

흰쥐의 소뇌에서 selenium 방법에 의한 아연이 함유된 세포의 확인

조 현 욱 · 최 은 상*

순천대학교 자연과학대학 생물학과

*Dept. of Anatomy and Cell Biology, East Carolina University
School of Medicine, Greenville, U.S.A.

Identification of the Zinc-containing Cells in the Cerebellum of Rat by Selenium Method

Cho, Hyun Wook and Eun Sang Choe*

Dept. of Biology, College of Natural Sciences, Suncheon National University

*Dept. of Anatomy and Cell Biology, East Carolina University,
School of Medicine, Greenville, U.S.A.

(Received September 14, 1996)

ABSTRACT

A zinc-specific method (selenium method) has been employed to identify the zinc-containing cells in the cerebellum of the rats. When rats were allowed to survive 24 hours after the sodium selenite administration, zinc selenide reaction products formed in zinc-containing cellular boutons are retrogradely transported to the somata of those boutons. And the zinc selenide products accumulated in somata of the cells can be rendered visible by silver amplification of developer. Zinc-containing cells identified by the method were Bergmann glial and granule cells. Labeled zinc-containing cells were absent in molecular layer and white matter of the cerebellum. In ultrastructural level, the zinc selenide products were located in lysosomes of somata of the zinc-containing cells.

Key words : Zinc-containing cell, Selenium method, Bergmann glial cell, Granule cell,

서 론

중추신경계 내에 있는 내재성 아연의 존재는 여러가지

조직화학적 방법, NeoTimm (Danscher, 1981), selenium (Danscher, 1982), dithizone (Frederickson and Howell, 1984) 혹은 quinoline (Frederickson *et al.*, 1987) 방법들에 의해 확인될 수 있으며 또한 원자흡수분광광도계를 이용한 방법 (Hu and Friede, 1968; Danscher *et al.*, 1976; Sato *et al.*, 1984; Taya-

* 1996년도 순천대학교 자체연구비 지원에 의하여 연구된 논문임

rani *et al.*, 1989)에 의해 입증될 수 있다.

이러한 내재성 아연의 기능에 대하여, 아연의 분포와 공간적 행동과의 관련성이 있고 (Valdes *et al.*, 1982), 분비과립 내에서 분비물질의 packaging에 관여하며 (Frederickson and Danscher, 1988), 아연 양이온이 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체 통로의 전류를 감소시키고 (Christine and Choi, 1990), Alzheimer 환자의 대뇌의 해마 부위에서는 아연의 양이 감소되어 있으며 (Constantinidis, 1990), gamma-aminobutyric acid (GABA)의 방출과 관련성이 있고 (Xie and Smart, 1991), 그리고 아연이 신경전달에 관계 (Sloviter, 1985; Khulusi *et al.*, 1986; Frederickson and Danscher, 1990; Vener and Loeb, 1992) 한다는 보고 등이 있다. 특히 뇌의 해마 부위에 높은 농도의 아연이 존재한다는 보고 (Hu and Friede, 1968; Harrison *et al.*, 1968) 이후에 이 부위에서 아연의 위치나 아연의 염색양상 (Haug, 1973; Zimmer and Haug, 1978; Frederickson and Danscher, 1988; Holm and Geneser, 1989)에 대하여 연구가 이루어졌다.

뉴우런 중에서도 아연을 갖고 있는 뉴우런을 아연이 풍부한 뉴우런 (zinc enriched neuron, ZEN neuron) 이라고 하는데, 이런 내재성 아연은 ZEN neuron의 축삭말단 bouton내의 vesicle에 존재하고 있다 (Danscher, 1984; Pérez-Clausell and Danscher, 1985; Christensen *et al.*, 1992). selenium 방법에 의하면, sodium selenite를 주입하고 24시간 생존시킨 후에 회생시키면 ZEN neuron의 bouton에 있던 아연이 주입된 selenium과 결합하여 zinc selenide 를 형성하고 이 반응물이 축삭을 거슬러 수송되어 (역행수송) 그 ZEN neuron의 세포체에 침전되며 발색제의 은 증폭 (silver amplification)에 의해 반응물의 크기가 증폭되어 광학이나 혹은 전자현미경으로 볼 수 있게 된다 (Danscher, 1984; Slomianka *et al.*, 1990; Mandava *et al.*, 1993). 그런데 생존시간을 1시간 혹은 그 보다 더욱 짧게 할 경우, zinc selenide 반응물은 아연의 원래 위치인 ZEN neuron의 축삭 bouton 내에 제한되어 위치한다고 하였다. 따라서 이 방법을 이용하여 아연이 함유된 세포의 확인 및 세포체의 분포를 알 수 있거나 혹은 아연이 함유된 bouton의 위치를 찾아 낼 수 있다.

