

castrated-thyroidectomized rats. This shows clearly that this stimulating effect of progesterone to general metabolism is either a direct one or through other pathways than the thyroid.

When rats were treated with estrogen, followed by progesterone their oxygen consumption did not differ significantly from that of rats treated with either of these hormones alone.

F. A. SOLIMAN and Y. S. GHANEM

*Department of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, and Department of Zoology, Faculty of Science, Cairo University, Giza (Egypt), February 11, 1957.*

#### Résumé

Une seule dose de 2 µg d'estradiol a augmenté la consommation d'oxygène des rats castrés, seulement quand les thyroïdes étaient intactes. Une dose unique de 0,40 mg de progestérone a augmenté aussi la consommation d'oxygène des rats castrés, en présence ou absence des thyroïdes. À ces doses, il n'y a ni synergisme ni antagonisme entre l'estrogène et le progestérone dans leur influence sur la consommation d'oxygène.

### An Electron Microscope Study of Nerves in the Corneal Epithelium

There has been a long-standing difference of opinion as to whether or not certain epithelial nerve-endings are intracellular. The best known exponent of the intracellular view was BOEKE, who published his principal paper on the subject in 1925<sup>1</sup>; part of his work was on the cornea in vertebrates. The question has been discussed more recently by ZANDER and WEDDELL<sup>2</sup>, who were unable to agree with BOEKE that there are any intracellular nerve-endings in the cornea, and by ABRAHÁM<sup>3</sup>, who was also unable to find intracellular nerves in the corneal epithelium.

An investigation of the innervation of the cornea in mice, using electron microscopy, has shown that, in a sense, both sides are right. The accompanying illustrations show the position of the nerve fibres running in the basal layer of the epithelium of mouse cornea, fixed in buffered osmium tetroxide. The fibres, most of which are less than half a micron in diameter, are cut in approximately transverse section; they have emerged from the Schwann cell sheath before reaching this point. It will be seen that the fibres lie in deep grooves in the base of the epithelial cells, wrapped around by the membrane of the cell in such a way that, though they are external to the cell membrane, they are in a sense internal to the cell. BOEKE's drawings of the corneal epithelium of frogs and of *Falco* show fibres in just this position, though he could not, using the light microscope, make out the details of the course of the cell membranes. ZANDER and WEDDELL also state that the nerve fibres of this plexus are not beneath the basal layer of epithelial cells but within it; they thought that the fibres were running between the cells rather than enclosed within them.

BOEKE's drawings also show intracellular nerve fibres in the outer layers of the corneal epithelium. The

present investigation has not yet gone far enough to state positively whether the fibres which have risen above the basal layer are enclosed or not. Structures which appear to be nerve fibres have been seen in the intermediate layers of the epithelium, and in the inner layers of the flattened cells, sometimes in shallow grooves and sometimes between the cells; it is however much more difficult to identify nerve fibres with certainty in the outer layers of the epithelium, for they do not there have so regular an orientation as they do in the basal layer, and so may be confused with the interdigitating processes of the epithelial cells, described by JAKUS<sup>4</sup>.

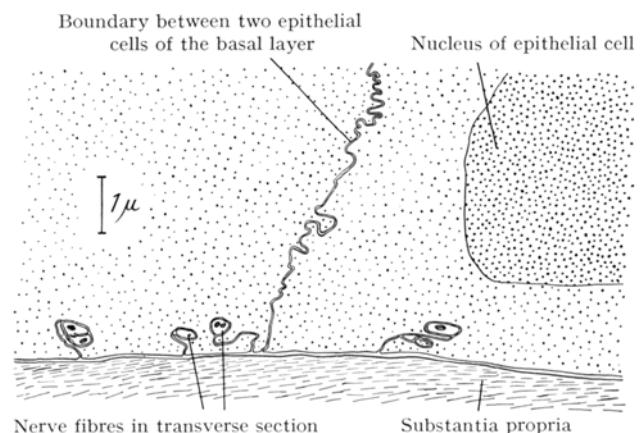


Fig. 1.—Mouse cornea. Diagram made by tracing from an electron-micrograph, showing parts of two epithelial cells of the basal layer, and nerve fibres cut in transverse section. The thickness and spacing of the cell membranes has been exaggerated.

