

reached rather abruptly, coincides with the peak of the waves. The decrease is then progressive through several hundreds of msec (Figure 2). During repetitive stimulation by flashes before the injection of reserpine, all the units responded by short bursts of 1-4 spikes. Under reserpine, the same response was found but the discharges corresponding to the phasic waves were superimposed. The EEG evoked potentials occurring during this increase of firing were consistently reduced in size. This effect is clearly observed for a frequency of flashes around 15/sec, but seems to disappear if higher than 25/sec.

Comments. (1) Phasic EEG waves observed in PRF and LGB after a single injection of reserpine do not reflect in a simple and consistent manner the rate of the spike activity of the neurons. We may then hypothesize that they are related to post-synaptic events occurring in those groups of cells. The rate changes which occur during each phase of the reserpine-waves could then provide suggestions as to the excitatory and inhibitory processes involved in the generation of these waves. In the PRF, most neurons apparently receive inhibitory input during the first part of the wave, and then present a rate acceleration which can be interpreted as due to a post-inhibitory rebound, or a superimposed excitatory effect (type 1). The other cells (type 2 and 3) are suggestive of a predominantly excitatory input. Note however, for type 2 cells, that the possibility of some early inhibition cannot be rejected since they are spontaneously silent.

In the LGB, all the neurons recorded accelerated, suggesting an extensively excitatory process. The LGB-wave could thus reflect the depolarization of this group of cells by synchronous EPSPs. 2 discharge generating processes are thus represented by the same EEG pattern recorded in 2 different areas.

(2) These experiments provide some evidence as to the effect of reserpine at the neuronal level—other evidence has indicated that the site of action of reserpine in the brainstem should be located in the PRF². Pontine neurons influenced by reserpine project to the LGB, 'non-specific' convergence which is confirmative of the demonstration of other authors³. But although the visual input to the geniculate neurons, responsible of a very short depolariza-

tion, gives rise to 1 or few spikes, the non-specific one causes a longer depolarization and gives rise to repetitive spikes. This difference of response could reflect a difference of location of the corresponding synapses on the cell membrane⁴.

(3) The similarity of the phasic EEG patterns in reserpine preparations and during PS raises the question of whether they obey similar mechanisms at the neuronal level. Several workers have observed during PS phasic increases of cell discharges corresponding to the bursts of eye movements (which are known to be closely related in time with the phasic waves), in many structures including LGB⁵, which is in agreement with our findings in this structure. But, so far, no study has been performed in the PRF during PS so that we might compare with our results⁶.

Résumé. Des ondes rapides sont enregistrées dans la formation réticulée pontique (FRP) et le corps géniculé latéral (CGL) chez des chats sous Reserpine. Au moment des ondes rapides, l'activité des neurones de la FRP est généralement inhibée, parfois augmentée. Elle est toujours augmentée dans le CGL. Un rapprochement est tenté avec des phénomènes semblables observés pendant le sommeil paradoxal.

M. JEANNEROD⁷

Anatomy Department and Brain Research Institute,
University of California, Los Angeles (California,
USA), 14th December 1966.

³ G. B. ARDEN and U. SODERBERG, in *Sensory Communication* (Ed. W. A. ROSENBLITH; M.I.T. Press, Cambridge 1961) p. 521.

⁴ E. FADIGA and J. M. BROOKHART, *J. Neurophysiol.* 25, 790 (1962).

⁵ H. SAKAKURA and K. IWAMA, *Proc. Japan Acad.* 42, 418 (1966).

⁶ Supported by a grant from N.I.H. (No. 5264). Thanks are due to Prof. J. P. SEGUNDO, Dept. of Anatomy, U.C.L.A., for support and criticism.

⁷ Present address: Laboratoire de Médecine Expérimentale, Faculté de Médecine, Lyon, France.

Nichtenzymatisch bedingte TNBT-Formazanablagerungen in Gewebsstrukturen

Tetra-Nitro-Blue-Tetrazolium (TNBT) gilt gegenwärtig in der Fermenthistochemie als zuverlässigster Reduktionsindikator zum Nachweis oxydativer Enzyme. Eigene lichtmikroskopische Untersuchungen haben ergeben, dass sich in Gewebsschnitten nach kurzzeitiger Inkubation in einer TNBT-Lösung und anschliessender Reduktion mit Ascorbinsäure oder Hydrochinon nicht-enzymatisch gebildetes TNBT-Formazan nachweisen lässt. Gleichartige Ergebnisse sind inzwischen auch von LOJDA¹, BROOKE und ENGEL² sowie FAHIMI und KARNOVSKY³ mitgeteilt worden. Im Gegensatz zu den genannten Autoren haben wir ausserdem elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt, über die im folgenden berichtet werden soll. Die dabei erzielten Ergebnisse werfen die Frage auf, ob bei Verwendung von

TNBT als Reduktionsindikator zum histochemischen Nachweis oxydativer Enzyme mit einer unspezifischen TNBT-Formazanbildung zu rechnen ist.