응용면에서 보면 이 selenium 방법을 사용하여 중추 신경계내에 축적된 수은의 위치를 조직과 미세구조면에서 확인할 수 있으며 (Møller-Madsen and Danscher, 1986, 1991; Schiønning and Møller-Madsen, 1991), 그리고 신장에서 축적된 수은의 위치가 (Nørgaard *et al.*, 1989) 보고된 바 있다. 생물체내에 있는 내재성 혹은 외부로부터 유입되어 축적된 금속을 은 증폭과정을 거쳐 조직화학적이거나 세포화학적으로 확인하는 방법이 autometallography (AMG)이다.

본 논문에서는 앞에서 언급된 sodium selenite 를 피하주사하고 24시간 생존 후에 회생시켜 은 증폭과정을 거치는 selenium 방법으로 흰쥐의 소뇌에 있는 아연이 함유된 세포체의 세포종류를 확인하고 이들의 염색양상을 밝히고자 한다. 소뇌에서 아연에 대한 기존의 연구로는 Timm 방법을 이용한 보고 (Haug, 1973; Szerdahelyi and Kása, 1985) 그리고 NeoTimm 방법을 이용한 보고 (Pérez-Clausell, 1988) 등이 있다. 특히 Farkas 등 (1988)은 energy dispersive X-ray microanalysis를 사용하여 Purkinje 세포에 있는 아연의 농도를 측정하였다.

재료 및 방법

평균 체중 350 g 되는 성체 Kyoto 흰쥐 14마리를 암수 구별하지 않고 사용하였다. sodium selenite (Na_2SeO_3) 100 mg를 증류수 10 ml에 용해하고 이 용액을 체중 kg 당 8 mg양으로 피하주사하였다. 24시간 생존시킨 후에 sodium pentobarbital로 마취시키고 3% glutaraldehyde를 포함하는 인산염 완충용액 (pH 7.4)으로 140 mmHg에서 10분간 관류시켜 회생시키거나 혹은 단독하여 회생시키고 두개골에서 뇌를 적출하였다.

1. 광학 현미경 방법

관류시켜 회생시킨 흰쥐의 뇌는 30% sucrose 용액에 가라 앉을 때 까지 담가두었다가 꺼집어 내어 CO_2 가스로 동결시켰다. 단두도살된 쥐의 뇌는 곧 바로 CO_2 가스로 동결시켰다. 동결된 뇌를 냉동절편기 내에서 30 μm 두께의 횡단 혹은 전두단면의 동결절편을 만들어서 슬라이드에 붙이고 실온에서 건조시켰다. 건조된 절편을 최근에 발표된 은 증폭 방법인 Danscher와 Montagnese

(1994)의 발색제에서 빛이 차단된 상태로 1시간 동안 담가두어서 발색시켰다. 발색제의 조성은 다음과 같이 하였다.

- 1) Protective colloid: natural gum arabic resin 1 kg을 이차중류수 2l에 넣고 가끔씩 저어주면서 5일동안 용해시킨 후 여러겹의 gauze로 여과시킨다.
- 2) Citrate buffer: citric acid 25.5 g과 sodium citrate 23.5 g을 중류수에 용해하고 전체 양을 100 ml로 만든다.
- 3) Reducing agent: hydroquinone 0.85 g을 45°C의 중류수 15 ml에 녹인다.
- 4) Silver ion supply: 빛이 차단된 상태에서 Silver lactate 0.11 g을 40°C의 중류수 15 ml에 용해시킨다.

이어서 위의 protective colloid 용액 60 ml, citrate buffer 10 ml, reducing agent 용액 15 ml를 혼합하고 발색 과정 직전에 silver ion supply 용액 15 ml를 가하여 발색제를 제조하였다.

발색제에서 꺼집어낸 절편을 40°C의 흐르는 수돗물에 45분간 수세하고 중류수에 한번 더 수세하여 2% Farmer 용액 (2% sodium thiosulfate 9 part와 2% potassium ferricyanide 1 part 혼합)에 10초간 담가두었다가 중류수에 수세하고 1% toluidine blue로 counterstain하였다. 중류수에 수세하고 탈수과정을 거쳐 Damar resin으로 봉입하고 광학 현미경으로 관찰하였다.

