

calcium which was significantly greater ($P < 0.01$, t -test) than in the control samples at 7 min after stimulation, and also at 20 min after stimulation ($P < 0.05$). Recovery to non-significant levels occurred within 35 min. A second significant fall ($P < 0.05$) occurred between points 6 and 7. This fall in plasma calcium in response to vagal stimulation was prevented by atropinization and could also be initiated by injections of the parasympathomimetic drug Carbachol. Section of the left vagus gave no response, indicating that any nervous control is stimulatory and not inhibitory as has been found in the frog ultimobranchial¹³.

Although it has been demonstrated anatomically that there is a direct connection between the vagus and the innervated, densely-granulated, epithelioid cells within the ultimobranchial body, there is as yet no direct evidence that the drop in plasma calcium following vagal stimulation is caused by release of calcitonin from the innervated cells. Such evidence is at present being sought.

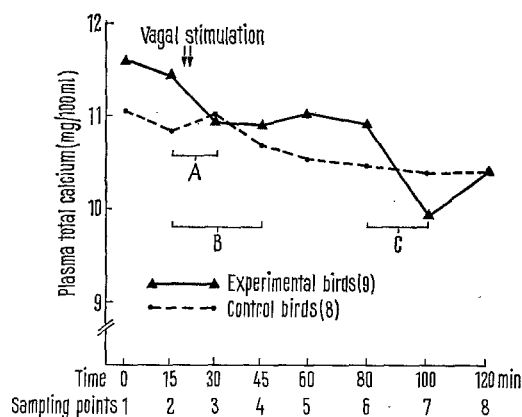


Fig. 3. Effects of vagal stimulation (arrows) upon plasma total calcium in young, anaesthetized cockerels compared with unstimulated, control animals. (A) The difference between points 2 and 3 in the experimental birds was significantly different ($P < 0.01$, t -test) to that in the controls. (B) and (C) The differences between points 2 and 4 and 6 and 7 in the experimental birds was significantly different ($P < 0.05$) to that in the controls.

The comparatively small and transient, though significant, decrease in plasma calcium is of interest when considered in the light of other results. The failure by several workers¹⁴⁻¹⁶ to demonstrate a fall in plasma calcium in intact chickens of various ages after the injection of either allogeneic or xenogeneic calcitonin has been ascribed to the probable ability of the fowl parathyroids to respond rapidly to a slight hypocalcaemia^{14,16}. Such a hypothesis would help to account for the transience of the response found here.

A neural mechanism of this nature, partially controlling calcitonin secretion, could conceivably have considerable significance in birds where there is a particularly active calcium metabolism associated with egg-shell formation.

Résumé. Le corps ultimobranchial de la poule a une forte innervation, provenant en particulier du nerf vague. On a constaté que des fibres nerveuses se terminent sur quelques groupes de cellules C. La stimulation du vague produit une chute significative du taux de calcium du plasma, ce qui démontre les propriétés d'un effet provoqué par voie parasympathique. On propose l'hypothèse que l'hypocalcémie peut être causée par une décharge de calcitonine venant des cellules C innervées.

R. D. HODGES¹⁷ and R. P. GOULD¹⁸

Wye College, University of London,
near Ashford (Kent, England), and
Department of Anatomy,
Middlesex Hospital Medical School,
London W1 (England), 4 August 1969.

¹³ D. R. ROBERTSON, *Z. Zellforsch.* 90, 273 (1968).

¹⁴ M. R. URIST, *Am. Zoologist* 7, 883 (1967).

¹⁵ A. D. KENNY. Reported by G. V. FOSTER, *New Engl. J. Med.* 279, 349 (1968).

¹⁶ L. KRAINTZ and K. INTSCHER, *Can. J. Physiol. Pharmac.* 47, 313 (1969).

¹⁷ Wye College (University of London), Nr. Ashford (Kent, England).

¹⁸ Department of Anatomy, Middlesex Hospital Medical School, London W1 (England).

Narrowings of the Synaptic Cleft in Myoneural Junctions

In the course of electron microscopic studies¹ on myoneural junctions in several species, narrowings of the synaptic cleft were observed in motor nerve terminals of the striated intraocular muscle fibres of the chicken (Figure 1) and in extraocular muscle fibres of the rat (Figure 2). In these narrowings, the 5-layered synaptic membrane complex of the myoneural junction is reduced to 3 layers; the plasma membranes of the nerve terminal and the muscle fibre, which are usually separated by a 500 Å gap containing a basement membrane layer, approach as close as 160 Å without interposition of basement membrane material (Figure 3).

