

### Histochemical Demonstration of Adrenergic Fibres in the Smooth Muscle Layer of Media of Dorsal-Pedal Artery in Dog

On the basis of physiological studies, the distribution of adrenergic vasoconstrictor fibres to different sections of the vascular bed has been postulated by many investigators<sup>1</sup>. By contrast, the recent reports with electron microscope deny the existence of the adrenergic nerves in the media of arteries<sup>2,3</sup>. The histochemical studies with a fluorescence method<sup>4</sup> have also been unable to show adrenergic fibres in the media<sup>5-9</sup>.

In the course of experiments to investigate the mode of distribution of adrenergic fibres in different vascular regions in the body, we have been able to find a specific fluorescent material representing catecholamines in the muscle layer of the media in the dorsal-pedal artery of dogs.

Forty dogs, weighing 10–20 kg, were used. Small tissue specimens of the dorsal-pedal artery were biopsied from animals anaesthetized with sodium pentobarbital (25 mg/kg, i.v.). Immediately after excision, the specimens were freeze-dried, treated with paraformaldehyde, em-

bedded in paraffin, sectioned (5–7.5  $\mu$  thick) and mounted for fluorescence microscopy, as described elsewhere<sup>8,10</sup>. Sections, adjacent to those which were exposed to paraformaldehyde for fluorescence microscopy, were stained with hematoxylin-eosin or Weigert's elastin.

To intensify the fluorescence of the artery, dogs were treated with noradrenaline (50  $\mu$ g/kg, i.v.) at various time intervals before excision of specimen. Some animals were given reserpine (0.3 mg/kg 3 times, i.p.) to deplete cate-

<sup>1</sup> B. FOLKOW, *The Nervous Control of the Blood Vessels* (Ed. R. J. S. McDOWALL; Wm. Dawson and Sons Ltd., London 1956).

<sup>2</sup> O. APPENZELLER, *J. Anat.* 98, 87 (1964).

<sup>3</sup> D. D. SAMARASINGHE, *J. Anat.* 97, 311 (1963).

<sup>4</sup> B. FALCK, *Acta physiol. scand.* 56, Suppl. 197, 1 (1962).

<sup>5</sup> K. FUXE and G. SEDVALL, *Acta physiol. scand.* 67, 121 (1964).

<sup>6</sup> K. FUXE and G. SEDVALL, *Acta physiol. scand.* 64, 75 (1965).

<sup>7</sup> K. MOHRI, *Archs Jap. Chir.* 31, 280 (1962).

<sup>8</sup> M. FUJIWARA, C. TANAKA, T. HONJO and T. OKEGAWA, *Jap. J. Pharmac.* 15, 369 (1965).

<sup>9</sup> S. DOLEZEL, *Experientia* 22, 307 (1966).

<sup>10</sup> M. FUJIWARA, C. TANAKA, H. HIKOSAKA and T. OKEGAWA, *J. Histochem. Cytochem.* 14, 483 (1966).

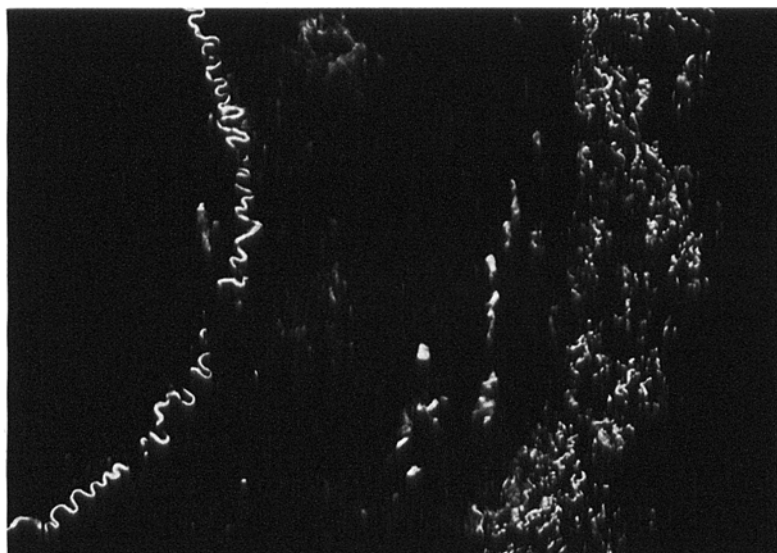


Fig. 1. Dorsal-pedal artery of dog. Cross section. Several bundles of fluorescent adrenergic fibres are present in the media of the artery. Fluorescence microphotograph.  $\times 128$ .