2. 전자 현미경 방법

관류시켜 희생된 흰쥐의 두개골에서 뇌를 적출하여 vibratome 으로 150 μ m 두께의 절편을 만들고 이 절편을 앞의 광학현미경 방법에서 언급된 발색제에 담가두었다. 절편을 꺼집어내어 40°C의 흐르는 수돗물에 45분간 수세하고 중류수에 한번 더 수세하였다. 10% Farmer 용액 (10% sodium thiosulfate 9 part와 2% potassium ferricyanide 1 part 혼합)에 10초간 담가두었다가 중류수에 수세하고 osmium tetroxide로 처리하며 탈수과정을 거쳐 Epon에 포매하였다. 3 μ m 두께의 semi-thin 절편을 만들어 1% toluidine blue로 염색하고, 광학현미경으로 관찰하여 선택한 절편을 다시 Epon에 포매 (re-embedding)하고 ultratome으로 thin sec-

tion을 만들어서 uranyl acetate와 lead citrate로 염색하고 전자현미경으로 관찰하였다.

결 과

1. 광학 현미경 관찰 결과

소뇌의 조직학적 구조는 toluidine blue의 대조염색으로 인해 분자층, Purkinje 세포층, 과립층 및 백질이 선명하게 관찰되었으며 Purkinje 세포층에 아연 셀레나이드 반응물이 침전되어 있는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 1a). 관류하여 희생시킨 흰쥐에서 얻은 절편의 경우 (Figs. 1b, 1c) 단두도살하여 얻은 절편보다 (Fig. 1d) 선명하게 아연반응물이 bouton으로부터 돌기를 통하여 역행수송되어 Purkinje 세포 주위의 Bergmann 교세포의 세포체에 모래알갱이 모양으로 침전되었다. 이들 아연반응물이 Purkinje 세포체 주위와 분자층에 집중되어 있어서 Purkinje 세포에 침전된 것으로 보이나 Purkinje 세포가 중복되어 나타나는 조직에서 보면 Purkinje 세포 주위에 있는 Bergmann 교세포의 세포체와 돌기에 침전되어 나타남을 알 수 있었다 (Fig. 1c).

2. 전자 현미경 관찰 결과

역행수송되어 침전된 아연 셀레나이드 반응물이 Purkinje 세포의 세포체에, 혹은 Bergmann 교세포의 세포체에 위치하는지를 더욱 확인하기 위하여 전자 현미경 관찰결과, 그 반응물은 Bergmann 교세포의 세포체 리소솜 내에 많은 과립형태로 침전되어 나타났다 (Fig. 2). 광학 현미경 하에서 아연결합물이 길게 줄 지어서 관찰되었던 것처럼 전자 현미경에서도 리소솜 내에 과립 형태로 침전된 아연결합물이 Bergmann 교세포의 돌기를 따라 길게 있는 것이 관찰되었다 (Fig. 2b). 과립층을 구성하면서 핵이 세포의 대부분을 차지하는 과립세포에서도 역행수송된 아연 반응물이 세포체내 리소솜에 소수의 과립 형태로 존재하였다 (Fig. 3).

고 찰

sodium selenite를 흰쥐에 피하주사하고 24시간 생존시킨후 희생시켜 뇌를 적출하고 절편을 만든 다음 발색제에 (Danscher and Montagnese, 1994) 담가서 은 증

폭 과정을 거쳐 현미경으로 내재성 아연의 존재를 확인하는 selenium 방법은 아연이 함유된 세포의 세포체 위치를 밝힐 수 있다. 이 방법을 이용하여 Slomianka 등 (1990)은 흰쥐의 대뇌피질과 해마 부위에서 많은 수의 ZEN neuron 세포체를 확인하여, 이 뉴우런이 종뇌의 정보과정에 관여할 것이라고 추측하였다. 조와 Danscher (1995)는 흰쥐의 연수에 있는 이 뉴우런의 세포체 분포를 밝혔다. Haug (1973)와 Szerdahelyi와 Kása (1985)는 Timm 방법을 이용하여 Pérez-Clausell (1988)은 NeoTimm 방법을 이용하여 신경세포층을 구성하는 Purkinje 세포가 아연을 함유하는 ZEN neuron으로 보고하였으나 selenium 방법을 이용한 본 연구에서는 24시간 생존후에 희생시킨 절편에서 아연결합물이 Purkinje 세포의 세포체에서 관찰되지 않았다. 이것은 Timm과 NeoTimm 방법이 sodium sulphide를 약 10분 동안 관류시켜 희생시킨 다음에 증폭시켜 관찰하는 방법이어서 ZEN neuron을 확인하기에는 시간이 부족한 것으로 생각되며 따라서 이러한 차이로 인한 결과로 추측된다. Farkas 등(1988)이 사용한 X-ray microanalysis도 간접적인 방법으로 Purkinje 세포내의 아연 농도를 측정한 것이었다. 즉, Timm 방법으로 흰쥐의 소뇌를 발색시키고 탈수와 건조과정을 거쳐 탄소로 coating 한 후 주사 전자현미경상에서 표준 아연농도와 비교하여 Purkinje 세포내의 아연농도를 분석한 자료이며 따라서, 결과적으로 Timm 방법을 사용하였기 때문에 본 실험결과와 다르게 나온 것으로 생각된다.

