

SOĞUK STRESİ UYGULANAN SURRENAL MEDULLASI ADRENALİN HÜCRELERİNDE IŞIK VE ELEKTRON MİKROSKOBU DÜZEYİNDE GÖZLENEN DEĞİŞİKLİKLERİN İNCELENMESİ

Yüksel Saran*

Böbrek üstü bezi medullası kromaffin hücreleri, kateşolaminler, ATP, kalsiyum, enzimler, proteinler, peptidler (enkefalinler gibi) ve kromaffin granüllerin diğer ürünlerini sentez eder depolar ve salgı-larlar (44). Surrenal medullasından kateşolaminlerin salgılanması hem nöral hem de hormonal etkenlere bağlıdır (50). Bezin torasik splanknik sinirlerle innerve olduğu bilinmektedir. Kromaffin hücreler çevresinde sonlanan kolinerjik sinirler salgı işlevini kontrol ederler (12). Çeşitli yöntemler uygulanarak uyarılan kromaffin hücrelerden kateşolaminlerin salınma biçimi ve salınan salgı granüllerinin yoğunluğu, membran yapısı ve lokalizasyonu ışık ve elektron mikroskobu ile incelenerek değişik sonuçlar elde edilmiştir (62). Stres, nikotin, reserpin, insulin, düşük ısı, endotoksik şok etkisiyle kromaffin hücrelerden kateşolaminlerin kaybolduğunu kanıtlayan histokimyasal ve ultrastrüktürel düzeyde birçok gözlemler bulunmaktadır (7,10,18,19,22,23,44). Kateşolamin moleküllerinin granüllerden salınarak sitoplazmaya geçtiği ve hücre dışına difüzyonla verildiği (43,61,62) yada protein hormonlarında olduğu gibi ekzositozla salgılandığı savunulmuştur (3,11,32,38,44,45,48). Soğuk stresinin medulla hücreleri üzerine etkisi konusunda daha çok hücrelerin çekirdek yapısı ve DNA miktarındaki değişiklikler ele alınmış salgı granülleri ve diğer sitoplazmik organellerdeki etkisi, üzerindeki araştırmalara az rastlanmış ve farklı sonuçlar elde edilmiştir (34,36,59,60).

Surrenal medullası kromaffin hücrelerinin yapı özelliğindeki değişiklikler, sıçan (5,28,33,36,53), fare (37,42), hamster (61,22), memeli (11), kobay (57,58), sığır (31), tavşan ve değişik vertebralılarda (18, 19) incelenmiştir. Surrenal medullası kromaffin hücrelerinin birbirine

* A.Ü. Tıp Fak. Hist. ve Emb. Bilim Dalı Doçenti

oranları ve yapı özellikleri farklı türlerde değişiklik göstermektedir. Kobay medullası özellikle yüksek oranda adrenalin depolayan hücreler içerdiğinden (bütün medulla hücrelerinin yaklaşık % 90'ı) (57,58) bu çalışmada kobay en uygun deney hayvanı olarak görülmüştür. Bu nedenle gözlemlerimiz kobay medullasının büyük çoğunluğunu oluşturan adrenalin hücreleri üzerinde yoğunlaştırılmıştır. Bu çalışma soğuk stressinin kobay medullası adrenalin hücrelerinde gözlenen değişiklikleri ışık ve elektron mikroskobu düzeyinde incelemek üzere ele alınmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Materyel olarak 500-600 gr. ağırlığında ergin erkek kobaylar kullanıldı. Bunlar onarlık dört gruba ayrıldılar. İlk grup kontrol olarak alınan hayvanları içerdi. Bunlar deney süresince oda ısısında tutuldu- lar. İkinci grup hayvanlar +4 C° de 15 saat süreyle soğuk odaya bırakıldı. Üçüncü grup, aralıklı olarak +4 C° de (15 saat +4 C° de daha sonra 9 saat oda ısısında) toplam 210 saat (14 gün) süre ile bekletildi son soğuk periyodu sonunda kobaylar öldürüldü. Dördüncü deney grubunda 210 saat soğuk etkisinden sonra oda ısısına alınan kobaylar 48 saat kontrollerle aynı yerde bekletildi ve bu süre sonra öldürüldüler.

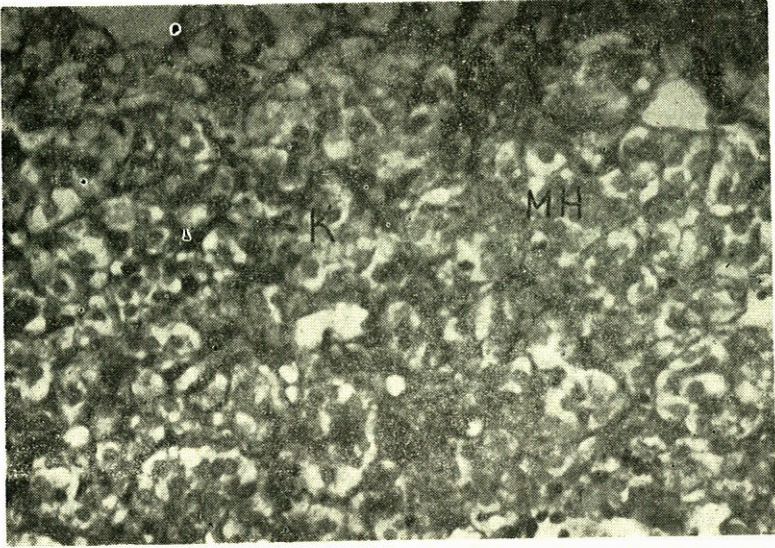
Işık mikroskobu ile inceleme için organlara kateşolaminlerin belirlenmesinde kromaffin reaksiyonu, lipidler için, Sudan siyahı B boyama yöntemi uygulandı. Genel yapı yönünden ise azan birleşik boyası, Laidlaw gümüş empregnasyonu, glikojen incelemesi için periyodik asit Schiff reaksiyonu ve kurşun-asetat yöntemi uygulandı (47).

Elektron mikroskobu için her kobaydaki sol surrenaller veronal asetat tamponla pH 7.4 e ayarlanmış % 2 lik osmiyum tetroksid ile oda ısısında bir saat tesbit edildi ve vestopale yatırıldı. Her doku blokundan ışık mikroskobik bir mikronluk yarı ince ve elektron mikroskobik 200-400 A° luk ultra ince kesitler alındı. Işık mikroskobik yarı ince kesitler toluidin mavisi ile boyandı. Ultra ince kesitler kontrast sağlanması için uranil asetat ile boyandı. Kesitler Zeiss EM 8 elektron mikroskobu ile incelendi.

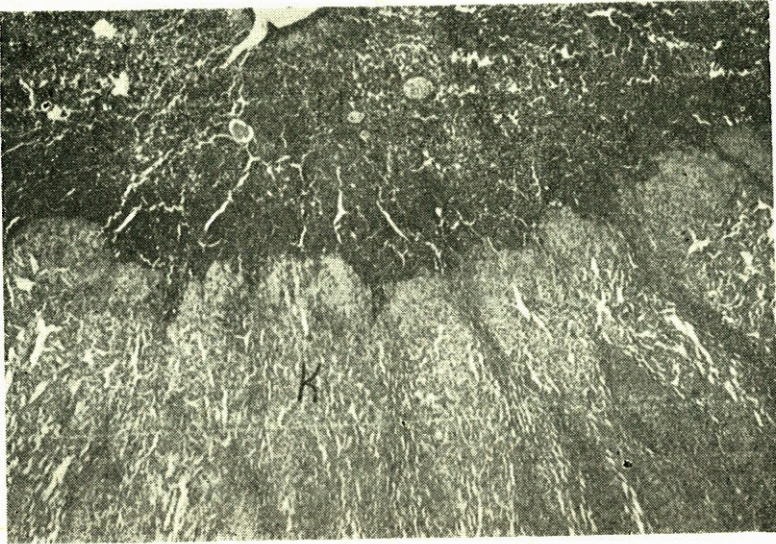
BULGULAR

Kontrol grubunun ışık mikroskobu için hazırlanan kesitlerinde büyük epitelooid medulla hücreleri, kan kapillerleri ve venüller ile yakın ilişkili olarak, yuvarlak hücre kümeleri, ya da kısa kordonlar oluşturdular. Yuvarlak veya oval, bazan düzensiz biçimde çekirdek içer-

diler. Azan ve gümüşleme yöntemleriyle hücreler çevresinde kollagen ve arjirofil lifleri içeren ince fibröz ve vasküler yapı ve hücrelerin genel düzeni belirlendi (Resim 1). Kromaffin ve kurşun asetat (47) ile medulla hücrelerinin salgı granülleri ile dolu olduğu gözlemlendi (Resim

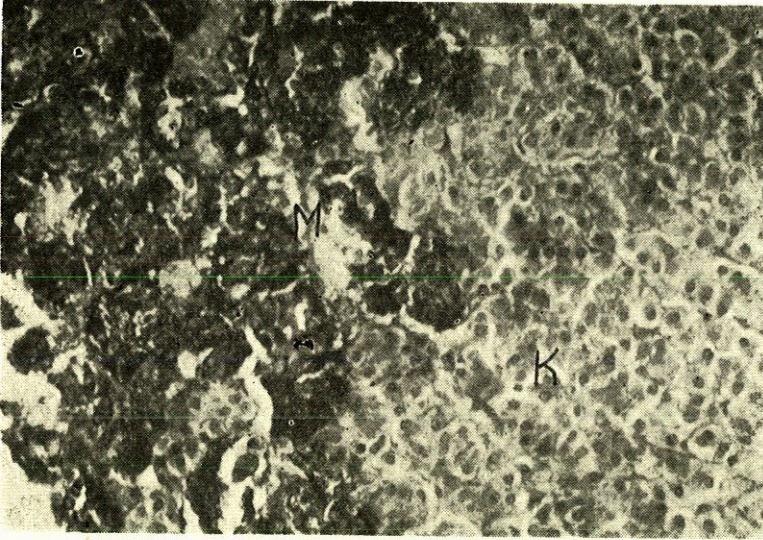


Resim 1 : Kontrol kobay surrenal medullasının genel yapı özelliği. Hücreler, sık kapillerler ve ince bağ dokusu ile ayrılan gruplar oluşturuyor. K, kapiller; MH, medulla hücreleri. Azan X 300.