According to previous investigations², the sphincter pupillae muscle of the chicken, in which narrowings of the synaptic cleft were found several times, consists only of muscle fibres with one motor endplate. These endplates do not have junctional folds. The nerve terminals contain

numerous synaptic vesicles both near the normal 5-layered synaptic membrane complex and near the 3-layered narrowings of the synaptic cleft (Figure 1).

The motor ending shown in Figure 2 was found in a multiply innervated muscle fibre³ of the orbital region in a lateral rectus bulbi muscle of the rat. The motor

¹ Fixation with glutaraldehyde in phosphate buffer and OsO₄, embedding in epon, double staining of ultrathin sections with uranyl acetate and lead citrate.

² W. ZENKER and E. KRAMMER, *Z. Zellforsch.* 83, 147 (1967).

³ On the basis of a detailed study of muscle fibre types and their innervation in rat extraocular muscles (R. MAYR, in preparation) we are now able to discern multiply innervated fibres in these muscles using fine structural criteria.

endings of this type of muscle fibre may have short junctional folds. Only few synaptic vesicles are located near the narrow regions of the junctional membrane complex of this fibre.

Our findings in the rat extraocular muscle seem to correspond to the 'axonal protrusions' recently described by TERÄVÄINEN⁴. To our knowledge, there is only one further report of a similar situation: KARLSSON and ANDERSSON-CEDERGREN⁵ show a motor junction of a frog intrafusal muscle fibre with many junctional folds and several places of close contact between the nerve and muscle fibre membranes. They characterize the situation as follows: 'In one of the motor junctions of the long type a peculiar membrane relationship was found, essentially showing evaginations of the axoplasm into dilated junctional folds which contacted the muscle fibre without interposition of a basement membrane. The meaning of this is obscured by the fact that it was observed in only one specimen and that it may represent a possible aberration in normal morphology⁶.

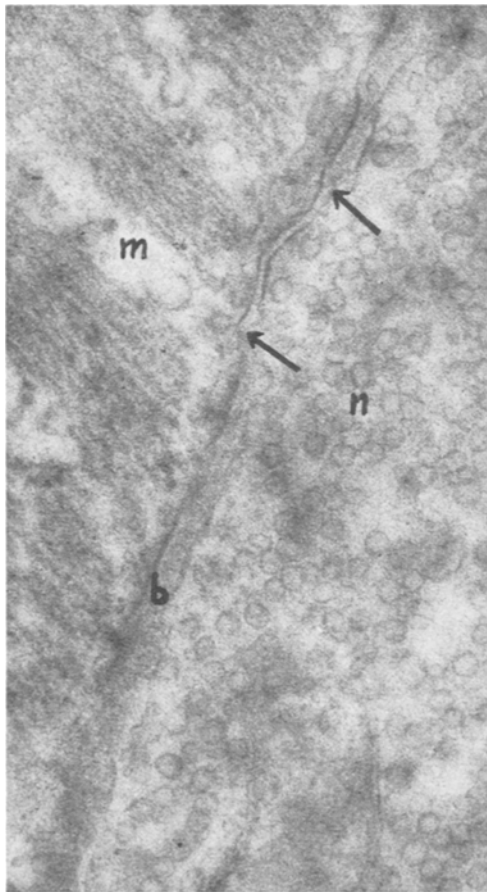


Fig. 1. Chicken, m. sphincter pupillae. Detail of a motor end-plate with narrowing of the synaptic cleft (between arrows). The basement membrane layer (b), seen in the normal part of the synaptic cleft, ends on either side of the narrowing. (n) Nerve terminal with many synaptic vesicles; (m) striated muscle fibre. $\times 60,000$.