본 연구에서는 전자 현미경을 사용하여 아연이 함유된 세포의 종류를 더 정확하게 확인하고자 하였는데 Purkinje 세포의 세포질에는 아연 셀레나이드 반응물이 확인되지 않았으며 Purkinje 세포 주위에 있는 Bergmann 교세포의 세포질내 리소솜에서 아연반응물이 관찰되었다. 그리고 핵이 세포의 대부분을 차지하는 과립세포 세포체의 세포질내 리소솜에 소수의 아연반응물이 존재하였으며 결과적으로 소뇌에서 아연이 함유된 세포는 Bergmann 교세포와 뉴우런의 한 종류인 과립세포로 밝혀졌다. 아연반응물이 세포체의 리소솜에 모이는 것은 이들 결합물이 점차적으로 분해되는 대사과정을 거치며, 결국은 생존시간을 더욱 길게 했을 경우 분해되기 때문이다(Howell and Frederickson, 1989).

기존의 보고에 의하면 대뇌피질이나 해마 혹은 연수

부위에서 역행수송되어 ZEN neuron 세포체에 침전된 아연반응물은 균일한 크기였으며 그리고 세포체의 세포질 전체에 고르게 분포하고 있어서 이들 반응물의 침전에 의하여 세포체의 크기나 형태가 뚜렷했던(Slomianka *et al.*, 1990; Mandava *et al.*, 1993; Cho and Danscher, 1995) 면과는 대조적으로 본 연구의 Bergmann 교세포의 경우, 아연 셀레나이드 반응물이 역행수송되어 돌기를 따라 길게 침전되고 세포체 내에도 산만하게 분포되어 있었으며, 과립세포의 경우 단지 소수의 아연반응물이 세포체의 세포질에 나타나서 기존에 보고된 결과와 차이를 보였다. 기존의 ZEN neuron 세포체에 침전된 아연반응물의 염색양상이 본 논문의 Bergmann 교세포에서와 다른 것은 뉴우런과 신경교 세포라는 차이에 의한 결과로 생각된다. 과립세포의 경우, 기존의 아연 반응물 염색양상과 다르게 극히 소수의 아연 반응물이 세포체의 리소솜에 나타났는데, 이 결과를 통해 분자층에 축삭을 내고있는 과립세포에서 그 자신의 축삭을 따라 있는 bouton은 그 크기가 작고 그 bouton속에 들어있는 아연의 양도 적다는 것을 의미하는 것으로 추측된다.

신경교 세포의 일종인 Bergman 교세포(Bergman 성상교세포, radial glial cell)는 뉴우런 발생시에 과립층에서 연막층까지 뻗어 있으며, 소뇌의 과립세포는 이 세포의 돌기를 지주삼아 분자층에서 과립층으로 이동해 올 수 있다(Rakic, 1973). 이 Bergman 교세포는 Purkinje 세포와 인접해 있으며 돌기의 말단에서 세포체 쪽으로 정보를 역행수송할 수 있는 능력이 있는 것으로 밝혀져 있다(Rakic, 1981).

결론

흰쥐의 소뇌에 있는 아연이 함유된 세포를 확인하기 위하여 아연에 특이한 방법(selenium 방법)을 사용하였다. sodium selenite를 흰쥐에 주입하고 24시간 생존시켰을 때, 아연이 함유된 세포의 bouton에서 형성된 아연 셀레나이드 반응물이 그 bouton을 가진 아연이 함유된 세포의 세포체로 역행수송된다. 그리고 세포체에 침전된 아연 셀레나이드 반응물이 발색제의 은 증폭에 의해 볼 수 있게 된다. 이 방법으로 확인된 아연이 함유된 세포는 Bergmann 교세포와 과립세포로 밝혀졌다. 소뇌의 분자층과 백질에서는 아연이 함유된 세포가 존재하지 않았다.

미세구조 수준에서, 아연 셀레나이드 반응물은 아연을 함유하는 세포의 세포체 리소솜에 위치하였다.