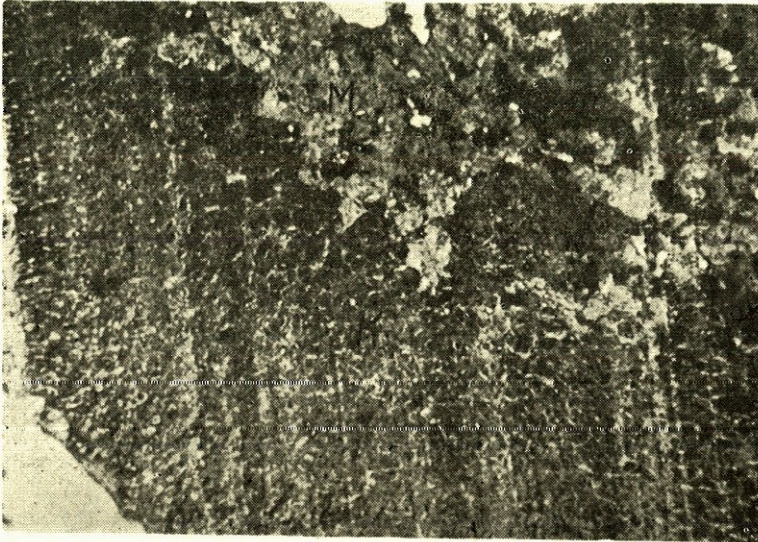


Resim 2 : Kontrol surrenal medullası, kromaffin reaksiyonu. K, koteks; D, medulla. X 250.

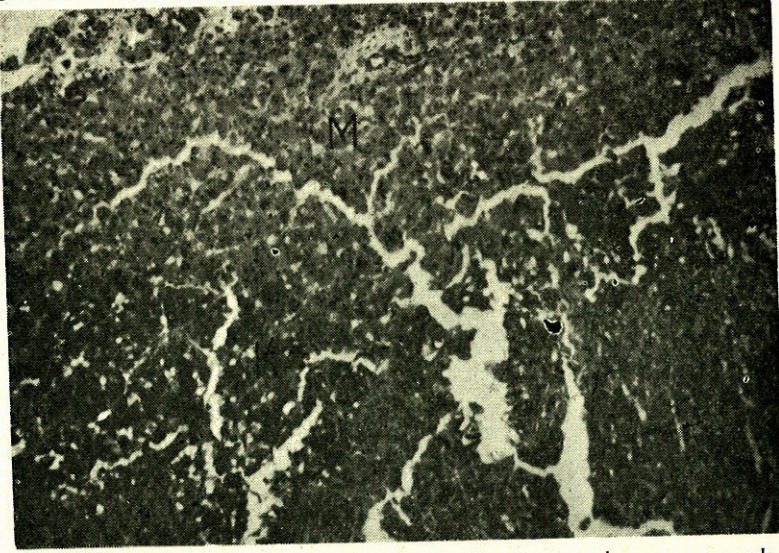
2,3). Sudan siyahı ile boyamada, korteks belirgin boyandığı halde, medullada çok az sayıda boyalı granül gözlemlendi (Resim 4). Sempatik nöronların kobay adrenal medullasından çok sayıda olduğu göze çarptı (Resim 5).



Resim 3 : Kontrol surrenal medullası. Korteksten kurşun asetatlı boyama ile belirgin biçimde ayırdolunabilmektedir. K, korteks; M, medulla. X 250.



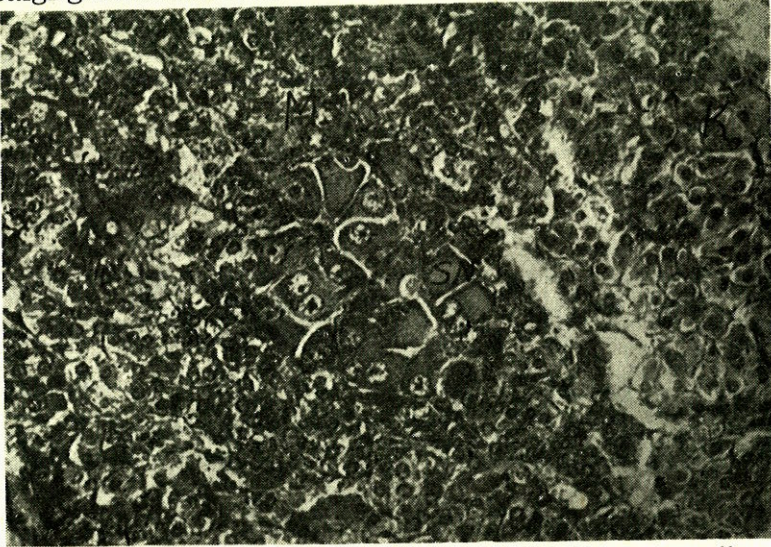
Resim 4 : Kontrol surrenal medullası, Lipidden zengin kortekse oranla medulla çok açık renkte beliriyor. K, korteks; M, medulla. Sudan siyahı B boyası X 200.



Resim 5 : 15 saat süreli soğuk etkisi. Kromaffin reaksiyonunun azalması sonucunda medulla soluk kahverengi gözleniyor. K, korteks; M, medulla. Kromaffin reaksiyon X 200.

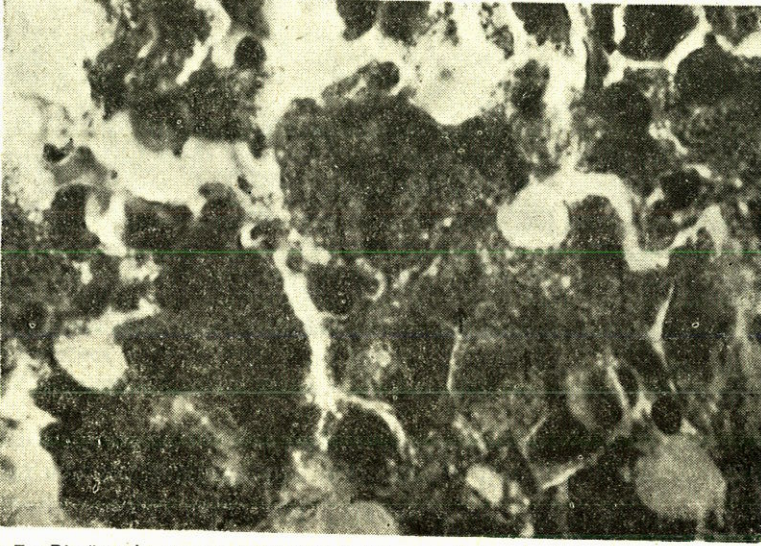
İkinci deney grubunda (15 saat soğuk etkisi) hücre granüllerinde bir miktar azalma gözlemlendi. Kromaffin reaksiyonunun azalmış olduğu görüldü. Hücreler soluk kahverengi görünüm aldılar (Resim 5,7).

Üçüncü deney grubunda (aralıklı olarak 210 saat süre ile soğuk etkisi) salgı granüllerinin hemen tamamen hücreden boşalmış olduğu

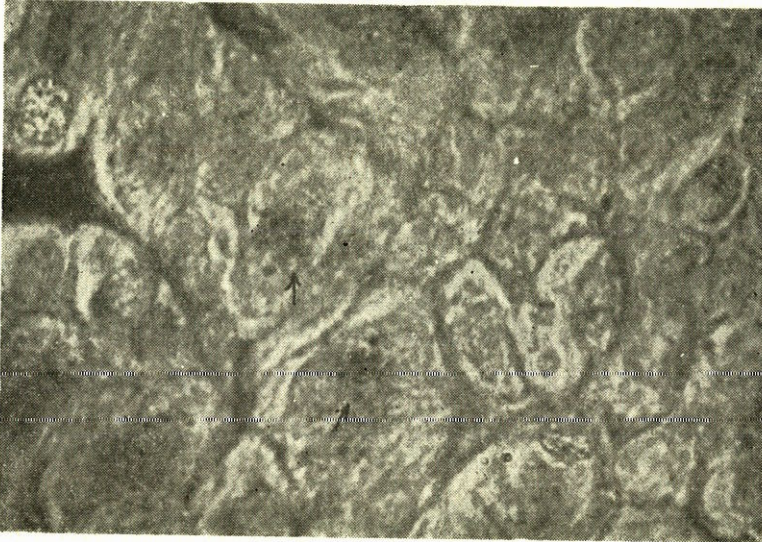


Resim 6 : Uzun süreli soğuk stresi uygulanan medulla. Sitoplazmada kromaffin reaksiyon gözlenmiyor. SN, sempatik nöronlar; K, korteks; M, medulla.

