

rabbit), recorded after an appropriate intravenous dose of tubocurarine, were thus approximately rectangular and the level maintained even if the amplitude was strongly reduced. In 15 min the Wedensky inhibition developed to its full extent during constant injection of tubocurarine.

Now the same phenomenon has been investigated by means of an electrophysiological technique, making recording of details of the tubocurarine effect possible even after 'complete curarization', when the contraction has

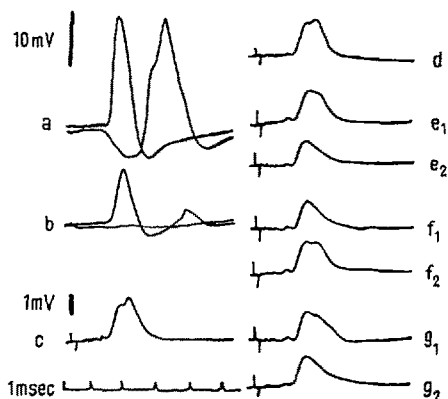


Fig. 1. Action potentials from rat diaphragm preparation after indirect, supramaximal stimulation of prenic nerve.

a) Single stimulation before curarization. First potential from end-plate zone, second potential from the muscle fibre a few mm away from this zone. b) 8 min after addition of 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ D-tubocurarine chloride to the bath. c) Potential from end-plate zone after single stimulation 14 min after curarization. Note increase in amplification for this and the following recordings. Muscle fiber action potential has now disappeared, and the beam for recording of this potential has been switched off. d–g) Some of the action potentials recorded with the same electrode as in c during a tetanic stimulation (50/sec) immediately following c.

d = First potential, e_1 and e_2 = after 1 sec, f_1 and f_2 = after 8 sec, g_1 and g_2 = after 16 sec.

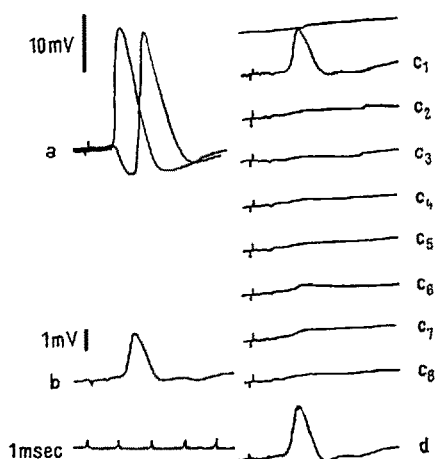


Fig. 2. Similar potentials as in Fig. 1

a) As in Fig. 1a. Between a and b addition of 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ D-tubocurarine chloride. Disappearance of muscle fiber action potential after 14.5 min and complete disappearance of end-plate potential after 18.5 min. Washing out of tubocurarine 33.5 min after curarization. b, c, and d recorded 15 min later during recovery of the preparation from the complete block, just before the first muscle fibre potentials reappeared. b) Potential from the end-plate zone after single stimulation. c_1 – c_8) Some of the end-plate potentials recorded with the same electrode as in b during tetanic stimulation (50/sec) immediately following b. c_1 first potentials and the other with intervals of $1/3$ sec. d) As in b, 3 sec after determination of tetanic stimulation. Note increase in amplification between a and b.

disappeared. The approximately constant level of the e.p.p. produced by tetanic stimulation in the first phase of a curarization, is, in our opinion, a proof of a relatively constant release of acetylcholine in unaffected preparations, i. e. under normal conditions. The Wedensky inhibition with a rapid decline in the e.p.p., a phenomenon which may also develop relatively rapidly when higher concentrations of tubocurarine are used, must accordingly, when HUTTER's result¹ is taken into consideration, be due to a presynaptic effect of the substance.

Our results are in accordance with those of RIKER *et al.*⁴ obtained by a more indirect procedure of investigation. As stated in previous publications^{2,3} the presynaptic effect of tubocurarine takes some time to develop (probably due to the time necessary to penetrate into the presynaptic fibres) and its main effect consists in a strong tendency to block the effect of repetitive impulses in the presynaptic fibres, an effect not unlike that postulated for procain in the motor end-plate.