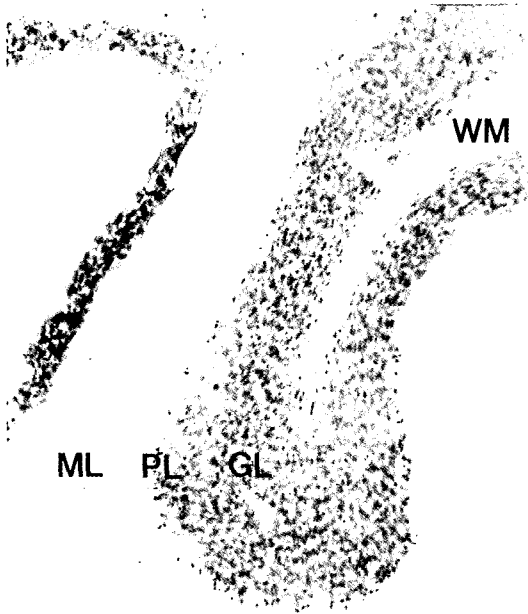
참 고 문 헌

- Cho HW, Danscher G, 1995. Distribution of zinc enriched (ZEN) neuron somata in the medulla oblongata of rat, *Korean J. Zool.* 38, 375-381
- Christensen MK, Frederickson CJ, Danscher G, 1992. Retrograde tracing of zinc-containing neurons by selenide ions: A survey of seven selenium compounds, *J. Histochem. Cytochem.* 40, 575-579
- Christine CW, Choi DW, 1990. Effect of zinc on NMDA receptor-mediated channel currents in cortical neurons, *J. Neurosci.* 10, 108-116
- Constantinidis J, 1990. Alzheimer's disease: The zinc theory, *Encephale* 16, 231-239
- Danscher G, 1981. Histochemical demonstration of heavy metals: A revised version of the sulphide silver method suitable for both light and electron microscopy, *Histochemistry* 71, 1-6
- Danscher G, 1982. Exogenous selenium in the brain: A histochemical technique for light and electron microscopical localization of catalytic selenium bonds, *Histochemistry* 76, 281-293
- Danscher G, 1984. Do the Timm sulphide silver method and the selenium method demonstrate zinc in the brain? In the neurobiology of zinc. Part A: Physiochemistry, anatomy, and techniques, eds. C.J. Frederickson, G.A. Howell, E.J. Kasarskis, Alan R. Liss, N.Y. p.273
- Danscher G, Fjordingstad EJ, Fjordingstad E, Fredens K, 1976. Heavy metal content in subdivisions of the rat hippocampus (zinc, lead and copper), *Brain Res.* 112, 442-446
- Danscher G, Montagnese C, 1994. Autometallo-graphic localization of synaptic vesicular zinc and lysosomal gold, silver and mercury, *J. Histochemistry* 17, 15-22
- Farkas I, Szerdahelyi P, Kása P, 1988. An indirect method for quantitation of cellular zinc content of Timm-stained cerebellar samples by energy dispersive X-ray microanalysis, *Histochemistry* 89, 493-497
- Frederickson CJ, Danscher G, 1988. Hippocampal zinc, the storage granule pool: Localization, physiochemistry, and possible functions, eds. J.E. Morley, M.B. Serman, J.H. Walsh, Academic Press, San Diego, p.289
- Frederickson CJ, Danscher G, 1990. Progress in Brain Research, vol 83, eds. J. Storm-Mathisen, J. Zimmer, O.P. Ottersen, Elsevier, Amsterdam-London-New York, p.71
- Frederickson CJ, Howell GA, 1984. Merits and demerits of zinc dithionite histochemistry. In the neurobiology of zinc. Part A: Physiochemistry, anatomy and techniques, eds. C.J. Frederickson, G.A. Howell, E. Kasarskis, Alan R. Liss, N.Y. p.289
- Frederickson CJ, Kasarskis EJ, Ringo D, Frederickson RE, 1987. A quinoline fluorescence method for visualizing and assaying the histochemically reactive zinc (bouton zinc) in the brain, *J. Neurosci. Methods* 20, 91-103
- Harrison WW, Netsky MG, Brown MD, 1968. Trace elements in human brain: Copper, zinc, iron, and magnesium, *Clin. Chim. Acta* 21, 55-60
- Haug F-MS, 1973. Heavy metals in the brain: A light microscope study of the rat with Timm's sulphide silver method. Methodological considerations and cytological and regional staining patterns, *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 47, 1-71
- Holm IE, Geneser FA, 1989. Histochemical demonstration of zinc in the hippocampal region of the domestic pig: I. Entorhinal area, parasubiculum, and presubiculum, *J. Comp. Neur.* 287, 145-163
- Howell GA, Frederickson CJ, 1989. A retrograde transport method for mapping zinc-containing fiber systems in the brain, *Brain Res.* 515, 277-286
- Hu KH, Friede RL, 1968. Topographic determination of zinc in human brain by atomic absorption spectrophotometry, *J. Neurochem.* 15, 667-685