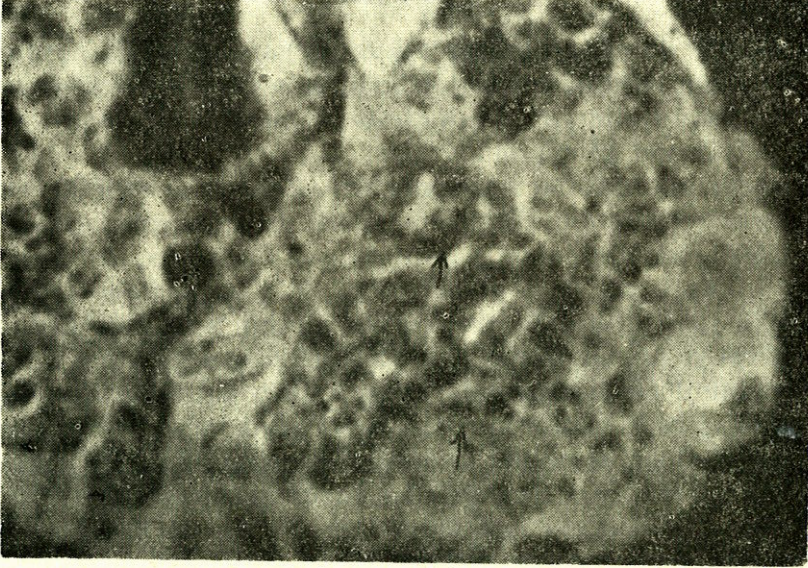
gözlendi. Kromaffin reaksiyonu ile kateşolaminlerin büyük ölçüde azaldığı saptandı. Reaksiyonun rengi soluk kahverenginden negatif reaksiyon görünümünü aldı (Resim 5). Renk ve granül sayısındaki azalmanın yanında hücre büyüklüğünde de belirgin azalma görüldü (Resim 5). Buna karşın damar lümeni çapında belirgin genişleme göz-



Resim 7 : Bir önceki resmin kuvvetli büyütmesi. Kahverengi kromaffin granüller okla işaretli. Kromaffin reaksiyonu X 1200.

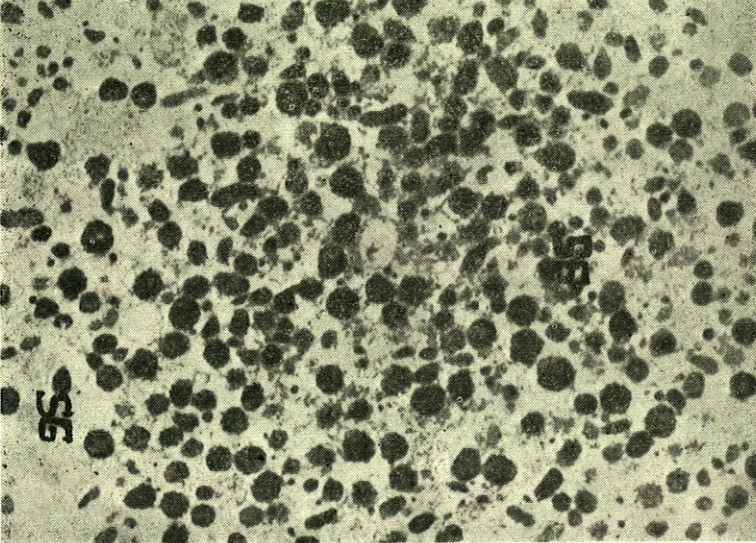


Resim 8 : Uzun süreli soğuk etkisi. Bazı medulla hücreleri sitoplazmasında belirgin PAS pozitif granüller seçiliyor. Ok ile işaretli. X 1200.



Resim 9 : Uzun süreli soğuk etkisi. Medulla hücrelerinde lipid damlaları artmış olarak görülüyor (okla işaretli). Sudan siyahı B X 1200.

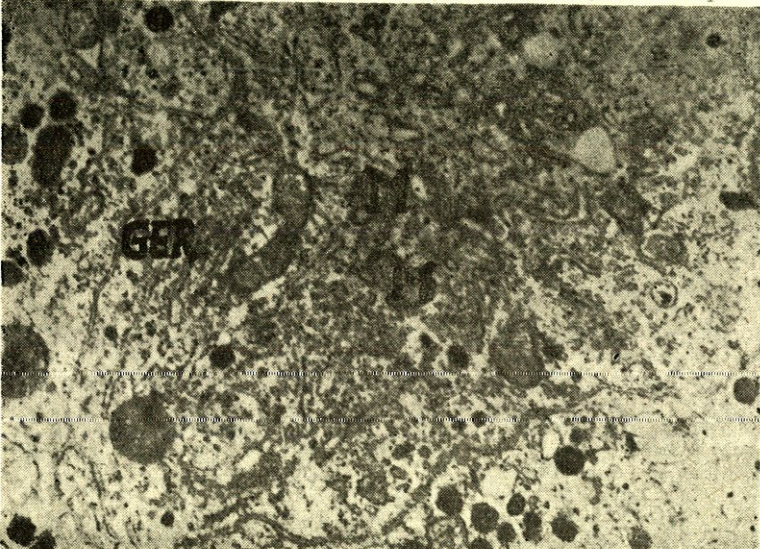
lendi. PAS ile boyamada sitoplazma içinde PAS pozitif granüller seçilebildi (Resim 8). Sudan boyaması kesitlerinde hücre sitoplazmasında daha çok sayıda lipid damlaları gözlemlendi (Resim 9). Ayrıca medullada yıldız biçiminde granüler yapılar içeren hücelere rastlandı. Bunların bağ dokusunda yer alan fagositler olabileceği düşünüldü.



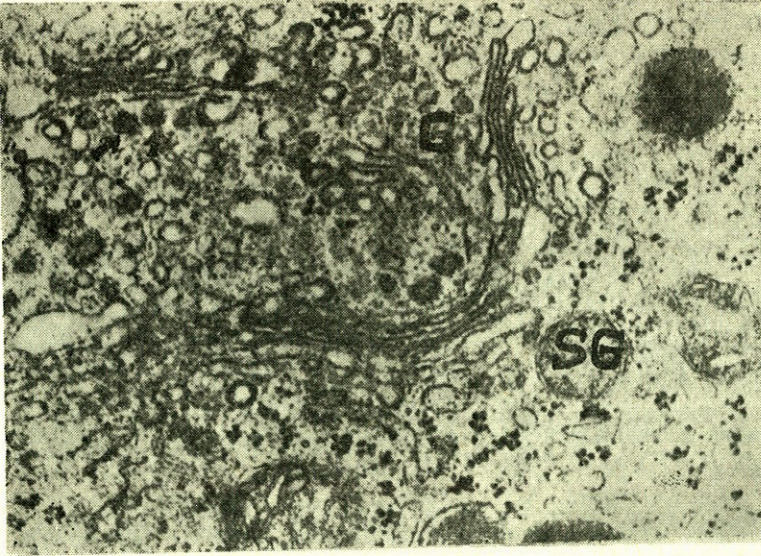
Resim 10 : Kontrol kobay surrenal medullası sitoplazmanın yuvarlak oval osmiyofilik salgı granüllerinden zengin oluşu gözleniyor. SG, salgı granülleri X 10.000.

Dördüncü deney grubunda soğuk etkisinden sonra normal oda ısısında 48 saat bırakılan deney grubunda, medulla hücreleri yeniden kromaffin reaksiyonu ve kurşun asetat yöntemi ile boyanarak kontrol kobaydaki normal görünümü aldılar.

Elektron mikroskobu gözlemlerinde, kontrol grubunda, genelde endoplazma retikulumu, Golgi kompleksi ve mitokondriyonların yer aldığı çekirdeğe yakın alanda daha seyrek olmak üzere, sitoplazmanın her tarafına yayılmış, yuvarlak ya da oval biçimde çok sayıda osmiyofilik salgı granüllü göze çarptı (Resim 10). Granüller membranla çevrili yoğun bir içeriğe sahipti. Elektroyoğun granül materyeli, genelde granül boşluğunu doldurmuştu. Bazı granüller kuvvetli büyütmelerde granül membranı altında periferik ince az yoğun bir halka yapısı içerdiler. Granüllü endoplazma retikulumu sisternalarının kesitlerine tek tek, bazı alanlarda ise küçük gruplar halinde rastlandı (Resim 11). Endoplazma retikulumu keseleri ya da tubulileri içinde elektroyoğun materyel gözlenmedi. Golgi kompleksine iyi gelişmiş olarak hücre sitoplazmasında sıklıkla rastlandı (Resim 12). Golgi vesikül ve vaküolleri ile birbirine paralel yassı sarnıçları belirgindi. Mitokondriyonlar küçük yuvarlak ya da oval koyu matrisli ve belirgin kristal görünümdedir. Lipid damlaları çok seyrek. Glikojen partiküllerine sitoplazmada geliş güzel dağılmış olarak rastlandı. Çok az sayıda lizozom gözlemlendi. Medulla, hücrelerin çevresinde yakın ilişkili olarak bulunan ve seyrek pencereci endotel içeren kapillerlerden



Resim 11 : Kontrol kobay medullası. Sitoplazma duvarlarında sık ribozomlar içeren endoplazma retikulumu kesitleri. GER, granüllü endoplazma retikulumu; M, mitokondriyon. X 20.000.