DETTBARN's⁵ demonstration of a blocking effect of tubocurarine on conduction in peripheral nerves, by using Staempfli's technique for investigation of the activity at the Ranvier nodes, strongly support the possibility of a presynaptic effect of this substance.

G. LILLEHEIL and K. NAESS

Department of Pharmacology, University of Oslo (Norway), August 25, 1960.

Zusammenfassung

Die Beurteilung von Endplatten-Potentialen an N.-phrenicus-Diaphragma-Präparaten in verschiedenen Stadien der Curaresierung legt nahe, die Ursache der Wedensky-Hemmung von tetanischen Kontraktionen in einer präsynaptischen Wirkung des Tubocurarins zu sehen.

⁴ W. K. RIKER, JR., G. WERNER, J. ROBERTS, and A. KUPERMAN, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 81, 329 (1959).

⁵ W. D. DETTBARN, *Nature*, 186, 891 (1960).

Multiple Innervation von Muskelfasern im *M. vocalis* des Menschen¹

Die bisherigen Kenntnisse der motorischen Versorgung erlaubten nicht, den *M. vocalis* einem bestimmten Innervationstyp zuzuordnen. Das heisst, es war nicht sicher, ob er über ein ähnliches engumschriebenes Innervationsareal verfüge wie der Skelettmuskel^{2,3} oder ob eine davon abweichende Innervation anzutreffen sei. Aus der Rolle, die diesem Muskel bei der Phonation zuzukommen scheint, insbesondere aus der Geschwindigkeit seines Ansprechens und der Genauigkeit des Stimmeinsatzes, ergibt sich die Frage nach der Art und Ausbreitung der neuromuskulären Synapsen, über die seine Fasern aktiviert werden. Da der Muskel der intrazellulären Ableitung beim Menschen kaum zugänglich ist, kommt der neurohistologischen Untersuchung bei der Beantwortung dieser Frage besondere Bedeutung zu.

¹ Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

² C. COERS und A. L. WOLFF, *The Innervation of Muscle* (Oxford 1959).

³ H. G. SCHWARZACHER, *Acta anat.* 37, 217 (1959).

Technik. Der *M. vocalis* (thyreoarytaenoideus int.) erwachsener, neurologisch gesunder Individuen (Alter < 50 Jahre) wurde in 40 bis 60 μ dicke Gefrierschnitte zerlegt und die Nervenendigungen mittels Silberimprägnation in einer dem Objekt angepassten Modifikation der Bielschowsky-Färbung dargestellt. Diese Methode hat den Vorteil, dass sie sowohl die Nervenfasern wie auch die feinsten Endigungen des motorischen Axons zur Darstellung bringt. Damit lässt sich der Bereich der synaptischen Kontakte abgrenzen. Eine verbindliche Aussage über die Anzahl der motorischen Endplatten (EP) wie bei der Cholinesterase-Methode ist dagegen nicht möglich, weil sich immer nur ein Bruchteil der tatsächlich vorhandenen EP anfärbt. Untersucht wurden in erster Linie Fasern in der Höhe des Stimmbandes.

Ergebnisse. Im Gegensatz zum Skelettmuskel, dessen motorische EP sehr regelmässig eine schmale in der Fasermitte gelegene Zone besetzen, verfügt der *M. vocalis* über ein Innervationsband, das mehr als die Hälfte der Muskellänge einnimmt. Dies ist zum Teil auf eine multiple Innervation einzelner Muskelfasern zurückzuführen (Gegenüberstellung im Schema der Abb. 1).

Der Durchmesser der einzelnen EP liegt in der Regel mit 50 bis 100 μ über dem der Skelettmuskulatur (30–35 μ im Durchschnitt). Häufig tritt eine motorische Faser mit kurzen markhaltigen Verzweigungen an eine Muskelfaser heran und nimmt mit dieser in einem grösseren EP-Areal Kontakt auf (Abb. 2). Dies ist ein Ansatz zur Mehrfachinnervation, die an anderen Fasern desselben Muskels deutlich ausgeprägt ist. So finden sich 2 (manchmal 3 bis 5) individuelle EP, die meist ein gemeinsames Ursprungssaxon haben (Abb. 3).

