

regulatory effects of some of these other putative transmitter substances because insufficient amounts were injected.

In a recent reinvestigation we have found that histamine has a distinct excitatory action on all 3 autonomic thermoregulatory effectors: respiratory frequency, peripheral vasoconstriction, and heat production by shivering⁸. Taurine, although only in very high doses, has yet another distinct set of effects: it inhibits all 3 autonomic thermoregulatory effector functions. We have now reinvestigated the thermoregulatory effects of L-glutamic acid at different ambient temperatures and report as follows.

Results. At 20°C T_a an intracerebroventricular (ICV) injection of 200 nmoles $\cdot$ kg⁻¹ caused vasoconstriction of the ears, a small depression of respiratory frequency (RF) and a rise in T_{re} . At dose levels of 800–1000 nmoles $\cdot$ kg⁻¹ these effects were greater. At 10°C T_a an ICV injection of 800–1000 nmoles $\cdot$ kg⁻¹ into the shorn sheep resulted in the rapid onset of visible shivering. At the same time there was an increase in oxygen consumption and a large rise in T_{re} . At 40°C T_a an ICV injection of 800–1000 nmoles $\cdot$ kg⁻¹ caused a fall in RF and, again, an increase in T_{re} .

As the table indicates the thermoregulatory effects of ICV injections of 800 nmoles $\cdot$ kg⁻¹ of L-glutamic acid are virtually the same as those previously recorded in response to an ICV injection of 3 nmoles $\cdot$ kg⁻¹ of carbachol, although they are of a shorter duration. As with carbachol⁹, the thermoregulatory effects were attenuated by a prior ICV injection of the muscarinic receptor-blocker, atropine sulphate in a dose of 20 nmoles $\cdot$ kg⁻¹.

Discussion. There is no clear evidence that glutamate functions in the brain as a true synaptic transmitter substance, although when applied iontophoretically to

cells in the CNS it has been reported¹⁰ to excite many of them irrespective of their responsiveness to other putative transmitter substances. In view of this alleged non-specific excitatory effect of glutamate, the patterned thermoregulatory effects of large doses of L-glutamic acid injected into the cerebral ventricles of the sheep were unexpected. There is no doubt about the classification of the observations reported here: glutamate has an effect identical to that of acetylcholine plus eserine, or of carbachol, similarly applied at much lower concentrations. Glutamate could be acting as a cholinomimetic on ACh-receptors or it could be stimulating, directly or indirectly, the cholinergic neurones on the pathway responsible for exciting heat production and inhibiting heat loss. Why, in these experiments, the excitatory action of glutamate should be confined to this one pathway is not clear.

- 1 We wish to thank Miss Jill Thexton for invaluable assistance.
- 2 J. Bligh, W. H. Cottle and M. Maskrey, *J. Physiol. (Lond.)* 212, 377 (1971).
- 3 J. Bligh, A. J. Tollerton and C. A. Smith, *Proc. Symp. Temperature Regulation*, Lille, in press (1977).
- 4 T. A. J. M. de Roij, J. Bligh, C. A. Smith and J. Frens, unpublished results.
- 5 I. R. Baumann, J. Bligh and C. A. Smith, in: *Drugs, Biogenic Amines and Body Temperature*, 3rd Symp. on Pharmacology of Thermoregulation, p. 34. Karger, Basel 1977.
- 6 M. D. Green, B. Cox and P. Lomax, *Neuropharmacology* 15, 321 (1976).
- 7 W. S. Harris and J. M. Lipton, *J. Physiol. (Lond.)* 266, 397 (1977).
- 8 J. Bligh, A. Silver and C. A. Smith, (unpublished results).
- 9 J. Bligh, A. Silver and C. A. Smith, *J. Physiol. (Lond.)* 266, 88 P (1977).
- 10 K. Krnjević, *Physiol. Rev.* 54, 418 (1974).