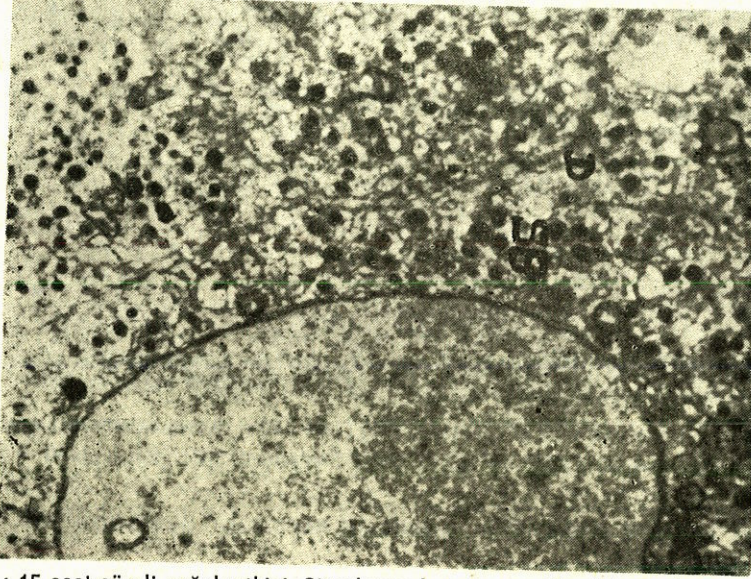
Resim 12 : Kontrol medulla iyi gelişmiş Golgi kompleksi çevresindeki veziküller içinde elektroyoğu nmateriyel okla işaretli G. Golgi kompleksi; SG, salgı granülü. X 23.000.

zengindi. Komşu kromaffin hücreler arasında desmozomlar bulunmaktaydı.

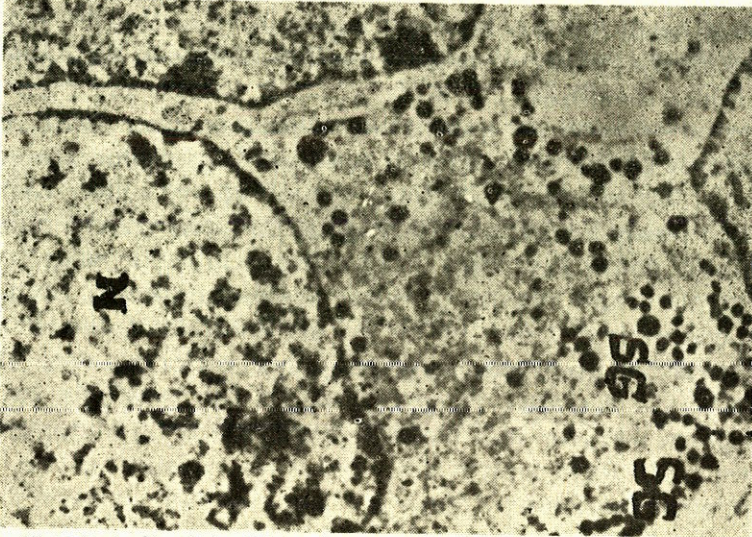
İkinci grupta, aralıklı olarak 15 saat soğuk stresi uygulanan deney hayvanlarından alınan kesitlerde, adrenalin hücreleri sitoplazmasında, granüllerin miktarı kontrole oranla daha azalmıştı (Resim 13). Hücre membranı yakınında salgı granülleri daha çok sayıdaydı ve bu bölgede hücre membranı düzensiz görüldü (Resim 14). Diğer hücre organellerinde önemli bir değişiklik bulunmadı. Bazı alanlarda granül membranı ile hücre membranı arasında bağlantılar gözlemlendi. Sitoplazmanın her tarafında serpilmış vezikül ve vakuollere rastlandı.

Üçüncü deney grubunda, soğuk stresi altında aralıklı olarak 210 saat bırakılan deney grubunda; hücre sitoplazmasında salgı granüllerinde kontrole oranla önemli derecede azalma mevcuttu. Sitoplazmada ancak çok az sayıda osmiyofilik granül bulundu. Endoplazma retikulumu keselerinin lümeninde yer yer genişlemeler göze çarptı. Golgi kompleksine yakın olarak ve sitoplazmanın her tarafında vakuol ve veziküllerin ve yer yer multiveziküler cisimlerin bulunduğu dikkati çekti (Resim 15). Salgı materyelinin ekzositoz ile hücre dışına verildiğini kanıtlayan gözlemlere daha sıklıkla rastlandı. İnterselüler aralıkta salgı içeriğine benzer yoğun maddeler gözlemlendi (Resim 16). Resim 16 da gözlenen görüntülere benzer durumlara sıklıkla rastlandı.

Sitoplazmada düzensiz şekilli yoğun matriks ve materyel içeren lizozomal yapılarda ve lipid damlalarında artma görüldü (Resim 17 ve 18). Hücreler arasındaki desmozom yapıları kontrol grubunda olduğu gibi gözlemlendi. Hücre sınırları oldukça düzensiz görüldü.



Resim 13 : 15 saat süreli soğuk etkisi. Sitoplazmada salgı granülleri kontrola oranla azalmış görülmüyor. SG, salgı granülleri; D, desmozom. X 15.000.

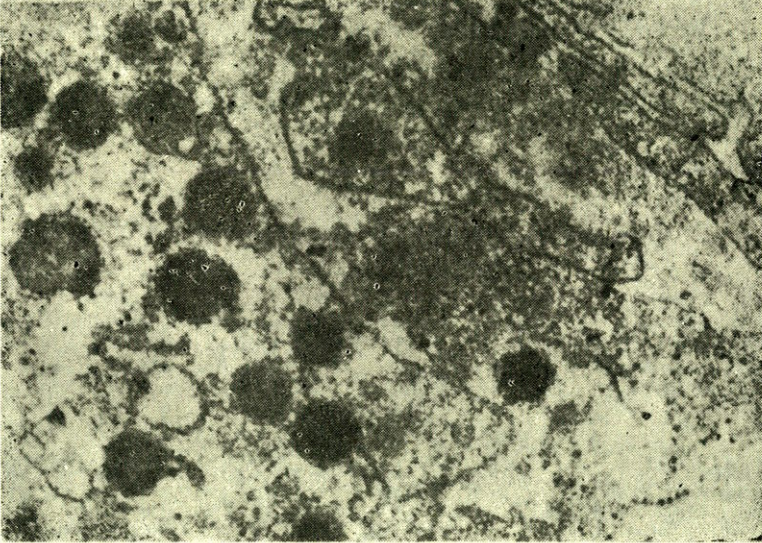


Resim 14 : 15 saat süreli soğuk etkisi, salgı granülleri hücrenin periferisinde hücre membranı yakınında toplanmış görülmüyor. SG, salgı granülleri. X 17.000.

Dördüncü deney grubunda, soğuk etkisinden sonra normal oda ısısında 48 saat bırakılan deney grubunda, salgı granüllerinin yeniden artmış olduğu gözlemlendi (Resim 19). Bazı granüllerin içerdiği daha az yoğun ve periferik az elektroyoğun halka biçimi ince aralık seçili-

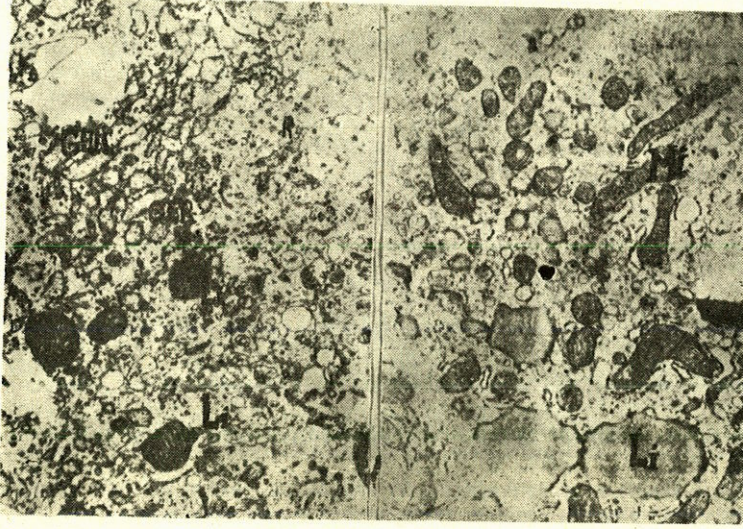


multiveziküler cisimcikler gözlenmektedir. V. Vakuol, Ve. vezikül SG, salgı granülü mc, multiveziküler cisimcik X 25.000.

