

### 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

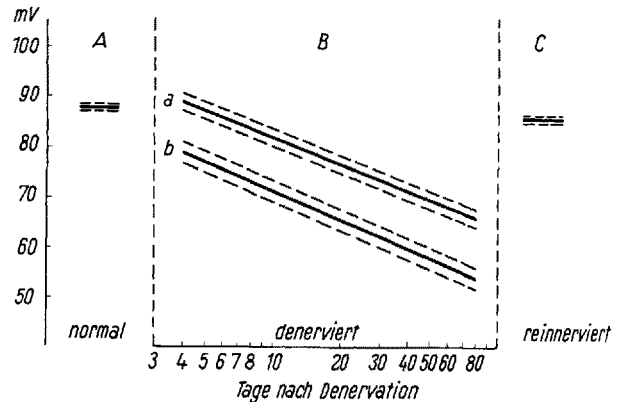
Das elektrische Verhalten des isolierten normalen Rattenzwerchfells wurde kürzlich von MUSCHOLL<sup>1</sup> beschrieben. Wir untersuchten jetzt die Abhängigkeit der Membranpotentialhöhe denervierter Rattenzwerchfelle von der Denervationsdauer und das Ausmass der Depolarisation, die Acetylcholin (ACh) in den verschiedenen Denervationsstadien auslöst.

Die Rattenzwerchfelle wurden durch Phrenikushexärese (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 Acetylcholinchloridlösung 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 Acetylcholinchlorid 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 Denervierung 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 Acetylcholin-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  $\pm s_a$  der Membranpotentiale bei Anwesenheit von Acetylcholin 10<sup>-5</sup> 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<sup>-5</sup> 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<sup>-5</sup> 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 · 10<sup>-5</sup> g/ml bei Neostigmin-Anwesenheit. Unter diesen Bedingungen kommt es zur Depolarisation um

<sup>1</sup> H. LÜLLMANN und E. MUSCHOLL, Arch. exp. Path. Pharmac. 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).

	1. Kontroll- periode	ACh 10 <sup>-5</sup> g/ml	2. Kontroll- periode	ACh 10 <sup>-5</sup> g/ml	3. Kontroll- periode
Membranpotential $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ . . . . .	68,86 $\pm$ 0,79	56,25 $\pm$ 1,79	68,77 $\pm$ 1,15	61,33 $\pm$ 2,50	68,10 $\pm$ 1,56
t-Test . . . . .	$\uparrow$ $P < 0,001$ $\uparrow\uparrow$ $P < 0,001$ $\uparrow\uparrow$ $P < 0,01$ $\uparrow\uparrow$ $P < 0,01$ $\uparrow$ $\uparrow$ $P > 0,1$ $\uparrow$				
Anzahl der Messungen . . . . .	50	20	40	12	20
Dauer der Periode in Minuten . . . . .	75	12	60	10	35

25–34 mV, und zur Ausbildung eines neuromuskulären Blockes, nicht aber zu einer Kontraktur des Zwerchfells. MUSCHOLL und LÜLLMANN<sup>5</sup> verfolgten das Auftreten der ACh-Kontraktur nach Denervation des Rattenzwerchfells; dabei ergab sich, dass die Ausbildung einer vollen Kontraktur und die Hemmung elektrisch ausgelöster Kontraktionen nach ACh 10<sup>-5</sup> g/ml am 7.–9. Tag nach Denervation beginnt. Ob die Senkung des Membranpotentials auf einen bestimmten Wert zur Kontraktur und zur Kontraktionshemmung führt oder ob zusätzliche Funktionsänderungen der Muskelzellen des denervierten Skelettmuskels zur Wirkung depolarisierender Substanzen hinzukommen müssen, lässt sich im Augenblick wohl nicht entscheiden.

Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.  
H. LÜLLMANN und W. PRACHT  
Pharmakologisches Institut der Universität Mainz, den  
4. März 1957.