Kryostatschnitte nativer und glutaraldehydfixierter Rattenherzmuskulatur wurden 5-20 min in einer gepufferten TNBT-Lösung inkubiert und anschliessend mit Hydrochinon bzw. Ascorbinsäure zum TNBT-Formazan reduziert. Ein Teil der Schitte wurde mit OsO₄ nachfixiert. Die Einbettung der Kryostatschnitte für elektronenmikroskopische Untersuchungen erfolgte in Vestopal W, Araldit und Durcupan-Fluka. Zur Klärung der Frage, ob

¹ Z. LOJDA, *Folia morph.* 13, 84 (1965).

² M. H. BROOKE and W. K. ENGEL, *Neurology*, Minneap. 16, 799 (1966).

³ H. D. FAHIMI and M. J. KARNOVSKY, *J. Cell Biol.* 29, 113 (1966).



Fig. 1. Rattenmyocard, nativer Kryostatschnitt, TNBT-Formazanablagerungen nach Reduktion des Inkubationsmediums mit Ascorbinsäure. Neben diffuser Anfärbung granuläres Formazan. $\times 440$.

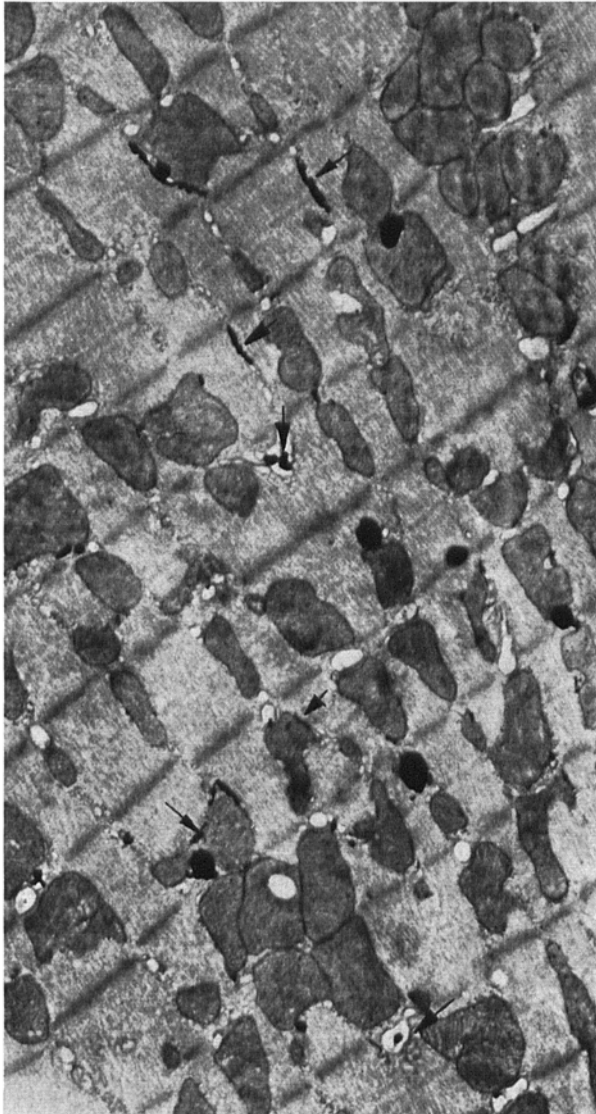


Fig. 2a.

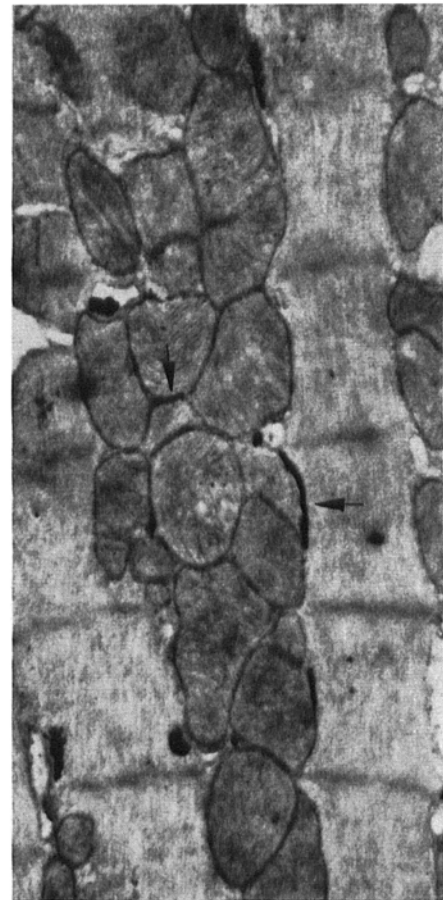


Fig. 2b.