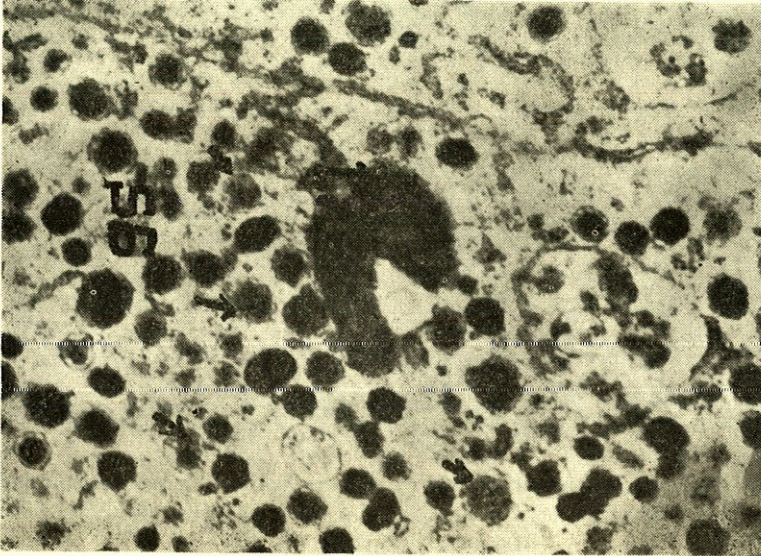


Resim 16 : Uzun süreli soğuk etkisi. Salgı granülleri hücre membranı yakınında toplanmış ve hücre dışında salgı içeriğine benzer yoğunlukta materyel yapısı gözleniyor (okla işaretli) SG, salgı granülü, X 25.000.

yordu. Değişik büyüklükteki diğer granüller daha homojen ve elektro-yoğun görünümdeydi ve açık periferik halka göstermedi. Sitoplazmik vezikül ve vaküollerin miktarı önceki deney grubuna oranla azalmıştı (Resim 19). Endoplazma retikulumu keseleri daha genişlemiş ve orta yoğunlukta materyel ile dolu görüldü (Resim 20). Bazı hücreler-



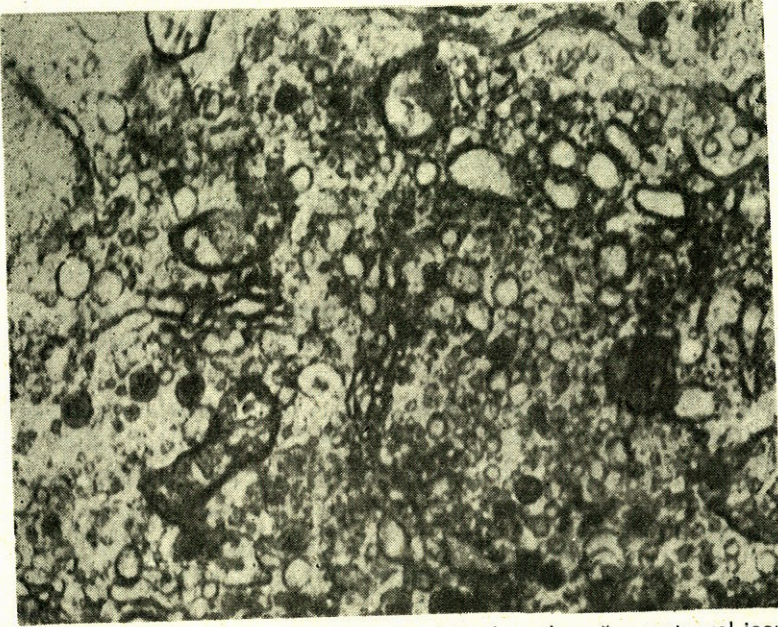
Resim 17 ve 18 : Uzun süreli soğuk etkisi. Sitoplazmada artan sayıda yoğun matrisli lizozomal (Resim 17) ve lipid (Resim 18) damlaları görülüyor. L, lizozom; GER, granüllü endoplazma retikulumu; L, lipid damlası; M, mitokondriyon; X 10.000.



Res. 19 : Soğuk etkisinden 48 saat sonra. Sitoplazmada salgı granülleri yeniden artıyor. Az yoğun (↓) ve yoğun salgı granülleri görülüyor. SG, salgı granülü li, lizozom x 20.000.



Resim 20 : Soğuk etkisinden 48 saat sonra, Endoplazma retikulumu keseleri genişlemiş ve orta yoğunlukta materyel içeriyor GER, granüllü endoplazma retikulumu X 20.000.



Resim 21 : Soğuk stressinden 48 saat sonra. Golgi yakınında yoğun materyel içeren, küçük salgı granülleri seçiliyor. GER, granüllü endoplazma retikulumu; m, mitokondriyon; SG, salgı granülü; G, Golgi.

de Golgi kompleksi yakınında yeni salgı granülleri oluşumuna ilişkin ortada yoğun materyel içeren küçük granüller gözlemlendi (Resim 21).

TARTIŞMA

Farklı türlerin surrenal medulla hücrelerine ilişkin histokimyasal özellikleri ve değişik ilaçların etkilerini kapsayan ışık ve elektron mikroskopu düzeyinde çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Işık mikroskopu düzeyinde kateşolamin granüllerinin ortaya çıkarılması için gümüşleme (9,13,16), fluoresan yöntemler (1,7,15) gluteraldehit-dikromat yöntemi gibi histokimyasal incelemeler mevcuttur. Farklı kateşolamin granüllerini içeren hücrelerin ayırdolunmamasında gluteraldehit (13), gluteraldehit toluidin mavisi (28) yöntemi, gluteraldehit-amonyaklı gümüş eriyiği (56) gibi yöntemler başarılı sonuç vermiştir. Uzun süreli düşük ısıda bırakılan ve PAS uygulanan sıçan adrenal medulla hücrelerinde küçük PAS pozitif granüller follikül lümeni ve damar lümeni içinde gözlemlendiler (34). Kesitlerimizde uygulanan histokimyasal yöntemler arasında kromaffin yönteminin yanısıra kurşun asetat ile boyanan kesitlerde kromaffin hücreleri soluk boyanan korteks hücrelerinin komşuluğunda koyu lacivert renkte belirlendiler. Uzun süreli soğuk etkisinde bırakılan bazı medulla hücrelerinin sitoplazmasında PAS pozitif granüller seçildi. Bunlar ince yapı düzeyinde gözlenen glikojen partiküllerinin gruplaşmalarına uyabilir.

Medulla hücrelerinin normalde ve farklı ilaçlarla uyarılmasına bağlı, çeşitli türlerde ışık ve elektron mikroskopu ile yapılan araştırmalar mevcuttur. Belirli dozlarda insulin injeksiyonundan sonra faz-kontrast mikroskopu ile yapılan çalışmalarda ortaya çıkan negatif kromaffin reaksiyonunun hücreden granül salgılanmasına bağlı olmadığı ileri sürülmüştür (20). Işık mikroskopu ile yapılan başka bir çalışmada ise reserpin etkisiyle medulla hücrelerinden kateşolaminlerin salgılandığı açıklanmıştır (10,18). Ultrastrüktür düzeyinde kromaffin granüller hücre içinde yuvarlak oval, tubular, değişik biçimlerde gözlenmiştir (65). Fikzasyon durumuna göre elektroyoğun granül materyeli ya granül boşluğunu doldurur ya da periferik bir halka oluşturmaktadır. Osmik asit ve aldehit-osmik asit tesbitinden sonra noradrenalin granülleri adrenalin granüllerine oranla daha elektroyoğun gözlenmiştir (9,16,25,55).

Bunun dışında bazı izole salgı granülleri farklı ultrastrüktürel özellikte yapı göstermişlerdir (2).

Normal kobay medullasının ultrastrüktürel yapısının incelenmesi ile (57) esas olarak adrenalın depo edildiği saptanan ve, orta elektro-yoğun granüller içeren hücrelerin yüksek oranda olduğu (medullanın % 85-90'nını oluşturduğu) saptanmıştır (29,57). Bu hücelere kromaffin-A hücreleri denir. Daha elektroyoğun ve daha küçük granül içeren hücrelerin ise biyokimyasal analizlere dayanarak, noradrenalin türünde olduğu saptanmıştır. Küçük granül içeren bu hücreler, meduller ve kortikal kan damarlarına uzanan, surrenal korteks hücrelerine ve medulladaki sempatik nöronların dendron kesitlerine komşu, kısa uzantılar içerdiler. Oysa kromaffin-A hücrelerinin uzantı oluşturduğu gözlenmedi. Sempatik nöronlar kobay surrenal medullasında çok sayıda gözlenmiştir. 5-6 hidroksi dopamin tatbiki kromaffin-A hücrelerinde, küçük granül içeren hücrelerde ve nöronal hücre gövdesinde ultramorfolojik hiçbir değişiklik oluşturmamıştır (57). Biyokimyasal çalışmalarla kobay surrenal bezinde adrenalinin kateşolaminlerin çoğunluğunu oluşturduğu saptanmıştır (yaklaşık total kateşolaminlerin % 90'ını). Bu çalışmada, normal kobay medullası adrenal hücrelerinin ultrastrüktürel yapısında, sitoplazmanın her tarafına yayılmış yuvarlak ya da oval biçimde çok sayıda membranla çevrili, yoğun bir içeriğe sahip salgı granülleri gözlendi. Golgi kompleksi, mitokondriyon ve endoplazma retikulumunun ince yapı özellikleri daha önce tanımlanan (57,58) kobay medullası yapı özelliklerine uymaktadır.