Die Auszählung von 1500 EP in 60 Schnitten ergab ein Verhältnis mehrfach/einfach von 1:5. In Wirklichkeit wird der Anteil der Mehrfachinnervation aber höher liegen, da nicht alle EP sichtbar werden. Diese gehäufte Mehrfachinnervation eines menschlichen Muskels ist zweifellos eine Besonderheit. Sie wurde am Skelettmuskel nur unter pathologischen Bedingungen beobachtet².

Diskussion. Worin würde der physiologische Sinn einer multiplen Innervation bestehen? An der Muskelfaser steht dem winzigen EP-Bereich die riesige Muskelmembranoberfläche gegenüber, die über den Verstärkermechanismus der EP aktiviert wird. Durch die Vermehrung der synaptischen Kontaktstellen kann die Erregung an mehreren Punkten des Muskels gleichzeitig ausgelöst, das heisst die Faser in kürzerer Zeit aktiviert werden. Bei der mit 2 bis 3 m/sec relativ langsamen Erregungsleitung des Muskels würde dies bereits eine merkliche Abkürzung der Kontraktionslatenz bedeuten.

Manchmal liegen 2 oder 3 EP so dicht zusammen, dass dadurch das Innervationsareal lediglich verdoppelt oder verdreifacht wird. Die Endplattendistanz beträgt aber in der Regel 100 bis zu mehreren 100 μ . Da nach Untersuchungen von MILEDI⁴ die chemosensible Membran aber nicht auf das eigentliche EP-Areal beschränkt ist, sondern noch bis zu 500 μ von der EP entfernt ACh-Rezeptoren nachweisbar sind, muss man annehmen, dass sich die Aktivierungsbereiche benachbarter EP auch noch bei mehreren 100 μ Abstand überlappen. Die Fusion der ACh-empfindlichen Areale könnte allerdings nicht nur im Sinne eines Zeitgewinns bei der Aktivierung, sondern auch im Sinne eines tonischen, Kontraktur begünstigenden Mechanismus gedeutet werden.

Aus der Mehrfach-Innervation ergeben sich weiterhin Konsequenzen für die Bestimmung der Grösse der motorischen Einheiten. Die Mehrzahl der Muskelfasern empfängt ihre multiplen Endplatten aus der gleichen motorischen Faser. Auf der anderen Seite ist eine polyneuro-

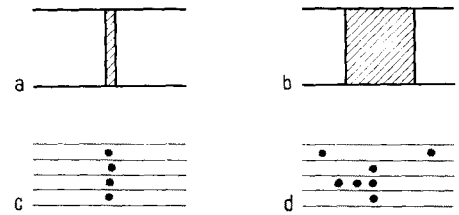


Abb. 1. Schematische Darstellung des Innervationsareals eines Skelettmuskels (a) und des *M. vocalis* (b). Die EP sind beim Skelettmuskel annähernd in einer Höhe angeordnet (motor-point) (c), daher eine schmale Innervationszone. Beim *M. vocalis* findet sich ein breites Innervationsband. Zahlreiche Muskelfasern weisen mehrere neuromuskuläre Verbindungen auf (d).

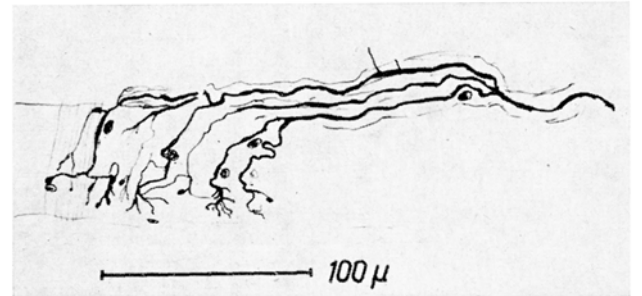


Abb. 2. Breites Endplattenareal (Zeichnung nach mikroskopischem Präparat). Die motorische Faser erreicht mit drei kurzen markhaltigen Verzweigungen die Muskelfaser und spaltet sich hier über einen Bereich von über 100 μ in feine Endverzästelungen auf. Erster Ansatz zu einer multiplen Innervation.