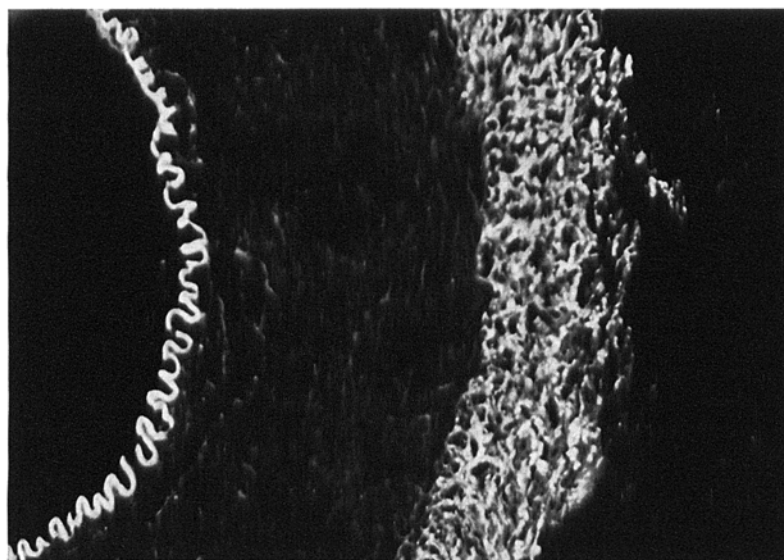


Fig. 2. Dorsal-pedal artery of dog. Cross section. No specific fluorescence of the adrenergic fibres are found in the smooth muscle layer of the media of the artery, after lumbar sympathectomy. Fluorescence microphotograph.  $\times 128$ .

cholamines and test the specificity of the observed fluorescence. In 10 dogs, chronic resection of the paravertebral sympathetic trunk at the level of L2 to L7 was performed 10 days previously to abolish the fluorescence of the sympathetic nerve fibres. To differentiate the catecholamine fluorescence from non-specific autofluorescence, sections were treated with sodium borohydride<sup>11</sup>.

Treatment with formaldehyde gas of freeze-dried sections of the dorsal-pedal artery of normal animals produced a strong, specific greenish fluorescence. The fluorescent material was seen to penetrate from the adventitia to smooth muscle layer of the media. However, no specific fluorescence was traced to the inner layer of the media. The elastic tissues of the adventitia showed an intense greenish autofluorescence, and a bright specific fluorescent material was found only near the border to the media (Figure 1).

The specific fluorescence in the media was increased in number and intensity after the injection of noradrenaline. Such an effect of noradrenaline lasted for at least 30 min.

Injection of reserpine or chronic resection of sympathetic trunk resulted in a complete disappearance of specific fluorescence in the smooth muscle layer of the media. Concomitantly, fluorescence of the adventitia also somewhat faded in the greenish tone, as compared with that of untreated animal (Figure 2). Treatment with sodium borohydride affected the fluorescence of media and adventitia, in a similar way to reserpine or sympathectomy.

It is noteworthy that catecholamine-fluorescent nerve fibres are detected to penetrate through the muscle layer of the media in the dorsal-pedal artery, the vascular bed where large-sized arteries transit to small-sized muscle arteries. Such a situation occurs in the forelimb arteries

of dogs as well<sup>12</sup> (unpublished observations). With the use of a silver impregnation technique on hyaluronidase-treated blood vessels, KIMURA and coworkers<sup>13,14</sup> found the existence of thick undulated nerve fibres in the media of the common carotid artery and abdominal aorta of dogs. From the results of denervation experiments, they have concluded that these thick nerve fibres are the intrinsic afferent nerves of the vascular wall, and that slender fibres which form the network running in the media and remain resistant to denervation are autonomic efferent fibres. The physiological significance of adrenergic fibres penetrating through the muscle layer in occasional arteries needs further study.

**Zusammenfassung.** Befunde bei Hunden mittels histochemischer Fluoreszenz erbringen den Nachweis des Eindringens von Catecholaminfluoreszenz-Nervenfasern in die glatten Muskelschichten der Media in der Arteria dorsalis pedis. Die Ergebnisse sind histochemisch, pharmakologisch und chirurgisch unterbaut worden.