Études des variations quantitatives du passage de la ferritine au niveau de la membrane basale glomérulaire en fonction du temps et sous l'influence de la théophylline

Time and theophylline influence on the quantitative variations of the glomerular basement membrane ferritin pathway

J. Cambar et Ph. Gendre

Laboratoire de Pharmacodynamie U. E. R. des Sciences Pharmaceutiques, rue Leyteire, F-33 000 Bordeaux; et Centre de Microscopie Electronique, Faculté des Sciences, avenue de la Libération, F-33 000 Talence (France), 29 mars 1977

Summary. A fine quantitative evaluation of ferritin aggregates in rat GBM permits to counts 5.08 ± 1.51 and 18.30 ± 3.21 g/cm², respectively 30 and 60 min after ferritin injection; likewise, 30 min after ferritin administration, 5.08 ± 1.51 and 17.11 ± 3.9 g/cm², respectively in normal and theophylline-treated animals.

L'utilisation de nombreux traceurs protéiques a permis de mieux comprendre le cheminement des macromolécules au niveau des différents éléments structuraux du filtre glomérulaire, mais aucune théorie ne s'est encore imposée parmi les divers schémas proposés¹⁻³. Malgré les nombreux travaux réalisés dans ce domaine, aucun auteur n'a étudié quantitativement la répartition du traceur au sein des structures, comme le précise Karnovsky¹: «toute tentative de quantification est difficile et n'a guère été essayée».

Nous présentons une méthode de comptage qui permet de déterminer la densité des grains de ferritine au sein d'une structure glomérulaire particulièrement intéressante, la membrane basale glomérulaire. Nous pouvons ainsi suivre les variations quantitatives du passage transglomérulaire

du traceur, soit en faisant varier le temps séparant l'injection de la ferritine du sacrifice de l'animal, soit en modifiant les paramètres hémodynamiques glomérulaires par perfusion de théophylline.

Matériel et méthode. 9 rats mâles, de souche Wistar, pesant 250 g, anesthésiés à l'uréthane, sont perfusés avec du sérum physiologique à la vitesse de 0,15 ml/min (sauf les rats Th 30 qui reçoivent la même perfusion à laquelle on ajoute de la théophylline à 3 mg/ml). A la 15^e min, 1,25 ml d'une solution de ferritine à 50 mg/ml (N.B.C., Cleveland)

- 1 M. J. Karnovsky et S. K. Ainsworth, dans: *Actualités Néphrologiques de l'Hôpital Necker*, p. 39. Flammarion, Paris 1972.
- 2 J. Cambar, *Bordeaux Médical* 7, 655 (1974).
- 3 M. G. Farquhar, *Kidney Int.* 8, 197 (1975).

est administré par la même voie. Les animaux sont sacrifiés au bout de 30 min (sauf les rats T 60 qui sont soignés à la 60^e min).

Dès le sacrifice des animaux, les reins sont excisés, puis de petits fragments corticaux (1 mm de côté) sont prélevés, puis plongés dans le glutaraldéhyde à 2,5% en milieu tamponné. Après 1 h de fixation, les pièces sont rincées dans du tampon-phosphate dilué au quart. Les pièces sont incluses dans de l'Epon 812, sectionnées à l'ultramicrotome, contrastées à l'acétate d'uranyle et au tétroxyde d'osmium, puis examinées au microscope électronique RCA-EMU 3G.

Les grains de ferritine sont comptés à la loupe sur les micrographies, toutes au même grossissement ($\times 62500$). La densité des grains est définie au niveau de la membrane basale glomérulaire (délimitée par les membranes des cellules endothéliales et épithéliales) par le nombre de grains comptés par unité de surface de structure à l'aide de petites fenêtres carrées de 4 cm de côté, découpées dans du carton.

Résultats. Sur les micrographies (rats T 30), la densité est de $5,08 \pm 1,51$ grains/cm². – Sur les micrographies témoins (rats T 60), la densité passe à $18,30 \pm 3,21$ grains/cm², soit une augmentation de 260%. – Sur les micrographies théophylline (rats Th 30), la densité passe à $17,11 \pm 3,9$ grains/cm², soit une augmentation de 236%.

Discussion. Malgré son haut poids moléculaire (500 000), le choix de la ferritine présente par rapport aux autres traceurs deux avantages majeurs. C'est une macromolécule

qui présente, à la fois, l'avantage par rapport aux dextrans^{4,5} d'être une protéine, donc une molécule chargée dont le comportement se rapproche des protéines sériques, tout en possédant de petits grains (d'hydroxyde ferrique) bien individualisés et aisément comptables.