Medulla hücreleri üzerine soğuk etkisi ve insulin injeksiyonlarından sonra, elektron mikroskobu ile ve hafif büyütmelemede sitoplazma yoğunluğunda genelde bir azalma olduğu ve bunun ya medulla hücrelerinin osmiyofilik özelliğinin azalmasına, ya da granül sayısında azalmayla birlikte çok sayıda vakuollerin varlığına bağlı olduğu ileri sürülmüştür. Genelde hücre yoğunluğunda gözlenen değişikliklere ek olarak uyarıcı etkenlerden sonra sitoplazmik granüllerin sayısında azalma gözlenmiştir (11). Bazı çalışmalarda insulin injeksiyonundan sonra granüllerin büyüklüğünde azalma olduğu dikkati çekmiştir (64). Bunun granüllerin santral materyelindeki madde kaybına bağlı olduğu ileri sürülmüştür. Belirli sürelerle yapılan rezepin injeksiyondan sonra granüllerde yoğunluğun azaldığı ve bunun elektroyoğun materyelin membran aracılığıyla yayılmasına bağlı olabileceği ileri sürülmüştür (61). Bunun gibi hamster medulla hücrelerinin, farklı sürelerde rezepin injeksiyonu ile uyarılması sonucunda, granül sayısında değişme olmadan, yalnız yoğunluk azalması gözlendi ve bunun amin içeriğindeki azalmaya bağlı olabileceği belirtildi (62). Osmik asit

aminler aracıyla redükte olduğundan normalde granüller elektron mikroskobu ile çok yoğun görülürler. Salınmadan sonra gözlenen granül yoğunluğunun protein ve lipidler gibi diğer granül yapılarının içeriğine bağlı olabileceği bu şekilde yoğunluk azalmasının kateşolaminlerin kaybolduğunu kanıtladığı ileri sürülmüştür (62). Dereceli santrifüj tekniği ile bu granülleri içeren fraksiyonun biyokimyasal incelenmesi sonucunda kateşolaminlerin yaklaşık % 70'nin salındığı, protein, içeriğinde hiçbir kayıp olmadığı saptanarak bu görüşler desteklenmiştir (62). Rezerpinin kateşolamin salınmasına neden olduğu hamster sıçan ve farede ultrastrüktürel değişmelerle gösterilmiştir (10,18,37,62). Kedi glomuskarotikumunda yoğun dozda rezerpin verilerek yapılan çalışmada, glomuskarotikumda granüllerin kaybolmadığı oysa sinir sonlanmaları ve surrenal medullası hücrelerinden benzer granüllerin kaybolduğu gözlemlendi. Bunun nedeni olarak medulla ve sinir sonlanmalarına oranla glomuskarotikumda kateşolamin ve diğer yapılar arasındaki bağın farklı kompleks oluşturduğu öne sürüldü. Rezerpin verilmesinden sonra paragangliyon esas hücrelerinde kalan elektroyoğun görünümün kateşolamine bağlanan ürüne ait olabileceği, yada farklı hücre ve değişik türdeki deney hayvanlarının granül miktarının, rezerpin etkisine farklı tolerans gösterebileceği öne sürüldü (14).

Tavşanda splanknik sinirinin uyarılmasından sonra büyük, çift membranla çevrili kateşolamin içeren cisimciklerin, hücrenin santoral bölgesinden periferik ilerlediği ve bu bölgeden venöz sinuslerin subendotelyal bölgesine boşaldığı izlenmiştir (61). Surrenal medullasında ve adrenerjik sinir sonlanmalarında sekresyonun salgılanma biçiminin, eksositoz olduğu kabul edilmiş ve bu morfolojik olarak çeşitli türlerde saptanmıştır (9,11,12,13,25). Bunun gibi diğer bazı salgı sistemlerinde salgı ürününün hücreden eksositoz ile salgılandığı kanıtlanmıştır (10,18,37,62). Meduller hücrelerde granül sayısındaki değişmeler rezerpin verilmiş hamsterde, belirli aralıklarla izlenmiştir. Rezerpin verilmesinden 24 saat sonra osmiyofilik granüllerin kaybolduğu, 2-3 gün sonra ise kontrol hamsterdeki görünüme kavuştuğu saptanmıştır (61).

Bu çalışmada üçüncü deney grubunda aralıklı olarak 210 saat soğuk etkisi eksositoza ilişkin, hücre membranı ile granül çevresi membranının birleşmesini gösteren durumlara kontrole ve ikinci deney grubuna (15 saat sürekli soğuk etkisi) oranla daha sık rastlandı. Hücre dışında osmiyofilik granül içeriğine benzer özellikteki yapılar gözlemlendi. 15 saat süre ile soğukta bırakılan medulla hücrelerinin sitoplazmalarında granüllerin kontrole oranla azaldığı aralıklı 210 saatlik

üçüncü deney grubunda ise büyük kısmının gözden kaybolduğu ancak çok az sayıda granülün özellikle hücre membranı yakınında bulunduğu gözlemlendi. Soğuk etkisinden sonra oda ısısında 48 saat bırakılan kobay medulla hücrelerinde yeniden granüllerin oluştuğu ve granül miktarının çoğaldığı gözlemlendi.

Belirli sürelerle rezepin injeksiyonundan sonra hamster adrenal medulla hücrelerinde granüllerdeki azalmayla birlikte sitoplazmada vezikül ve vakuollerde artma olduğu gözlemlendi. İçi boş görülen bu veziküler yapıların, ilaç etkisiyle hormonlarını boşaltan kateşolamin depo yerleri olabileceği yada granüllerin oluşumunda duraklama nedeniyle meydana gelebileceği ileri sürüldü (61). Eksositozdan sonra, plazma membranından tomurcuklanan vezikül ve tübüllerin içeri alınması işleminin (endositoz yada pinositoz) hücrenin yüzey artışına karşı bir dengeleme mekanizması olduğu ileri sürülmüştür (2,3,13, 20). Fakat genelde içeri alınan membran parçasının ne olduğuna ilişkin ortak kanı yoktur. Bunların yeni salgı granüllerinin sarılmasında granül öncesi membran olarak mı kullanıldığı yada hücre tarafından membran makromoleküllerine yada daha çok küçük moleküllere mi parçalandığı tartışmalıdır. İçeri alınan membran parçalarının yeni zimogen granüllerinin sarılmasında yeniden kullanıldığı, yada bu membranların parçalandığı öne sürülmüştür (1). Kobay pankreas kesitlerinde uygulanan biyokimyasal kanıtlara göre bu hücre içine alınan membranın ancak membran makromolekülleri noktasına kadar parçalandığı ve mikrozomal membranların ise total olarak yeniden sentez edilemediği saptanmıştır (40). Bu görüşe uymayarak parotis bezinde salgı granüllerinin; protein yapısının amino asitlerden yeni sentezlenen membranlar tarafından sarıldığı ileri sürüldü, böylece endositoz membranlarının küçük moleküllere parçalandığı kabul edildi (4). Bu çalışmada, deneysel koşullardaki kesitlerde aralıklı olarak 210 saat süre ile soğuk etkisi altında bırakılan adrenalın hücrelerinin sitoplazmasında vezikül ve vakuollerin en fazla miktarda bulunduğu gözlemlendi. Yeni granüllerin oluştuğu dördüncü deney koşulunda (soğuk etkisinden sonra 48 saatlik normal oda ısısında) ise azalmıştı. Aralıklı olarak 210 saatlik soğuk etkisi uygulanan kesitlerde kontrol ve diğer deney koşullarına oranla daha sık olmak üzere hücre yüzeyinde endositoza ilişkin görüntülere rastlandı. Granüllerin salgılanmasından sonraki evrede lizozomal yapıların daha sık görülmesi, endositoz ile alınan membranların çoğunlukla lizozomlarda parçalanabileceği kanısını vermektedir. Sitoplazma içinde multi-veziküler cisimler (mvc) sıçan gangliyon hücrelerinde (11), trakea

epiteli hücrelerinde (51) Paneth hücrelerinde (27) uterus yüzey epitel hücrelerinde (43) sözedildi. Bunlar daha çok Golgi kompleksi yakınında gözlemlendi. Multiveziküler cisimcik içindeki veziküllerin çoğunun multiveziküler cismin yüzey membranının katlanmasıyla oluştuğu kabul edilir (6,24,25,38). Bu durum lizozomal hidrolazın alınmasından önce yada sonra görülebilir. İnsulin verilmesinden sonra surrenal medullasında görülen yoğun cisimciklerin, multiveziküler cisimlerden kaynaklandığı düşünülmüştür (26). Multiveziküler cismin bileceğidir (25). Endositoz yoluyla alınan vezikül ve tubulilerden yeni membranların multiveziküler cisme eklenebileceği (12,24,38), bu cisimciklerin otofajik rolleri olabileceği belirtilmiştir (6,13,24,54).

Son yıllardaki bazı çalışmalarda kromaffin granüllerin veziküler yapılar içerdikleri, bunun diğer hücrelerde bulunan multiveziküler cisimlere benzediği öne sürülmüştür (44). Bununla beraber ikisi arasında lokalizasyon ve fonksiyonel olarak önemli farklar vardır; birçok hücrede multiveziküler cisimler Golgi yakınında lokalize olur, oysa vezikül içeren kromaffin granüller sitoplazmanın her tarafına yayılmıştır. Fonksiyonel olarak multiveziküler cisimler (mvc) ve kromaffin granüller çok farklıdır. Multiveziküler cisimler prelizozomal yapılar, bunlar lizozomların yeniden kullanılmayan endositoz materyelini sindirmek için saldırdığı enzimleri içerirler. Kromaffin granüller ise salgı organelleridir. Bu nedenle yapısal benzerliklerine karşın vezikül içeren kromaffin granüller ve mvc, adrenal kromaffin hücrelerinin ayrı ve farklı organelleridir. Bu çalışmada, multiveziküler cisimcikler daha çok üçüncü deneysel grupta (24 saat süre ile soğukta bırakılan deney grubu) Golgi kompleksine ve lizozomlara yakın alanlarda gözlenmeleri bunların prelizozomal yapılar olabileceği görüşünü destekler.