Fig. 2. Rattenmyocard, Kryostatschnitt nach Glutaraldehyd-Fixierung, TNBT-Reduktion mit Hydrochinon, OsO_4 -Nachfixierung, Vestopal W-Einbettung. Keine Kontrastierung. Durch Pfeile markierte TNBT-Formazanablagerungen. (a) $\times 14900$ bzw. (b) $\times 21300$.

das TNBT-Formazan durch präparatives Vorgehen (Fixierung, Entwässerung, Einbettung) Veränderungen erfährt, wurde TNBT im Reagenzglas reduziert und die durch Zentrifugieren gewonnene TNBT-Formazan-Suspension nach Glutaraldehyd- oder Osmiumfixierung in Vestopal W eingebettet.

Lichtmikroskopisch zeigen die in die gepufferte TNBT-Lösung eingebrachten Kryostatschnitte nach 5–20 min Inkubation keine Reaktion. Nach Zugabe von Hydrochinon bzw. Ascorbinsäure kommt es spontan zur Reduktion von TNBT im Inkubationsmedium, mit der eine Anfärbung der Schnitte einhergeht. Neben TNBT-Formazan in diffuser Verteilung lässt sich in der Herzmuskulatur auch TNBT-Formazan in granulärer Form nachweisen, beides vorwiegend im Bereich der Myofibrillen. Ferner finden sich diffuse Formazanablagerungen perinukleär und im interstitiellen Bindegewebe (Figur 1). Vorfixierung der Schnitte zeigt keinen Einfluss auf den Reaktionsausfall. Das anschließende elektronenmikroskopische Präparationsverfahren schwächt die Farbreaktion nur gering ab. Nach OsO_4 -Fixierung wird die Reaktion durch die Schwärzung der Gewebsschnitte überlagert.

Submikroskopisch finden sich elektronendichte Granula frei im Sarkoplasma, neben der Aussenmembran

der Mitochondrien sowie im sarkoplasmatischen Retikulum. Elektronendichtes TNBT-Formazan lässt sich weiterhin in optisch leeren Räumen der Muskulatur nachweisen, die durch den Frier- und Tauprozess während der Kryostatschnittanfertigung bedingt sind. Herdförmig stellen sich durch feinstgranuläre oder lineare Ablagerungen besonders die Membranen des sarkoplasmatischen Retikulums sowie die Aussenmembranen der Mitochondrien dar (Figur 2). Ob die TNBT-Formazanablagerungen vorzugsweise in, neben oder – wie bei der Negativkontrastierung – zwischen den Membranen erfolgt, ist zumeist nicht eindeutig zu entscheiden. In einigen Ultradünnschnitten konnten wir trotz gleichem präparativem Vorgehen keine Formazanablagerungen nachweisen. Die in den Gewebsschnitten gefundenen Granula entsprechen hinsichtlich der Elektronendichte den im Reagenzglas hergestellten TNBT-Formazan-Granula, deren Beständigkeit gegenüber Fixierung, Einbettung und Elektronenstrom nachgewiesen werden konnte.

TNBT wird also bereits nach kurzen Inkubationszeiten der Kryostatschnitte an Gewebsstrukturen angelagert, so dass die Aussagekraft und Interpretation licht- und submikroskopischer Dehydrogenasenachweise durch eine unspezifische, nichtenzymatische Reduktion des TNBT («Fehllokalisation») beeinträchtigt werden kann. Die Bedingungen, die zur TNBT-Formazan-«Fehllokalisation» führen, sind komplexer Natur und gegenwärtig noch nicht völlig überschaubar. Als Faktoren, die für diese «Fehllokalisation» des TNBT-Formazans in Frage kommen, sind zu nennen: 1. eine unspezifische Reduktion des TNBT durch gewebeigene reduzierende Komponenten («nothing-dehydrogenase»-Reaktion). 2. eine Diffusion enzymatisch gebildeten Formazans, zum Beispiel in Gewebslücken, die während der Kryostatschnittanfertigung durch den Frier- und Tauprozess entstehen. Dementsprechend haben wir Formazanablagerungen in optisch leeren Räumen nachweisen können. 3. eine selektive

Bindung entweder des TNBT oder des TNBT-Formazans an bestimmte Zellstrukturen (Mitochondrien, sarkoplasmatisches Retikulum, Zellkernmembranen) ist sehr wahrscheinlich. Elektronenmikroskopisch haben wir TNBT-Formazanablagerungen in unmittelbarer Nähe von Lipoproteinmembranen nachweisen können. Damit liegen im Gewebsschnitt den Modellexperimenten von PEARSE und HESS⁴ vergleichbare Bedingungen vor, bei denen TNBT eine Affinität zu Lipoidfraktionen zeigte. LOJDA¹, BROOKE und ENGEL² sowie FAHIMI und KARNOVSKY³ haben ebenfalls aus lichtmikroskopischen Untersuchungen auf eine Bindung des TNBT an die Lipoproteinstrukturen geschlossen.

