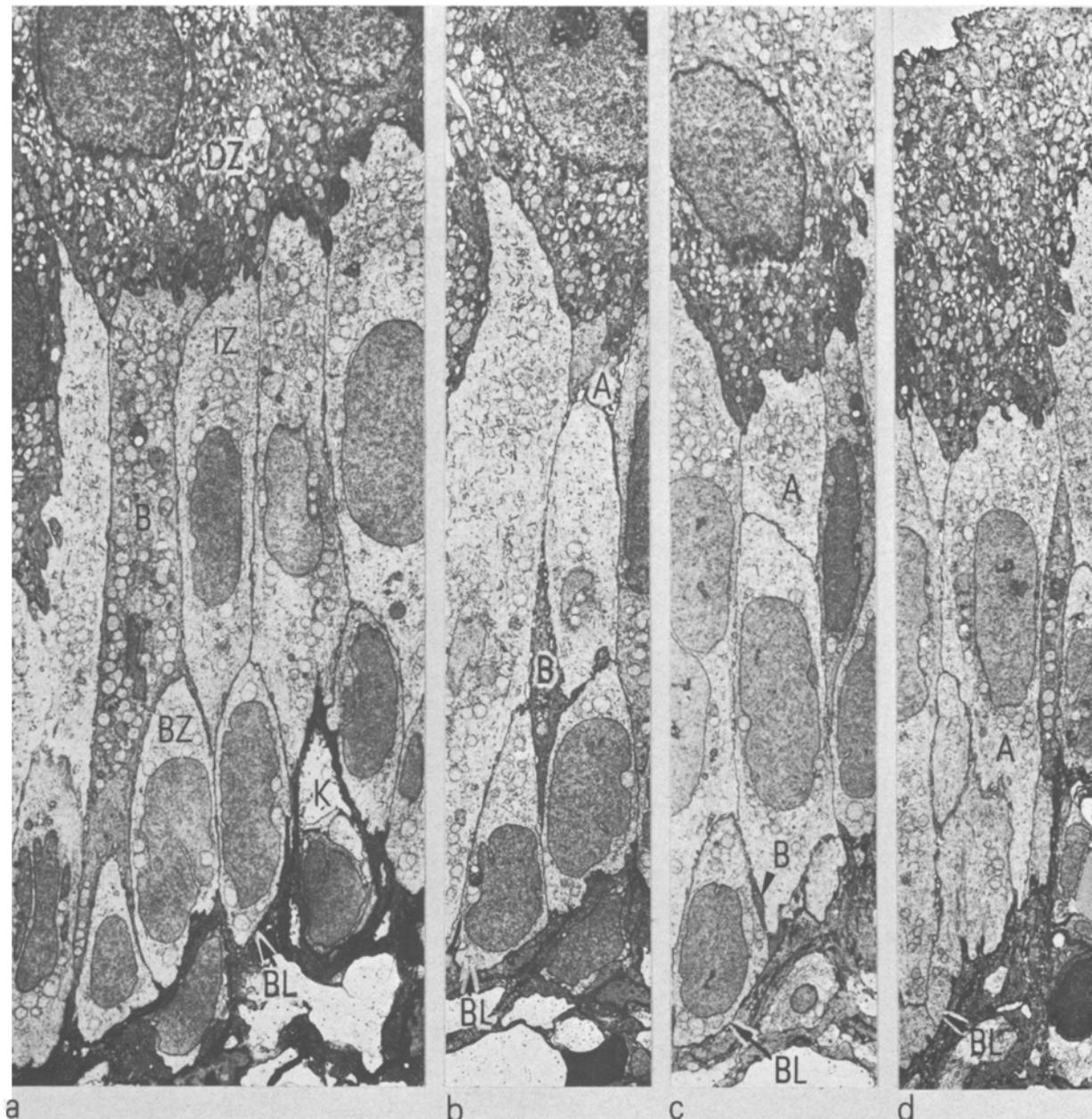


Abb. 1. a Übersicht. a-d Topografischer Verlauf zweier Intermediärzellen (A und B) anhand ausgewählter Serienschnitte, a Schnitt 42, b Schnitt 53, c Schnitt 72, d Schnitt 94. BZ, Basalzelle; IZ, Intermediärzelle; DZ, Deckzelle; BL, Basallamina; K, Kapillare. $\times 2500$.

Uranylacetat und Bleicitrat. Pro Block wurden Serien von rund 50 Objektträgern hergestellt und die gleiche Epithelstelle eines oder bei Bedarf mehrerer Schnitte jedes Objektträgers bei 1000facher Vergrößerung fotografiert. Damit können bei der Auswertung der Bilder mehrere Zellen gleichzeitig geprüft werden.

Befunde. Auf Grund der Position der Zellkerne lässt sich im Sinne einer topografischen Orientierung eine basale, eine intermediäre und eine superfizielle Zelllage unterscheiden (Abbildung 1,a). Basalzellen sind länglich-oval bis dreieckig geformt und liegen der Basallamina mit einer breiten Kontaktfläche an. Basallamina und anliegendes kollagenes Bindegewebe sind im kontrahierten Zustand (Harnblase entleert) unregelmäßig gefaltet. Intermediärzellen erscheinen im Anschnitt zylindrisch bis schlank pyramidenförmig. Über den topografischen Verlauf angeschnittener Zellen ist am Einzelschnitt keine verbindliche Aussage möglich; zumal kann nicht geklärt werden, ob und in welcher Anzahl Intermediärzellen mit der Basallamina in Verbindung stehen. Werden die Zellschnitte mittels Serienschnitten verfolgt, kann unschwer gezeigt werden, dass die Intermediärzellen durch zum Teil breite Cytoplasmatausläufer mit der Basallamina in Kontakt stehen (Abbildung 1,b, c und d: Zelle A). Auf manchen Einzelschnitten erscheinen im Bereich der Basal- und Intermediärzellen schmale Cytoplasmaprofile (Abbildung 1,b und c: Zelle B); sie können mittels Serienschnitten unzweifelhaft einer im