Çeşitli hücre tiplerinde adrenal medullada membranla çevrili cisimcikler, lizozomlar, melanin granülleri Golgi bölgesinde gözlenmiştir (6,9,20,26,66) ve membranla sarılmışlardır. Bunlar membranla çevrenme yollarına bağlı olarak farklı hücrede farklı makromoleküler yapı gösterirler (66). Hücre yüzeyi membranı veya salgı granülün endoplazmik reitkulumdan oluşabileceği öne sürülmüştür. Endositoz yapan hücrelerin plazma membranı ve lizozomal membranlar ve salgı granülü membranları üzerine yapılan çalışmalarda (3, 15,40) bunların esas olarak yeniden kullanıldığı (40) ya da yeni sentez edildiği (4) konusunda farklı görüşler ileri sürülmüştür. İnsülin

verilen sıçan medulla hücrelerinde 4-9 saat sonra kontrollere oranla daha büyük asit fosfataz içeren cisimcikler ve çok sayıda peroksidaz içeren lizozomlar özellikle Golgi yakınında gözlemlendiler. Endositozla alınan membranın lizozomda parçalandığı ve bunun sonradan salgı granülü etrafında çevrelendiği ileri sürülmüştür. Ekzositoz bölgesinde hamster medullasında yüzey membranından veziküllerin oluşumu ve plazma membranı, salgı granülü veya vezikül membranı arasındaki fark biyokimyasal çalışmalarla açıklanmıştır (54).

Bu çalışmada lizozomal yapılar kontrol preparatlarda az sayıdaydı, deneysel koşullarda daha sık ve daha büyük, genelde elektro-yoğun homojen bazen heterojen görünümdeydi. Ekzositozun en sık gözlemlendiği evrede lizozomların artması, bu evrede hücre içine alınan membranın lizozom da parçalanabileceği görüşüne uymaktadır.

Lipidin, hipofiz çalışmalarında sitoplazmada bir tip residuel cisim şeklinde birikebileceği gösterilmiştir (54). Hipofizde residuel cisimlerin otofajik yolla oluştuğu belirtilmiştir. Sıçan medullasında insulin verilmesinden sonra hücrelerde gözlenen lipidlerin endositoza bağlı oluştuğu kabul edilir (1). Lipidin sonradan ne olduğu konusu ise tartışmalıdır, hücre tarafından yeniden kullanılabilirliği öne sürülmüştür. Bu çalışmada, ışık mikroskobu için hazırlanan Sudan siyahı preparatlarında korteks bilindiği gibi daima çok belirgin lipid damlaları içerdiği halde kontrol hayvanda medullada çok az sayıda boyalı damlacıklar görüldü. Deney koşullarında soğuk etkisinden aralıklı olarak 210 saat sonra, endositozun en sık rastlandığı evrede lipid damlalarının artması bunların endositoza bağlı olarak oluşabileceği görüşünü destekler. Medulla hücreleri sırasındaki desmozomlar kontrol ve deneysel gruplarda benzer şekilde gözlemlendi. Sempatik gangliondaki küçük granül içeren hücrelerde gözlenen «somatik efferent» sinapsına benzeyen özel tip bağlantı yapısına bu çalışmada rastlanmadı (43, 52,63). Son yıllarda kromaffin hücreleri arasında bulunan farklı özellikteki hücre tipleri üzerinde çalışmalar yapılmıştır (44). Sıçan medulla hücrelerinde immüno-elektron-mikroskobik olarak uygulanan bir çalışmada VIP benzeri immünoreaktif hücreler gözlenmiştir. Vazoaktif intestinal polipeptid (VIP), orijinal olarak domuz duodenumundan izole edilmiş. Fakat bunun santral ve periferik sinir sisteminde yaygın olduğu kanıtlanmıştır. Memeli surrenal bezinde VIP benzeri immun reaksiyon sıçan ve insan medullasında bazı meduller hücrelerde gösterildi (30,35). Işık ve elektron mikroskobu ile VIP immüno reaktif kromaffin hücreler, medulladaki reaktif olmayan diğer

hücrelere komşu olarak ve pencereci endotel hücreleri yakınında gözlemlendi. Surrenal korteksi hücrelerinin farmakolojik etkisi üzerinde çeşitli açıklamalar olmasına karşın, VIP'in surrenal medullasının fonksiyonu konusunda kesin fizyofarmakolojik yeterli kavramlar olmadığı açıklanmıştır (44). Bu konunun daha ileri çalışmalara gereği açıktır.

ÖZET

Soğuk stresi etkisiyle kobay medullası adrenal hücrelerindeki değişiklikler ışık ve elektron mikroskobu düzeyinde incelendi. Soğuk stresi altındaki ikinci deney süresinde medulla hücrelerinde en çok göze çarpan değişiklik salgı granüllerinde bulundu. Salgı granüllerinin ikinci deney süresinde kısmen, üçüncü deney süresinde tamamen salındığı gözlemlendi. Soğuk etkisinden sonra normal oda ısısına alındıktan 48 saat sonra yeni granül oluşumunun varlığı ile granül miktarında çoğalma görüldü. Salgılaşma biçiminin ekzositoz yoluyla olduğu gözlemlendi. Sitoplazmadaki diğer organeller, lizozom, lipid ve multiveziküller cisimlerdeki değişiklikler literatür ışığında tartışıldı. Işık mikroskopik incelemelerde uyguladığımız kurşun asetat boyasının kromaffin hücrelerinin, korteks hücrelerinden belirgin biçimde ayırdolunmasını sağladığı belirtildi.

ABSTRACT

**The changes in adrenaline cells of adrenal medulla due to cold stress.
Light and electron microscopic studies**

The alterations in the adrenaline cells of the guinea pigs adrenal medullae which were exposed to cold stress were observed in light and electron microscopy. In the second experiment the most conspicuous difference was on the secretory granules. There was a partial depletion of the secretory granules in the second experiment (to cold exposure for 15 hours/day) and total depletion on the third experiment (to cold exposure for 210 hour in days). After cold stress, the guinea pigs were exposed to the room temperature and 48 hours later there was a marked increase in the number of the secretory granules and it was observed that the secretion was achieved by exocytosis. The alterations on the other cytoplasmic organelles such as lysosomes, lipids and multivesicular bodies were also discussed. It was also determined that the lead acetate staining which is used in the light microscopy techniques had notably ensured to differ the chromaffin cells from the cortex cells.

KAYNAKLAR

1. Abrahams, S.J. and Holtzman, E. : Secretion and endocytosis in insulin stimulated rat adrenal medulla cells. *The Jour of Cell Biol.* 50 : 540-558, 1973.
2. Agostini, B., Taugner, G. : The membrane of the catecholamine storage vesicles of the adrenal medulla. *Histochemie.* 33 : 255-272, 1973.
3. Amsterdam, A., Ohad, I., and Schramm, M. : Dynamic changes in the ultrastructure of the acinar cell of the rat parotid gland during the secretory cycle. *J. Cell Biol.* 41 : 753, 1969.
4. Amsterdam, A., Schramm, M., Ohad, I., Salomon, Y. and Selinger, Z. : Contomitant synthesis of membrane protein and exportable protein of the secretory granule in rat parotid gland. *J. Cell Biol.* 50 : 187, 1971.
5. Arefolov, V.A. : Ultrastructural morphometric analysis of adrenaline and noradrenaline containing cells in rat adrenals during physical and emotional stress. *Biull Eksp. Biol. Med.* 95 : 101, 1983.
6. Arstila, A., Jauregui, H. : Studies on cellular antophagocytosis. *Lab. Invest.* 24 : 162, 1971.
7. Bardakhch, E.A. : Changes in the ultrastructure of the adrenal medulla and cortex during endotoxic shock. *Biull Exsp. Biol. Med.* 97-100,102(7), 1986.
8. Becker, N.H., Novikoff, A.B. and Zimmerman, H.M. : Fine structure observations of the uptake of intravenously injected peroxidase by the rat choroid plexus. *J. Histochem. Cytochem.* 15 : 160, 1967.
9. Benedeczky, I. and Smith, A.D. : Ultrastructural studies on the adrenal medulla of golden hamster. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 124 : 307, 1972.
10. Camanni, F. and Molinatti, G.M. : Selective depletion of noradrenalin in the adrenals of the hamster produced by reserpine. *Acta Endocrin.*, 29 : 369-374, 1958.
11. Carmichael, S.W. : Scanning electron microscopy of the mamalian adrenal medulla. *Mikroskopie.*, 40 : 53-64, 1983.
12. Coupland, R.E. : The natural history of the chromaffin cell. *The Anat. Rec.*, 175 : 77-86, 1965.
13. Coupland, R.E. and Mopwood, D. : Mechanism of a histochemical reaction differentiating between adrenaline and noradrenaline. *Storing Cell. Nature.*, 209 : 590-591, 1966.
14. DeRobertis, E. : A multivesicular cat echol-containing body of the adrenal medulla of the rabbit. *Exp. Cell Res.*, 12 : 575-581. 1957.
15. DeRobertis, E. and Ferreira, A.Z. : Electron microscope study on the excretion of cat echol-containing droplets in the adrenal medulla. *Exp. Cell Res.*, 12 : 568-574, 1957.
16. Douglas, W.W. and Nagasawa, J. : Membrane vesiculation at sites of exocytosis in the neurohypophysis, adenohypophysis and adrenal medulla. *J. Physiol.*, 218 : 94, 1971.
17. Duncan, D. and Yates, R.D. : Ultrastructure of the carotid body of the cat as revealed by various fixatives and the use of reserphine. *Anat Rec.*, 157 : 667-681, 1967.
18. Duve, D.C. : Tissue fractionation, past and present. *J. Cell Biol.* 50 : 20, 1971.