Summary

The membran potential of isolated rat-diaphragms has been measured by means of intracellular micro-electrodes, in order to study changes of the resting potential and of the depolarizing action of acetylcholine after section of the phrenic nerve. Within 80 days after denervation, the membrane potential was found to fall exponentially from 87 mV to 66 mV. The action of acetylcholine, on the other hand, was found to be independent of the duration of denervation: between the 4th and the 80th day of denervation: 10<sup>-5</sup>g/ml acetylcholine always caused the membrane potential to fall by an average of the 9 mV.

<sup>5</sup> E. MUSCHOLL und H. LÜLLMANN, Arch. exp. Path. Pharmak. 226, 88 (1955).

Gewebsreaktionen nach Implantation  
von Hyaluronsäure\*

Im Rahmen einer grösseren Arbeit über die Bindegewebs- und Knorpelgrundsubstanz wurde unter anderem die Wirkung der Implantation einer aus Nabelschnüren gewonnenen Hyaluronsäure auf das umgebende Gewebe im Tierversuch geprüft.  
Methodik. Ausgewachsenen Meerschweinchen beiderlei Geschlechts wurde in Äthernarkose die Innenseite der Tibia freipräpariert. Das Periost wurde längs und quer gespalten, so dass es sich gut abschieben und entfernen liess. Es wurde stets darauf geachtet, dass das

Periost in einer solchen Ausdehnung entfernt war, dass es nicht mit der implantierten Hyaluronsäure in Verbindung kam. Hierauf wurde, nach Abtupfen eventueller Blutreste, Hyaluronsäure in fester Form (5–8 mg) unmittelbar an den Knochen (Tibia) angelagert. Muskelnaht und Hautnähte.  
In der Versuchsreihe über die hier berichtet wird, wurden die Tiere jeweils 1, 2, 3, 4 und 7 Wochen nach der Operation getötet, die Unterschenkel wurden herauspräpariert und nach Entfernung der oberflächlichen Muskelschichten in Formalin fixiert, entkalkt, in Paraffin eingebettet und die Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

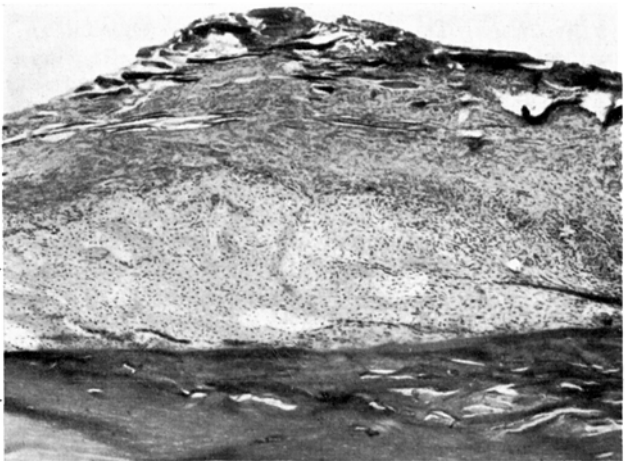


Abb. 1. Eine Woche nach der Operation.

Im postoperativen Verlauf traten keinerlei Reizerscheinungen auf. Bei der Präparation fand sich stets makroskopisch eine deutliche Verdickung und Auftreibung an der Implantationsstelle. Die dem Knochen anliegenden Weichteile erschienen hier teilweise mit demselben verwachsen. Reste einer eventuellen Blutung fanden sich niemals. Nach der zweiten Woche liess sich in der Verdickung eine Verhärtung tasten, die sich auch röntgenologisch, bei den einzelnen Tieren mit gewissen quantitativen Unterschieden, nachweisen liess.  
Die nun folgenden Mikroaufnahmen der einzelnen Verdickungen geben die histologischen Befunde 1, 3 und 7 Wochen nach der Implantation von Hyaluronsäure wieder.  
Die Abbildung 1 zeigt am unteren Rand des Bildes einen Teil der Tibiacorticalis (Pfeil 1), auf der ein zellreiches, gefässarmes Bindegewebe sitzt, das an seinem oberen Rand noch einige Muskelfasern erkennen lässt. Innerhalb der bindegewebigen Neubildung fällt, der

\* Vorläufige Mitteilung  
Exper. 19