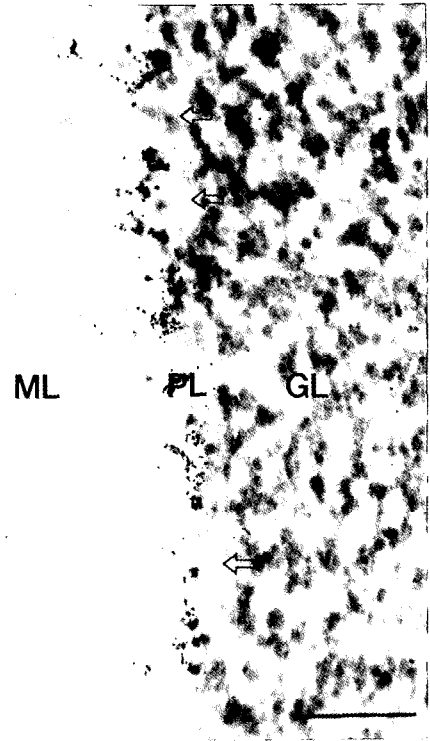
- Khulusi SS, Brown MW, Wright DM, 1986. Zinc and paired-pulse potentiation in the hippocampus, *Brain Res.* 363, 152-155
- Mandava P, Howell GA, Frederickson CJ, 1993. Zinc-containing neuronal innervation of the septal nuclei, *Brain Res.* 608, 115-122
- Møller-Madsen B, Danscher G, 1986. Localization of mercury in CNS of the rat. I. Mercuric chloride (HgCl₂) per os, *Environ. Res.* 41, 29-43
- Møller-Madsen B, Danscher G, 1991. Localization of mercury in CNS of the rat. IV. The effect of selenium on orally administered organic and inorganic mercury, *Toxicol. Applied Pharmacol.* 108, 457-473
- Nørgaard JOR, Møller-Madsen B, Hertel N, Danscher G, 1989. Silver enhancement of tissue mercury: Demonstration of mercury in autometallographic silver grains from rat kidneys, *J. Histochem. Cytochem.* 37, 1545-1547
- Pérez-Clausell J, 1988. Organization of zinc-containing terminal fields in the brain of the lizard *Podarcis hispanica*: A histochemical study, *J. Comp. Neur.* 267, 153-171
- Pérez-Clausell J, Danscher G, 1985. Intravesicular localization of zinc in rat telencephalic boutons: A histochemical study, *Brain Res.* 337, 91-98
- Rakic P, 1973. Kinetics of proliferation and latency between final cell division and onset of differentiation of cerebellar stellate and basket neurons, *J. Comp. Neurol.* 147, 523-546
- Rakic P, 1981. Neuronal-glial interaction during brain development, *TINS* 4, 184-187
- Sato SM, Frazier JM, Goldberg AM, 1984. The distribution and binding of zinc in the hippocampus, *J. Neurosci.* 4, 1662-1670
- Schiønning J, Møller-Madsen B, 1991. Autometallographic mapping of mercury deposits in the spinal cord of rats treated with inorganic mercury, *Acta Neuropathol.* 81, 434-442
- Slomianka L, Danscher G, Frederickson CJ, 1990. Labeling of the neurons of origin of zinc-containing pathways by intraperitoneal injections of sodium selenite, *Neurosci.* 38, 843-854
- Sloviter RS, 1985. A selective loss of hippocampal mossy fiber Timm stain accompanies granule cell seizure activity induced by perforant path stimulation, *Brain Res.* 330, 150-153
- Szerdahelyi P, Kása P, 1985. Demonstration of reduced levels of zinc in rat brain after treatment with d-amphetamine, but not after treatment with reserpine, *Histochemistry* 83, 181-187
- Tayarani I, Cloëz I, Clement M, Bourre JM, 1989. Antioxidant enzymes and related trace elements in aging brain capillaries and choroid plexus, *J. Neurochem.* 53, 817-824
- Valdes JJ, Hartwell SW, Sato SM, Frazier JM, 1982. Lateralization of zinc rat brain and its relationship to a spatial behavior, *Pharmacol. Biochem. Behavior* 16, 915-917
- Vener AV, Loeb J, 1992. Zinc causes tyrosine phosphorylation of hippocampal p60^{c-src}, *FEBS* 303, 261-264
- Xie X, Smart TG, 1991. A physiological role for endogenous zinc in rat hippocampal synaptic neurotransmission, *Nature* 349, 521-524
- Zimmer J, Haug F-MS, 1978. Laminar differentiation of the hippocampus, fascia dentata and subiculum in developing rats, observed with the Timm sulphide silver method, *J. Comp. Neurol.* 179, 581-617