K. TSUNEKAWA, K. MOHRI,  
M. IKEDA, N. OHGUSHI and M. FUJIWARA

*Department of Surgery and Department of  
Pharmacology, Kyoto University Medical  
School, Kyoto (Japan), 22nd November 1966.*

<sup>11</sup> H. CORRODI, N.-A. HILLARP and G. JONSSON, *J. Histochem. Cytochem.* 12, 582 (1964).

<sup>12</sup> K. TSUNEKAWA, K. MOHRI, M. IKEDA and N. OHGUSHI, unpublished observation.

<sup>13</sup> Y. M. CHENG and CH. KIMURA, *Acta neuroveg.* 17, 8 (1958).

<sup>14</sup> T. KITAHARA, *Archs Jap. Chir.* 28, 1560 (1959).

## Zur statistischen Verteilung von Generationszeiten

Durch Synchronisation sich gleichzeitig teilende Zellkulturen gehen bekanntlich sehr schnell wieder zu asynchroner Vermehrung über. Die Ursache dafür liegt in einer Variation der Zeitdauer, die von Teilung zu Teilung verstreicht, der Generationszeit  $T$  der einzelnen Zellen.

Über die Art der statistischen Verteilung dieses Intervalls herrscht trotz detaillierter Untersuchungen und vielfältiger mathematischer Überlegungen keine Einigkeit. Während manche Autoren die Normalverteilung annehmen<sup>1,2</sup>, haben die meisten anderen die Asymmetrie der Häufigkeitskurve, d.h. das Nichtzutreffen der GAUSSschen Normalverteilung erkannt<sup>3-6</sup>. KUBITSCHKE hat in den letzten Jahren daher vorgeschlagen, statt dessen eine Normalverteilung des reziproken Wertes der Generationszeit, der Generationsrate  $1/T$  anzunehmen<sup>5</sup>. Die Entscheidung, welche Art der Verteilung vorliegt, lässt sich aber allein graphisch – mit Hilfe entsprechender Wahrscheinlichkeitspapiere – nicht treffen.

Merkwürdigerweise ist die im biologischen Bereich so häufig vorkommende logarithmisch-normale Verteilung erst kürzlich in einer ausführlichen Arbeit von SCHMID<sup>7</sup> in Erwägung gezogen worden. Mit Hilfe der Maximum-Likelihood-Method wurde bei der Regressionsanalyse die Güte der Anpassung der angenommenen Verteilung von  $1/T$  bzw.  $\log T$  an experimentellen Daten geprüft. Die

mit einem Computer gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass bei allen 5 aus der Literatur entnommenen Messreihen die logarithmische Verteilung von  $T$  akzeptabel ist, während die  $1/T$ -Verteilung nur in 3 von 5 Fällen zutreffen könnte. D.h. der logarithmischen Normalverteilung kommt am ehesten eine allgemeine Bedeutung zu.

Ein weiterer Hinweis auf die grössere Wahrscheinlichkeit der logarithmisch-normalen Verteilung von  $T$  ergibt sich bei graphischer Darstellung. Die  $1/T$ -Verteilung führt zu einer ausserordentlich grossen Streuung bei kurzen mittleren Generationszeiten (grossen  $1/T$ -Werten), dagegen zu sehr steilen Funktionen bei langem Verdopplungsintervall (Figur 1). Der Unterschied in der Steilheit der verschiedenen Verteilungen ist jedoch gering und unabhängig von der mittleren Generationszeit, wenn eine logarithmisch geteilte Abszisse gewählt wird (Figur 2). Es ist bemerkenswert, dass dies für die verschiedensten Teilungsprozesse gilt: für die von Bakterien, von amito-

<sup>1</sup> H. F. BLUM und J. PRICE, *J. gen. Physiol.* 33, 285 (1950).

<sup>2</sup> G. FROESE, *Expl Cell Res.* 35, 415 (1964).

<sup>3</sup> C. D. KELLY und O. RAHN, *J. Bact.* 23, 147 (1932).

<sup>4</sup> D. KENDALL, *Biometrika* 35, 316 (1948).

<sup>5</sup> H. E. KUBITSCHKE, *Expl Cell Res.* 26, 439 (1962).

<sup>6</sup> K. B. DAWSON, H. MADOC-JONES and E. O. FIELD, *Expl Cell Res.* 38, 75 (1965).

<sup>7</sup> P. SCHMID, *Expl Cell Res.* 45, 471 (1967).