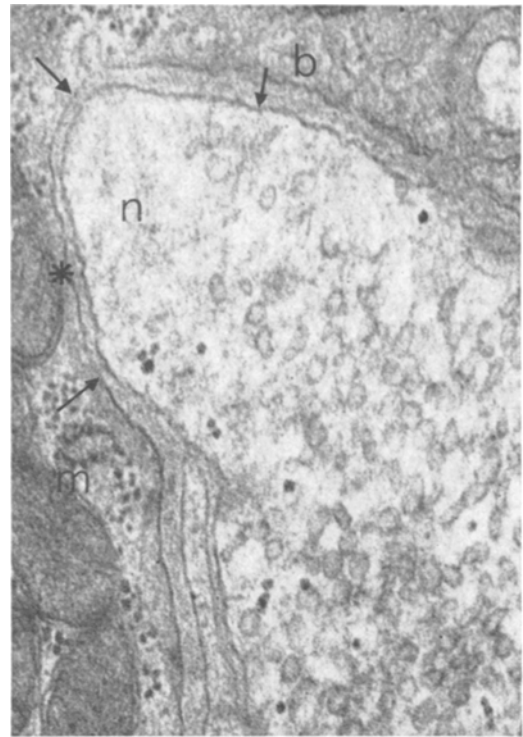


Fig. 2. Rat, m. rectus bulbi lat., orbital layer. Detail of a motor nerve ending in a multiply innervated muscle fibre with narrowing of the synaptic cleft (between arrows). Near the asterisk (*) the cleft is somewhat wider and contains a thin layer of basement membrane material, as is found in transition zones between normal synaptic cleft and narrowings. (n) Nerve terminals; (m) muscle fibre. $1000 \text{ \AA} = 100 \text{ \mu m}$. $\times 60,000$.

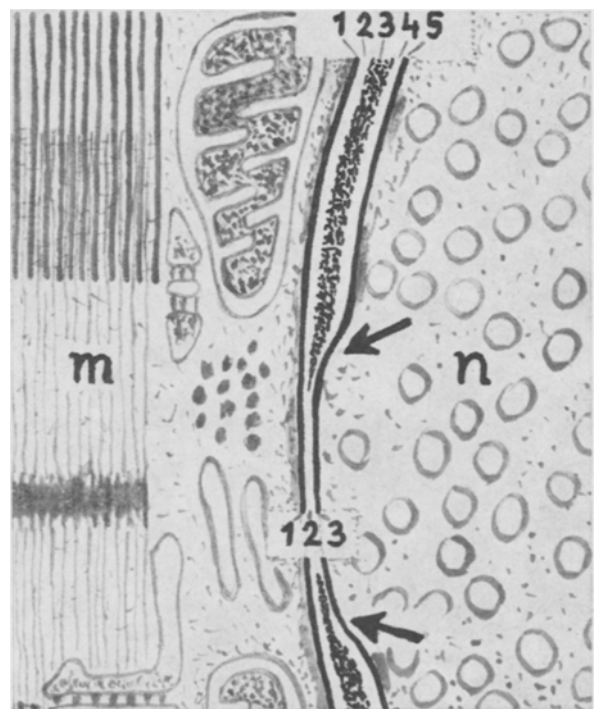


Fig. 3. Schematic drawing demonstrating the layer organization of the normal synaptic membrane complex and the narrowing of the synaptic cleft in myoneuronal junctions.

⁴ H. TERÄVÄINEN, *Z. Zellforsch.* 96, 206 (1969).

⁵ U. KARLSSON and E. ANDERSSON-CEDERGREN, *J. Ultrastruct. Res.* 14, 191 (1966).

⁶ Lately similar situations were shown in motor endings of mammalian intrafusal fibres (M. v. DÜRING and K. H. ANDRES, *Anat. Anz.* 724, 566 (1969)).

Until now, narrowings of the synaptic cleft without interposition of a basement membrane material were only seen in motor endings of special types of striated muscle fibres; they have so far not been found in common skeletal muscle fibres. However, further investigation is necessary in order to show whether we are actually dealing with a peculiar structural property of specialized types of motor nerve endings and whether these structures have a special functional meaning.

Zusammenfassung. In motorischen Endplatten der quergestreiften inneren Augenmuskulatur des Huhnes und

multipel innervierter Muskelfasern der äusseren Augenmuskeln der Ratte werden Verengungen des synaptischen Spaltes beschrieben. Die Plasmamembranen der terminalen Nervenfasern und der Muskelfaser nähern sich an diesen Stellen auf ca. 160 Å und die für die motorische Endplatte typische Basalmembranschicht fehlt im verengten synaptischen Spalt.