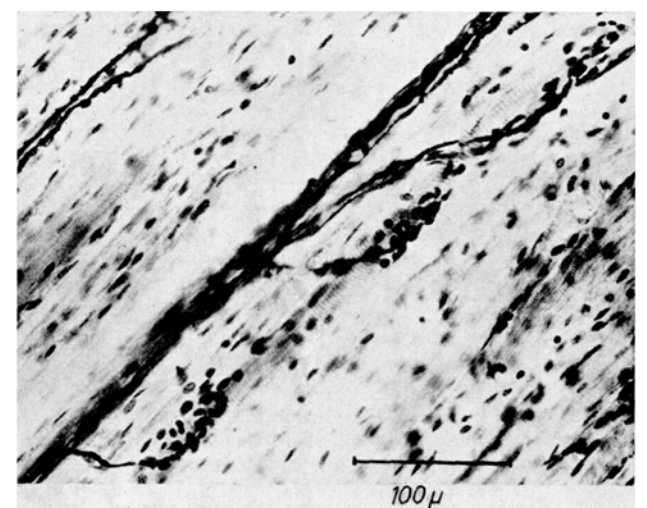


Abb. 3. Mehrfachinnervation einzelner Muskelfasern des *M. vocalis* des Menschen. Modifizierte Silberimprägnation nach Bielschowsky. Zwei Endplatten (oben) bzw. drei Endplatten (unten) treten in Kontakt mit einer Muskelfaser. Abstand > 100 μ .

⁴ R. MILEDI, J. Physiol. 151, 24 (1960).

⁵ Frl. INGEBORG SCHNÖRING danke ich für wertvolle techn. Hilfe.

nale Innervation nicht auszuschliessen. In diesem Fall würde die Entladung eines Motoneurons bei einer bereits bestehenden Grundaktivität im Muskel nur Fasern erregen, die bisher nicht durch andere Neuronen aktiviert waren. Ein Anwachsen der kontraktile Antwort würde in einem teilweise aktivierten Muskel mit weniger als einer ganzen motorischen Einheit zustandekommen. Das bedeutet eine Möglichkeit der Kontraktionsabstufung, die allerdings nur erfolgen kann, wenn beide an der Innervation beteiligten Motoneuronen synchron entladen.

Die multiple Innervation von Vocalisfasern steht ohne Zweifel in engem Zusammenhang mit den besonderen Leistungen dieses Muskels bei der Stimmbildung.

G. RUDOLPH⁵

Physiologisches Institut der Universität des Saarlandes
Homburg-Saar, 25. Juli 1960.

Summary

In contrast to the narrow terminal innervation bands of human skeletal muscles, the vocal muscle shows a particularly extended region of synaptic contacts. A great number of muscle fibres receive two or more motor endings forming individual endplates at a distance of several hundred micra. The physiological significance would be a more rapid activation.

Relationship between the Effectiveness of Cardiac Glycosides in Cats and their Interference with Red Cell Potassium Transport

SOLOMON *et al.*¹ found that, with the exception of lanatoside-B and digoxigenin, the effectiveness of seven other cardiac glycosides in cats was proportional to their interference with red cell K 42 transport. Also KAHN *et al.*²⁻⁴ noted that there is some resemblance between the relative potencies of the cardiac glycosides tested in inhibiting cation exchange in erythrocytes and their relative potency in producing a positive inotropic effect on the heart. WILBRANDT⁵ had compared the potencies of ouabain, digitoxin, and digoxin and their dihydro derivatives on heart-lung preparation and on erythrocytes, from the data of KAHN³ and VICK *et al.*⁶, and came to the same conclusion. On the basis of these findings, we decided to exploit this correlation between the effects of cardiac glycosides on the heart and on cation transport in the red cell for a determination and control of potency of different cardiac glycosides. Because of the data published by SOLOMON *et al.*¹, that there are cardiac glycosides for which this relationship is not valid, we have decided to repeat the experiments on the incubated cold stored human erythrocytes with Lanatoside-B, and to add some cardiac glycosides not investigated up to now.

The effect of cardiac glycosides on the flux of potassium was measured as described previously⁷ by a similar method used by KAHN *et al.*^{2,3} on the human red cells kept for 5 days at a temperature of 3°C, and after the addition of glucose and the investigated cardiac glycosides (convallatoxin, hellebrin, ouabain, k-strophanthine, digoxin, lanatoside-C, digitoxin, lanatoside-A, lanatoside-B) in four different concentrations, incubated at 37°C for 4 h. Serum potassium was measured in a Zeiss flame photometer.