Bei Verwendung von TNBT als Reduktionsindikator zum licht- und submikroskopischen Nachweis oxydativer Enzyme muss daher ebenso wie mit Nitro-BT (PEARSE und HESS⁴, BROOKE⁵, BROOKE und ENGEL²) mit einer unspezifischen, nichtenzymatisch bedingten Lokalisation des TNBT-Formazans gerechnet werden, die die Ergebnisse experimenteller Untersuchungen beeinflussen kann.

Summary. Light- and electron-microscopic investigations reveal a non-enzymatic, non-specific deposition of TNBT-formazan in the sarcoplasm and along some membranes in the heart of the rat. These results are of interest with regard to the interpretation of histochemical identifications of oxidative ferments with TNBT as reduction-indicator.

U. FUCHS und F. WOHLRAB

Pathologisches Institut der Karl-Marx-Universität,
Leipzig (DDR), 22. November 1966.

⁴ A. G. E. PEARSE and R. HESS, *Experientia* 17, 136 (1961).

⁵ M. H. BROOKE, *J. Histochem. Cytochem.* 13, 701 (1965).

Adrenergic Innervation of the Male Reproductive Ducts in Some Mammals. II. Effects of Vasectomy and Castration

The normal distribution of adrenergic nerves to vasa deferentia of various species was observed by several authors¹⁻⁴ using a highly specific fluorescence histochemical method⁵⁻⁷. Cell bodies of adrenergic neurons in ganglia near the prostatic end of the vas deferens synapse with preganglionic fibres of the hypogastric nerves^{2,4,8}, and give rise to adrenergic axons of the vas deferens and adjacent organs⁹⁻¹¹. The present authors¹² recently surveyed the testis and its associated ducts in several mammals with the aim of determining differences in distributions of adrenergic neurons in various regions. This study was undertaken to obtain experimental evidence concerning the course of the adrenergic innervation, and to determine if alterations might result from castration and reduced male sex hormone activity.

Histochemical procedures used were referred to previously¹², and followed the routine technique of this laboratory for noradrenaline (NA) localization by fluorescence microscopy^{2,13,14}. 6 Sprague-Dawley albino rats (160–200 g) were uni- or bilaterally vasectomized by

removing a one cm section of the duct. In unilateral cases, opposite unoperated ducts served as normal controls. Comparisons also were made with unoperated specimens. In bilateral operations, one vas deferens was completely

¹ B. FALCK, *Acta physiol. scand.* 56, Suppl. 197 (1962).

² K.-A. NORBERG and B. HAMBERGER, *Acta physiol. scand.* 63, Suppl. 238 (1964).

³ B. FALCK, CH. OWMAN and N. O. SJÖSTRAND, *Experientia* 21, 98 (1965).

⁴ CH. OWMAN and N. O. SJÖSTRAND, *Z. Zellforsch.* 66, 300 (1965).

⁵ B. FALCK, N.-Å. HILLARP, G. THIEME and A. TORP, *J. Histochem. Cytochem.* 10, 348 (1962).

⁶ H. CORRODI and N.-Å. HILLARP, *Helv. chim. Acta* 46, 2425 (1963).

⁷ H. CORRODI and N.-Å. HILLARP, *Helv. chim. Acta* 47, 911 (1964).

⁸ D. JACOBOWITZ and G. B. KOELLE, *J. Pharmac. exp. Ther.* 148, 225 (1965).

⁹ N. O. SJÖSTRAND, *Acta physiol. scand.* 54, 306 (1962a).

¹⁰ N. O. SJÖSTRAND, *Acta physiol. scand.* 56, 376 (1962b).

¹¹ N. O. SJÖSTRAND, *Acta physiol. scand.* 65, Suppl. 257 (1965).

¹² K.-A. NORBERG, P. L. RISLEY and U. UNGERSTEDT, *Z. Zellforsch.* 76, 278 (1967).

¹³ B. FALCK and CH. OWMAN, *Acta Univ. Lund*, II, 7, 1 (1965).

¹⁴ A. DAHLSTRÖM and K. FUXE, *Z. Zellforsch.* 62, 602 (1964).