FIGURE LEGENDS

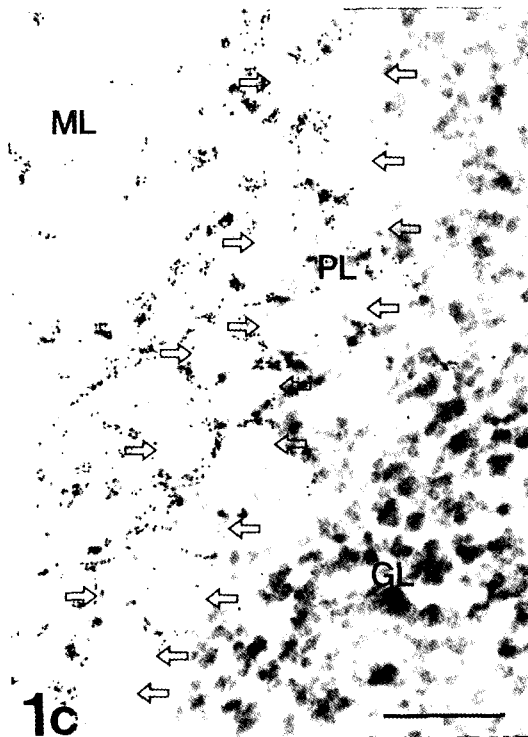
- Fig. 1.** a, Photomicrograph of a portion of cerebellum. Each lobule contains a core of gray matter composed of granular (GL), Purkinje cell (PL) and molecular (ML) layers and white matter (WM). The cryostat section from rat with 24 hours of survival time and perfusion. Scale bar is 200 μm .
- b and c, Photomicrograph of cerebella cortex. Labeled Bergmann glial cells in the Purkinje cell layer. Arrows indicate the somata of Purkinje cells. Zinc selenide reaction products are present in the cell body and in the process of the Bergmann glial cells. Scale bar is 50 μm .
- d, The cryostat section obtained from rat with 24 hours of survival time and decapitation. Scale bar is 50 μm .
- Fig. 2.** a, Electronmicrograph showing zinc selenide products in the lysosomes of cell body (arrowheads) and in the process (arrows) of Bergmann glial cell. BC, Bergmann glial cell; GC, granule cell; PC, Purkinje cell. Scale bar is 5.0 μm . Framed area is magnified in inset. Scale bar is 1.4 μm .
- b, Electronmicrograph of process from Bergmann glial cell containing zinc selenide products (arrows). Scale bar is 1.0 μm .
- Fig. 3.** Electronmicrograph showing zinc selenide products (arrows) in the cytoplasmic lysosomes of granule cells (GC). Scale bar is 1.7 μm .