Si l'on compare les densités de grains de ferritine se trouvant au sein de la membrane basale 30 et 60 min après l'injection du traceur protéique, nous remarquons une très nette augmentation (+ 260%), qui traduit l'arrivée progressive du traceur au niveau des structures filtrantes. De même, si l'on compare les densités de grains présents au sein des membranes basales de reins perfusés avec du sérum physiologique et de la théophylline, nous remarquons une très nette augmentation (+ 236%), qui met en évidence une intensification du passage du traceur protéique sous l'influence du réactif xanthique. Cette observation est confirmée par l'augmentation de 73,7% de l'excrétion protéique urinaire notée chez le rat⁶.

Ainsi, par cette méthode, nous pouvons évaluer quantitativement les modifications du passage transglomérulaire d'un traceur protéique, soit sous l'influence du facteur temps, soit, à temps constant, sous l'influence d'un réactif physiopharmacologique modifiant les paramètres hémodynamiques de la filtration glomérulaire.

- 4 J. P. Caulfield et M. G. Farquhar, *J. Cell Biol.* 63, 883 (1974).
- 5 J. P. Caulfield et M. G. Farquhar, *J. exp. Med.* 142, 61 (1975).
- 6 J. Cambar, *C. r. Soc. Biol.* 171, 361 (1977).

Correlation of histochemical and physiological properties of muscle units in the striped skunk¹

E. C. Frederick², M. F. Hamant, S.A. Rasmussen, A. K. Chan³ and G. E. Goslow, Jr

Departments of Biological Sciences, Physical Education, and Engineering, Northern Arizona University, Flagstaff (Arizona 86011, USA), 4 August 1977

Summary. Single motor units in striped skunk medial gastrocnemias were isolated and physiologically characterized. Individual muscle unit fibres tagged by glycogen depletion were analyzed histochemically and found to have histochemical profiles consistently correlated with the physiological findings.

The direct correlation between the histochemical and physiological properties of mammalian muscle fibres has been demonstrated with a technique which employs selective glycogen depletion following physiological measurements to 'tag' the component fibres of a single muscle unit^{4,5}. Once tagged by this method the individual fibres of a muscle unit can be identified in frozen sections stained for glycogen. These same fibres can then be traced through serial sections stained for myofibrillar-ATPase and other enzymes used in the histochemical typing of muscle fibers.

This technique has been used on the m. soleus of the laboratory rat⁴ and the gastrocnemius and soleus of the domestic cat⁵. The results showed that there is almost complete histochemical uniformity in the muscle fibres within a muscle unit and that there are 3 histochemical fibre types which consistently correlate to 3 physiological muscle unit types. Results, however consistent, from only 2 muscles in 2 species can only support cautious generalizations about the correlation of histochemical and physiological properties in other species. We sought to expand these generalizations by using these same techniques on another species with locomotor behavior and morphological characteristics divergent from the rat and the cat.

Our earlier work with the striped skunk (*Mephitis mephitis*) left us curious about the correlation between the histochemical and physiological properties of limb muscles from these animals. Studies of the physiological properties of striped skunk motor units, revealed only fatigue resistant units with a broad range of contraction times (30–95 msec)⁶. Subsequent histochemical analysis was supportive of the motor unit findings in that only fast oxidative glycolytic (FOG, type II A) and slow oxidative (SO, type I) fibres were present⁷. These unusual findings

- 1 This work was supported by the Organized Research Committee, Northern Arizona University.
- 2 Department of Zoology, University of Tennessee, Knoxville (TN 37916, USA).
- 3 Department of Electrical Engineering, Texas A&M University, College Station (TX 77843, USA).
- 4 E. Kugelberg, in: *Basic Mechanisms of Ocular Motility and their Clinical Implications*. Ed. G. Lennerstrand and P. Bach-Y-rita. Pergamon Press, New York 1975.
- 5 R. E. Burke and P. Tsairis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 228, 145 (1974).
- 6 K. Van de Graaff, E. C. Frederick, R. G. Williamson and G. E. Goslow, Jr, *J. Neurophysiol.* 40, 1424 (1977).
- 7 E. C. Frederick and G. E. Goslow, Jr, *J. Histochem. Cytochem.* 24, 959 (1976).