WERSÄLL<sup>5</sup> has shown that, in the sensory epithelium of the cristae ampullares of the ear, the supporting cells

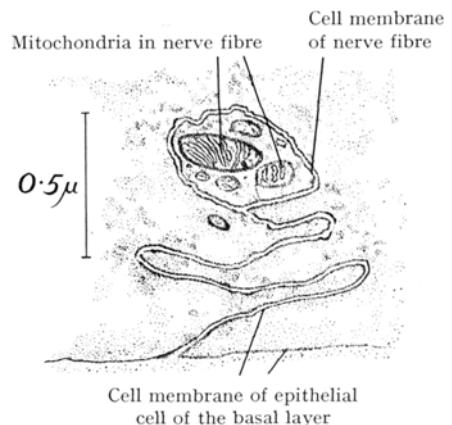


Fig. 2.—Mouse cornea. Tracing from an electron-micrograph showing a fine nerve fibre in transverse section, enclosed within a cell of the basal layer of the epithelium.

surround the nerve fibres after they emerge from the Schwann cells at the base of the epithelium. In the cornea, undifferentiated epithelial cells are in a similar close relationship to the nerve fibres.

MARY WHITEAR

*Department of Zoology and Comparative Anatomy, University College London, March 25, 1957.*

<sup>1</sup> J. BOEKE, Z. mikr.-anat. Forsch. 2, 391 (1925).  
<sup>2</sup> E. ZANDER and G. WEDDELL, J. Anat. 85, 68 (1951).  
<sup>3</sup> A. ABRAHÁM, Acta biol. Hung. 6, 31 (1955).

<sup>4</sup> M. A. JAKUS, Amer. J. Ophthalm. 38, 40 (1954).

<sup>5</sup> J. WERSÄLL, Acta Oto-Laryngol. 1956, Suppl. No. 126.

### Zusammenfassung

Eine elektronenmikroskopische Untersuchung der Nerven des Hornhautepithels der Mäuse hat ergeben, dass die Nervenfasern in tiefen Rinnen in den basalen Epithelzellen liegen. So scheint es, dass die Nervenfasern innerhalb der Zellen liegen, obgleich in Wirklichkeit die Fasern von der Zellmembran umhüllt sind.

### Über den Einfluss von Acetylcholin auf das Membranpotential denervierter Rattenzwerchfelle

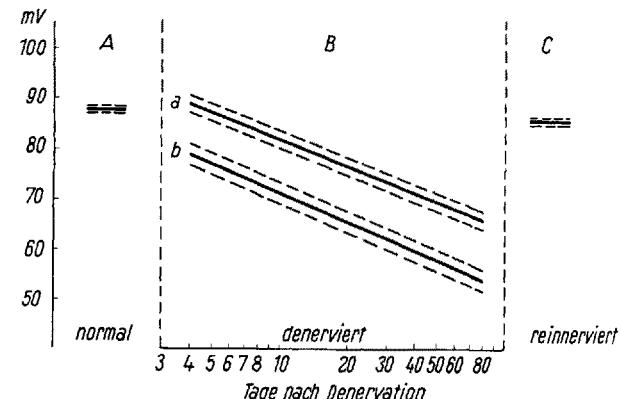
Das elektrische Verhalten des isolierten normalen Rattenzwerchfells wurde kürzlich von MUSCHOLL beschrieben. Wir untersuchten jetzt die Abhängigkeit der Membranpotentialhöhe denervierter Rattenzwerchfelle von der Denervationsdauer und das Ausmass der Depolarisation, die Azetylcholin (ACh) in den verschiedenen Denervationsstadien auslöst.

Die Rattenzwerchfelle wurden durch Phrenikus-exhärese (LÜLLMANN und MUSCHOLL<sup>1</sup>) denerviert; die Fixierung des Muskels im Organbad und die Technik der Membranpotentialregistrierung mittels intrazellulärer Mikroelektroden sind ausführlich von MUSCHOLL<sup>2</sup> dargestellt. In Abänderung der dort angegebenen Methodik arbeiteten wir bei 37°C Badtemperatur und perfundierten das Bad mit O<sub>2</sub>-gesättigter Tyrodelösung. Es wurde das Membranpotential von 17 denervierten Zwerchfellen neben einer Reihe normaler und reinnervierter Muskeln bestimmt. Die kürzeste Denervationsdauer betrug 4 Tage, die längste 80 Tage. Jeder Versuch wurde so durchgeführt, dass die Höhe des Membranpotentials eines jeden Muskels auf Grund von durchschnittlich 50 Einstichen im Zentrum des Hemidiaphragma ermittelt wurde, dann wurde der Muskel einer Azetylcholinchloridlösung 10<sup>-5</sup> g/ml ausgesetzt und die Höhe des Membranpotentials erneut gemessen. Nach dem gründlichen Ausspülen des ACh erfolgte wiederum die Membranpotentialmessung. Da Kontrollversuche ergaben, dass das Zwerchfell unter unseren Versuchsbedingungen 5 h lang ein konstantes Membranpotential aufwies, konnte der Zusatz von ACh einige Male wiederholt werden. Als Beispiel ist in der Tabelle der Versuch an einem Zwerchfell dargestellt, das 38 Tage vor dem Versuch denerviert wurde.

Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, betrug das Membranpotential 68,86 mV, unter Azetylcholinchlorid fiel es auf 56,25 mV ab, und nach dem Auswaschen der depolarisierenden Substanz stieg es wieder auf den alten Wert. In den meisten Experimenten sahen wir, dass die Wiederholung des ACh-Zusatzes eine weniger starke Wirkung aufwies. Die statistische Wahrscheinlichkeit für einen Unterschied der Mittelwerte ist in der Tabelle durch den P-Wert angegeben.

In der Abbildung sind die Befunde von den 17 untersuchten denervierten Rattenzwerchfellen zusammengestellt. *a* ist der graphische Ausdruck für die Regressionsgleichung der Membranpotentiale (es ist immer nur die erste Kontrollperiode jedes Versuches verwandt) in Abhängigkeit von der Denervationsdauer (4.–80. Tag):

$\hat{Y} = 99,30 - 17,83 X$ , Streuung der Regressionslinie  $s_a = s_y = \pm 2,001$ . In dem von uns untersuchten Zeitraum liegt eine lineare Regression vor, wenn die Abszisse logarithmischen Maßstab aufweist. Nach Denervation sinkt das Membranpotential des Muskels von etwa 87 mV der nicht denervierten Zwerchfelle (*A* in der Abbildung) auf etwa 67 mV am 80. Tag nach Denervation ab. Nach Reinnervation besitzen die Zwerchfelle wieder ein «normales» Membranpotential von 85 mV (*C* in der Abbildung).



Abhängigkeit des Membranpotentials (ohne und mit Azetylcholin-zusatz) von der Denervationsdauer. Versuche an isolierten Rattenzwerchfellen. Ordinate: Membranpotential in Millivolt. *A* Membranpotential nicht denervierter Zwerchfelle ( $\bar{x} \pm s_x$ ,  $n = 409$ ). *B* denervierte Zwerchfelle. Abszisse: Tage nach Denervation in logarithmischem Maßstab. *a* Regressionslinie  $\pm s_a$  der unbeeinflussten Membranpotentiale in Abhängigkeit von der Denervationsdauer, *b* Regressionslinie  $\pm s_b$  der Membranpotentiale bei Anwesenheit von Azetylcholin  $10^{-5}$  g/ml in Abhängigkeit von der Denervationsdauer. *C* Membranpotential reinnervierter Zwerchfelle ( $\bar{x} \pm s_x$ ,  $n = 189$ ).

Die Kurve *b* in der Abbildung stellt die Regressionslinie für die Membranpotentiale unter dem Einfluss von ACh  $10^{-5}$  g/ml in Abhängigkeit von der Denervationsdauer dar:  $\hat{Y} = 90,65 - 19,50 X$ , Streuung der Regressionslinie  $s_a = s_y = \pm 2,375$ . Für die Errechnung dieser Regression wurde jeweils nur der erste ACh-Effekt an jedem Präparat benutzt. Es ergibt sich im halblogarithmischen Maßstab wiederum eine lineare Regression, die statistisch parallel zu *a* verläuft. ACh  $10^{-5}$  g/ml depolarisiert die Muskelmembran des denervierten Zwerchfells dementsprechend um etwa 9 mV unabhängig von der Dauer der Denervation.

Über das Verhalten des Membranpotentials denervierter Warmblüterskelettmuskulatur liegt die Arbeit von WARE, BENNETT und McINTYRE<sup>3</sup> vor. Die Verfasser bestimmten das Membranpotential des *N. tibialis anterior* der Maus *in situ* nach Durchtrennung des *M. ischiadicus*. Bei exponentiellem Abfall (Ausgangswert nahe 100 mV) erreicht das Membranpotential am 50. Tag nach Denervation den Wert von etwa 77 mV. Diese Abnahme des Membranpotentials um etwa 20 mV in 50 Tagen würde gut mit den von uns gefundenen Werten am isolierten Zwerchfell der Ratte übereinstimmen. Die Wirkung depolarisierender Substanzen auf das normale isolierte Rattenzwerchfell untersuchte THESLEFF<sup>4</sup>. Dabei verwendete der Verfasser ACh-Konzentrationen von  $2-5 \cdot 10^{-5}$  g/ml bei Neostigmin-Anwesenheit. Unter diesen Bedingungen kommt es zur Depolarisation um

<sup>1</sup> H. LÜLLMANN und E. MUSCHOLL, Arch. exp. Path. Pharmak. 221, 209 (1954).

<sup>2</sup> E. MUSCHOLL, Pflüg. Arch. ges. Physiol. (im Druck).

<sup>3</sup> F. WARE, A. L. BENNETT und A. R. McINTYRE, Amer. J. Physiol. 177, 115 (1954).

<sup>4</sup> S. THESLEFF, Acta physiol. scand. 34, 386 (1955).