19. Elfvin, L. : The fine structure of cell surface of chromaffin cells in the rat adrenal medulla. *J. Ultrastruct. Res.*, 12 : 263, 1965.
20. Elfvin, L. : The development of secretory granules in the rat adrenal medulla. *J. Ultrastruct. Res.*, 17 : 45, 1967.
21. Eranko, O. and Hopsu, V. : Effect of reserpine on the histochemistry and content of adrenalin and noradrenalin in the adrenal medulla of the rat and mouse. *Endocrin.*, 62 : 15-23, 1958.
22. Eronko, O. : Distribution and concentration of adrenalin and noradrenalin in the adrenal medulla of the rat following reserpine induced depletion. *Acta Physiol.* 57 : 239-246, 1961.
23. Essner, E. and Novikoff, A.B. : Cytological studies on two functional hepatomas interrelations of endoplasmic reticulum. Golgi apparatus and lysosomes. *J. Cell Biol.* 15 : 289.
24. Golding, D.W., Bayraktaroğlu, E. : Exocytosis of secretory granules probable mechanism for the release of neuro modulators in vertebrate neuropiles. *Experientia* 40 : 1277-1280, 1984.
25. Golding, D.W., Pow, D.V. : Neuro secretion by a classic cholinergic innervation apparatus. A comparative study of adrenal chromaffin glands in your vertebrate species. *Cell Tis. Res.*, 249 : 421-425, 1987.
29. Hillarp, N.A., Nilson, B. : The cytology of the adreno-medullary cells with special reference to the storage and secretion of the sympathomimetic amines. *Acta Anat.* 21 : 155-167, 1954.
30. Hirsch, J.G. and Fedorko, M.E. : Vesicle fusion and formation at the surface of pinocytotic vacuoles in macrophages. *J. Cell Biol.*, 38 : 629, 1968.
31. Holly, A.D. : The fine structure of the paneth cell. *J. Anat.* 92 : 268-277, 1988.
32. Holtman, E., Novikoff, A.B. : Lysosomes and GERL in normal neurons of the rat ganglion nodesum. *J. Cell Biol.*, 33 : 419, 1967.
33. Holtman, E., Novikoff, A.B. : Lysosomes in the rat sciatic nerve following crush. *J. Cell Biol.*, 27 : 651, 1965.
34. Honore, L.H. : A light and microscopic method for the differentiation of noradrenaline and adrenaline producing cells of the rat adrenal medulla. *The Jour. of Histochem-Cytochem.*, 19 : 483, 1971.
35. Hopwood, B. : The histochemistry and electron histochemistry of chromaffin tissue. *Histochem-Cytochem.* 3 : 1-10, 1971.
36. Hökfelt, I., Lundberg, J.M. : Immunohistochemical evidence for local VIPergic neuron system in the adrenal gland of the rat. *Acta Physiol. Scand.*, 113 : 575-576, 1981.
37. Husebye, E.S. : Characterization of phospholipase activities in chromaffin granule ghosts isolated from the bovine adrenal medulla. *Biochem. Biophys. Acta.* 31 : 920, 1987.

38. Jamieson, J.D. and Palade, G.E. : Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell II-Transport to condensing vacuoles and zymogen granules. *J. Cell. Biol.* 34 : 597, 1967.
39. Kikuta, A. : Relationship between chromaffin cells and blood vessels in the rat adrenal medulla a transmission electron microscopic study combined with blood vessel reconstructions *Am. J. Anat.* 170 : 73, 1984.
40. Lange, W. : Untersuchungen mit der PAS und Male-PAS reaktion am nebenhieren mark der weissen Ratte beim kälte stress. *Acta Histochem.*, 28 : 263, 1967,
41. Linnoila, R.I. : Distribution of (met) and (leu) enkephalin vasoactive
42. Magni, M.P.V. : A radioautographic study with H^3 -thymidine on adrenal medulla nuclei of rats intermittently exposed to cold. *The Jour. of Cell Biol.*, 28 : 9-19, 1986.
43. Monkhouse, W.S. : The effect of in vivo hydrocortisone administration on the labelling index of the intra and extra adrenal chromaffin tissue of the fetal and perinatal mouse. *J. Anat.*, 140 : 679, 1985.
44. Masur, S.K., Holtzman, E. : Hormone stimulated exocytosis in the toad urinary bladder. Some possible implications for turnover of surface membranes. *J. Cell Biol.* 52 : 211, 1972.
47. Melddesi, J. : Composition of cellular membranes in the pancreas of the guinea pig. *Cell Biol* 49 : 109, 1971.
48. Nilsson, O. : Ultrastructure of mouse uterine surface epithelium under different astrogenic influence 2. early effect of estrogen administered to spayed animals. *J. Ultrast. Res.* 2 : 73, 1958.
49. Ornberg, R.L. : Intra granular vesicles new organelles in the secretory granules of adrenal chromaffin cells. *Tissue Res.* 245 : 547. 1986.
50. Ornberg, R.L. Reese T.S. : Beginning of exocytosis captured by rapid freezing of limulus amoebocytes. *J. Cell Biol.*, 90 : 40, 1981.
51. Pohorecky, L.A. : Adrenocortical control of epinephrine synthesis. *Pharmacol Rec.* 27 : 1, 1971.
52. Pearse, A.G.E. : *Histochemistry, theoretical and applied* third. ed. Churchill Ltd. 1968 London.
53. Palade, G.E. : A small particulate component of the cytoplasm. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1 : 59, 1955.
54. Pelleter, G. : An ultrastructural study of sites of granule extrusion in the rat. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 118 : 501, 1971.
55. Pezzi, P.S., Vavicchia, I.C. : Explants of rat adrenal medulla a light and electron microscopic study. *Anat. Rec.* 175 : 77-86.

56. Rhodin, J. : Electron microscopy of the tracheal ciliated mucosa in rat. *Zeit. für Zellfor.* 44 : 345-412, 1956.
57. Singh, D.N. : Adrenomedullary chromaffin cells of the rat an ultrastructural study. *Acta Anat* 129 : 329, 1987.
58. Siegrist, G., Dunant, Y. : Ultrastructural and jonetion of the choromaffin cells in the siperior cervical ganglion of there rat. *J. Ultrastruc. Res.* 25 : 381-407, 1968.
59. Smith, R.E., Farguhan, M.G. : Lysosome function in the regulation of the secretory process in cells of the anterior pituitary gland. *J. Cell Biol.* 31 : 319, 1966.
60. Smith, J.E. and Reese, T.S. : Use of aldehyde fixative to determine the rate of synaptic transmitter release. *J. Exp. Biol* 89 : 19-29, 1980.
61. Tramezzani, J.H. : A technique for light and electron microscopie identification of adrenalin and noradrenalin stoning cells. *The Journal of Histochem and Cytochem.* 12 : 890, 1964.
62. Unsicker, K. : Differantitation and transdifferanetiation of adrenal chromaffin cells of the guinea pig. *Cells Tiss. Res.* 229 : 1983.
63. Unsicker, K., Tschechne, B. : Differentiation and transdifferantiation of adrenal chromaffin cells of the guinea-pig. *Cell. Tic*, 1981.
64. Verwoer, D, and Verwoerd, M.L. : Evolution de la teneur en acide deoxyribonucleigues des noy aux de la medillo-surrenale de rat pendant et après un stress chrorigue au froid. *Arch. Biol.* 74 : 51,
65. Viola-Magni, M.P. : Changes in the DNA content of adrenal medulla nuclei of rats intermittently exposed to cold. *J. Cell Biol.* 24 : 415, 1965.
66. Wetzstein, R. : Electromikroskopisch untersuchungen an Nebennieren mark von maus, Meerschweinchen und Katze. *Zeit für Zellfor.* 46 : 517-576, 1964.
67. Wood, J.G., Secling, L.L. : Cytochemistry of epinephnine and norepinephnine adrenomedullary Cells. *Histochimie* 28 : 183, 1971.
68. Whaley, W.G. : Golgi apparatus influence on cell surfaces. *Science* 175 : 596, 1972.
69. Yates, R.D. : An electronmicroscopic study of the effects of reserpine on adreno-medullary cells of the syman hamster 146 : 29-34, 1963.
70. Yates, R.D. : A light and electron microscopic study correlating the chromaffin reaction and granule ultrastructure in the adrenal medulla of thy syrian hamster. *Anat Rec.* 149 : 237-250, 1964.
71. Yokota, R. : The granule containing cell somata in the superior cervical ganglion of the rat as studied by a serial sampling method. *Z. Zellforsch* 141 : 331, 1973.