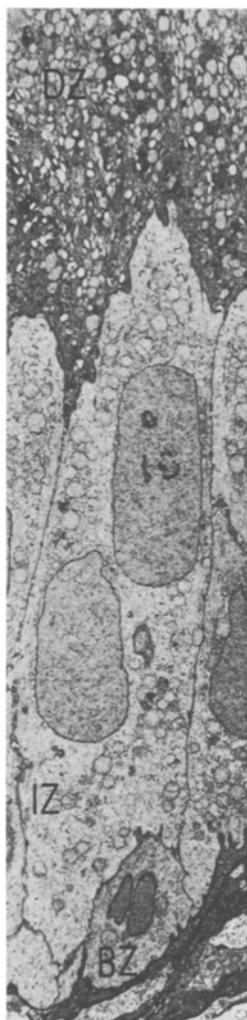


Abb. 2. Zweikernige Intermediärzelle (IZ) und Einzelschnittaspekt eines gelappten Kerns einer Basalzelle (BZ). $\times 2500$.

Basalbereich mehrfach verzweigten und mit der Basallamina in Verbindung stehenden Intermediärzelle zuordnet werden (Abbildung 1,a: Zelle B). Die superfizielles Zellen (= Deckzellen) nehmen bei der kontrahierten Harnblase im Durchschnitt $\frac{1}{3}$ der gesamten Epithelhöhe ein. In der Art einer Verzahnung reichen Deckzellausläufer zwischen Lücken der unregelmäßig strukturierten Apikalregion der Intermediärzellen bis höchstens zur Hälfte der Epithelhöhe basalwärts. In keinem Fall wurde eine Verbindung solcher Deckzellausläufer mit der Basallamina festgestellt.

Auffallend viele Zellkerne sind mehr oder weniger stark gelappt; die Kernmembran zeigt oft unregelmäßige Ein- und Ausbuchtungen oder Falten. Neben zweikernigen Deckzellen können immer auch zweikernige Intermediärzellen beobachtet werden (Abbildung 1,a: DZ; Abbildung 2: IZ). Gelegentlich erscheinen gewisse Zellen im Einzelbild als zweikernig, die Auswertung der Schnittserie zeigt jedoch, dass es sich dabei um Schnittaspekte stark eingeschränkter beziehungsweise gelappter Kerne handelt.

Diskussion. Die Auswertung ultradünner Serienschnitte erlaubt bei geeigneter Vergrößerung verbindliche Aussagen über die topografische Struktur eines Zellverbandes. Diesbezügliche Befunde aus lichtmikroskopischen Untersuchungen^{4,7} müssen mit Vorbbehalt aufgenommen werden, da auch Serien von sehr dünnen Eponschnitten mangels genügenden Auflösungsvermögens des Lichtmikroskops keinerlei Aussagen über den Verlauf des Plasmalemm einzelner Zellen und der Basallamina ermöglichen. Gleichfalls können anhand ultradünner Einzelschnitte nur Vermutungen über den weiteren Verlauf angeschnittener Zellen angestellt werden. Nur in seltenen Fällen kann, auch bei optimaler Schnittführung, eine Zelle in ihrer gesamten Längenausdehnung beobachtet werden.

Nach Petry und Amon² soll das Übergangsepithel, unter Berücksichtigung verschiedener Tiergattungen, ein einschichtiges, mehrreihiges Epithel sein. Insbesondere sollen die Deckzellen immer durch Cytoplasmatausläufer mit der Basallamina in Verbindung stehen. Hicks³ hat solche Zellausläufer beim Übergangsepithel des Menschen gesehen, nicht aber bei der Ratte. Nach dieser Autorin scheinen solche Unterschiede artspezifisch zu sein. Wir können nach eigenen Untersuchungen an Ratte, Hausschwein (unveröffentlicht) und nach den Befunden bei der Hausspitzmaus diese Aussage bestätigen. Bei letzterer Art zeigen außer den Basalzellen auch die Intermediärzellen deutliche, die Deckzellen jedoch keinerlei Verbindung zur Basallamina. Ein einheitliches Bauprinzip des Übergangsepithels im Sinne von Petry und Amon² dürfte damit ausgeschlossen werden; gleichfalls scheinen basale Deckzellausläufer, soweit sie bei gewissen Arten anzutreffen sind, keinerlei funktionelle Bedeutung als Verankerungspunkte bei Zellverlagerungen durch Dehnung (Füllung) und Kontraktion (Entleerung) der Harnblase zu haben.

Die teilweise starke Lappung und Faltung mancher Zellkerne kann einerseits als Oberflächenvergrößerung der Kernmembran gedeutet werden, andererseits dürfen einige dieser Kerne amitoseverdächtig sein⁸. Das Fehlen jeglicher Mitosefiguren und das Vorhandensein zweikerniger Intermediärzellen deutet auf amitotische Kernteilung ohne nachfolgende Cytoplasmateilung hin. Es ist nicht auszuschliessen, dass die vergleichsweise grossvolumigen zweikernigen Intermediärzellen im Zuge der Zellregeneration an die Epitheloberfläche gelangen und sich hier zu Deckzellen differenzieren.

7 B. F. Martin, J. Anat. 112, 433 (1972).

8 O. Bucher, in: Handb. allgem. Path. II/2, S. 626. Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1971.