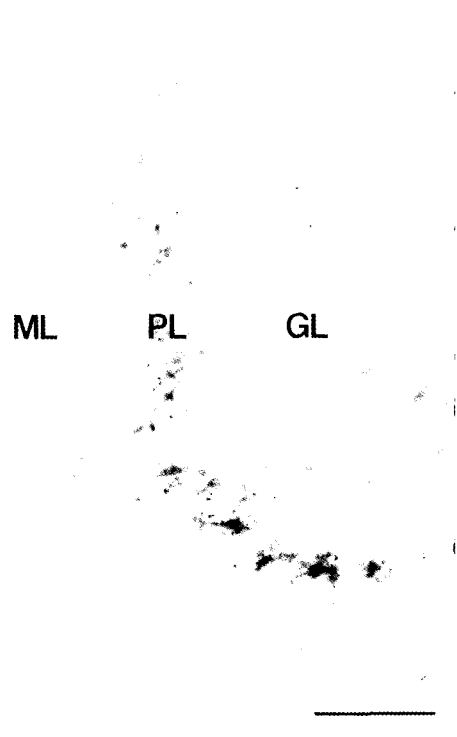
1a



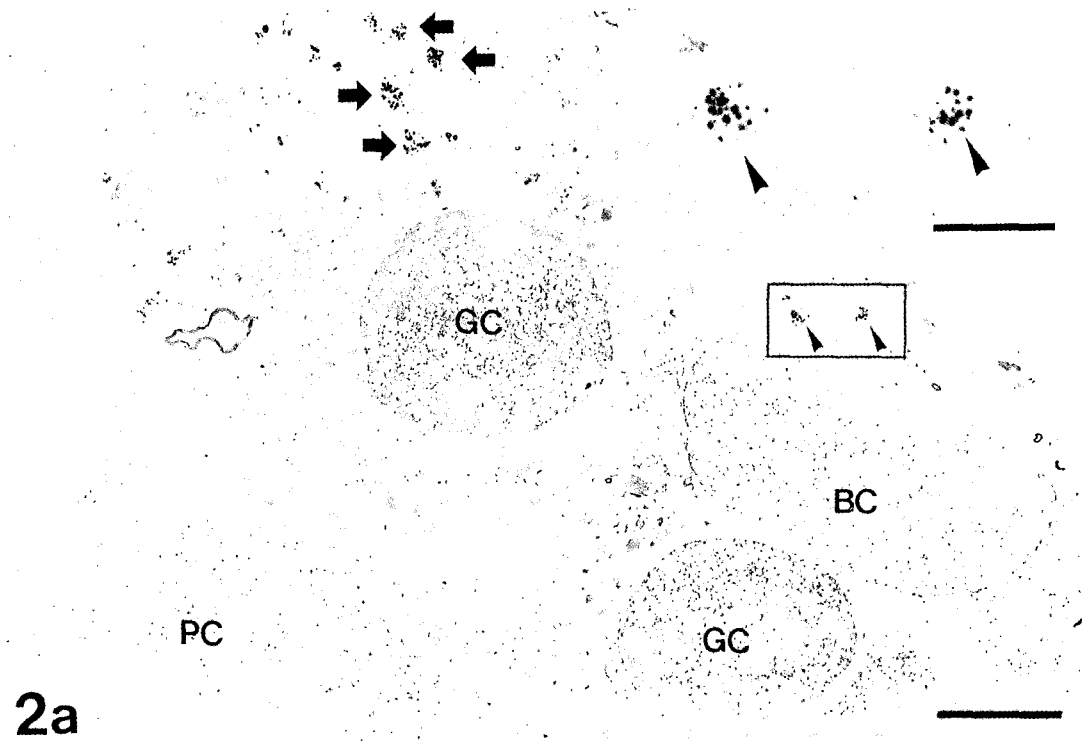
1b



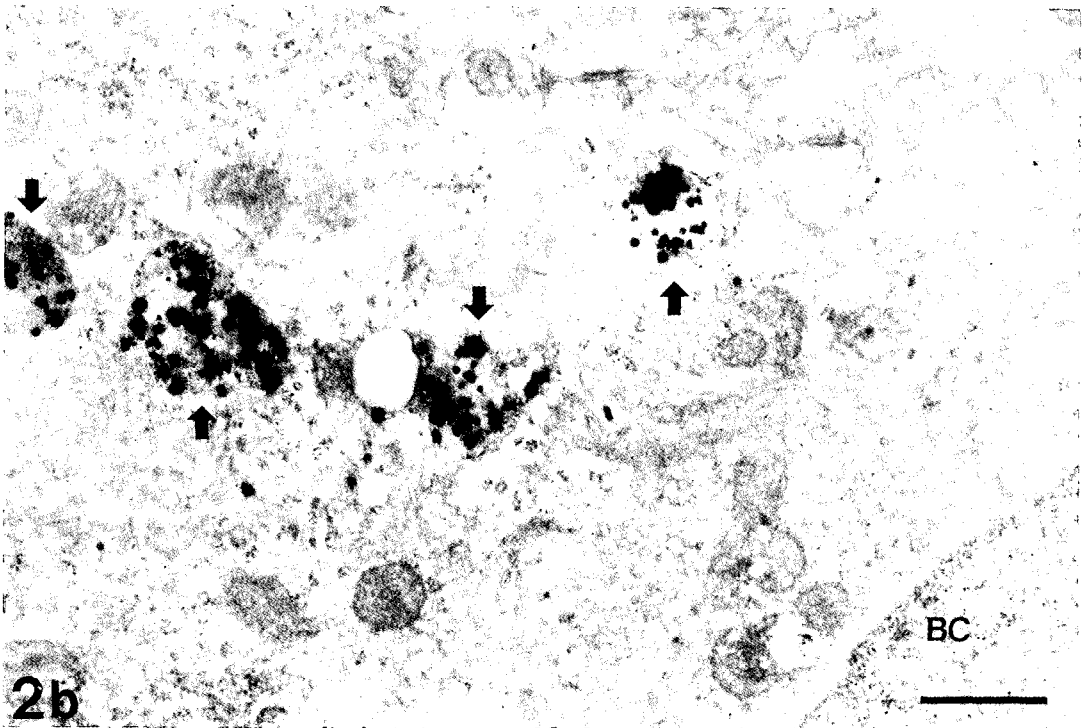
1c



1d



2a



2b