For every glycoside a concentration-action curve was constructed as is shown in the Figure 1, expressing the relationship between the logarithm of concentration and

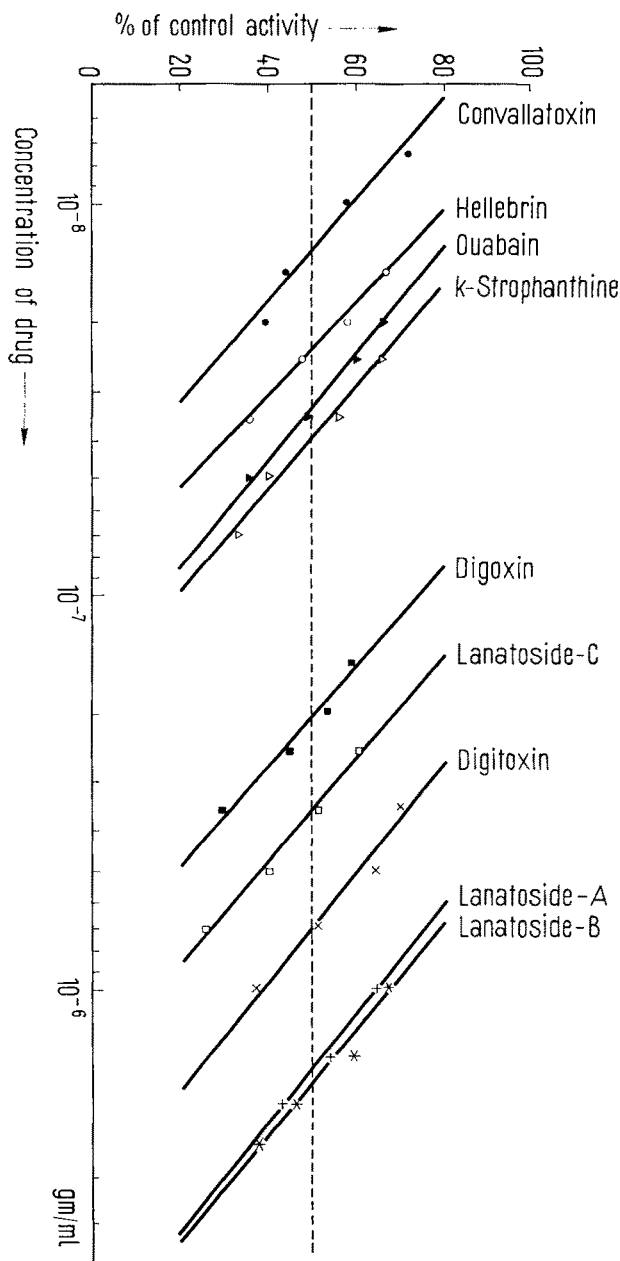


Fig. 1

the % of control activity of each glycoside determined by comparing the values of serum potassium after adding the glycoside used with the control value after adding the same medium in which the glycoside was dissolved^{2,3}.

¹ A. K. SOLOMON, THOMAS J. GILL, and G. LEONARD GOLD, *J. gen. Physiology* 40, 327 (1956).

² J. B. KAHN, JR. and G. H. ACHESON, *J. Pharmacol. exper. Therap.* 115, 305 (1955).

³ J. B. KAHN, JR., *J. Pharmacol. exper. Therap.* 121, 234 (1957).

⁴ J. B. KAHN, JR. and SHELBY B. COHEN, *J. Pharmacol. exper. Therap.* 120, 9 (1957).

⁵ W. WILBRANDT, *Schweiz. med. Wschr.* 89, 1 (1959).

⁶ R. L. VICK, J. B. KAHN, JR., and G. H. ACHESON, *J. Pharmacol. exper. Therap.* 12, 330 (1957).

⁷ J. MACHOVÁ and F. V. SELECKÝ, *Arch. exp. Path. Pharmacol.* 236, 1 (1959).