R. MAYR and W. ZENKER

Institut für Anatomie der Ruhr-Universität Bochum, A-1090 Wien (Austria), 21 July 1969.

Quantitative Untersuchungen über die Proteinsyntheseaktivität von Epidermiszellen während der Extremitätenregeneration der Urodelen¹

Für die Regeneration der Urodelenextremität ist der direkte Kontakt von Corium-freiem Wundepithel und unterliegendem Gewebe von grosser Bedeutung². Das einschichtige Wundepithel, das etwa innerhalb eines Tages die Wundfläche verschliesst, verdickt sich zu einer mehrschichtigen soliden Epidermiskappe, unter der sich in Abhängigkeit von ihrer Lage³ die Zellen des mesodermalen Blastems sammeln^{4,5}. Diese apikale Epidermiskappe stellt eine Ansammlung von Zellen dar, die von der intakten Epidermis zugewandert sind^{6,7}.

Untersuchungen über die Enzymaktivität dieser Epidermiszellen⁸ sowie autoradiographische Nachweise über den Aminosäure-Einbau in dieser Region⁹⁻¹¹ ergaben wichtige Hinweise über die relative Erhöhung ihres Stoffwechsels. Da nun die Epidermiszellen während des Wundverschlusses und der Ausbildung der Apikalkappe eine Volumenänderung erfahren, wurde untersucht, welche Zusammenhänge zwischen der Aktivierung der Proteinsynthese und den Volumenänderungen dieser Zellen bestehen.

Bei juvenilen *Triturus vulgaris* (12–15 Wochen nach der Metamorphose bei 18 °C) wurden die regenerierenden Vorderextremitäten vom 2. bis zum 22. Tag nach der Amputation auf ihre Proteinsyntheseaktivität hin untersucht. An medianen Längsschnitten der Regenerate wurde an Hand von Silberkornzählungen in Autoradiogrammen die Einbaurate von i.p. injiziertem ³H-Phenylalanin (Inkubationszeit: 3 h) ermittelt. Die Bestimmung von Zell- und Zellkerngrösse erfolgte in denselben Präparaten mit einem Mikroplanimeter¹². Bei den Untersuchungen wurden drei Epidermisbereiche geprüft: 1. Die Basis der Extremität (P); 2. der Bereich der Amputationsebene (A) und 3. die Regeneratspitze (D), das heisst das Wundepithel beziehungsweise die Apikalkappe. In jeder Region eines Regenerates wurden 60 Zellen gemessen und ausgezählt. Die Untersuchungen beschränkten sich auf die Basalschicht der Epidermis als ein System gleichartiger Zellen.

Die vom Wundrand über das Wundgewebe wandernden Epidermiszellen vergrössern ihr Volumen im Vergleich zu den Kontrollwerten intakter Extremitäten signifikant (Figur a). Die grössten Epidermiszellen lassen sich im untersuchten Zeitraum an der Regeneratspitze (D) nachweisen, und um den 7. Tag findet man hier maximale Volumenzunahme. Aus den Flächendaten lässt sich bestimmen, dass diese Zellen ihr Volumen etwa verdoppelt haben. Auch im Bereich der Amputationsstelle (A)

zeigen die Zellen eine deutliche Vergrösserung, jedoch nicht in einem solchen Ausmass wie die distalen Zellen. An der Extremitätenbasis (P) findet man in den ersten sechs Tagen Werte wie in der unbeeinflussten Epidermis. Danach können auch in diesem Bereich die Auswirkungen der Wundsetzung an Hand von Zellvergrösserungen nachgewiesen werden. Nach dem 10. Tag vermindern die vergrösserten Epidermiszellen wieder kontinuierlich ihr Volumen, und es ist ersichtlich, dass sich die Unterschiede mit zunehmender Differenzierung des Regenerates nivellieren. Die Volumenzunahme der Epidermiszellen beruht auf einer Vergrösserung der Zellkerne und – in weitaus grösserer Masse – auf einer Zunahme des Zytoplasmas. Nach dem DELESSESschen Prinzip¹³ lässt sich aus den Anschnitten angenähert das Volumenverhältnis von Kern und Zytoplasma bestimmen (siehe Figur b).

In der Basalschicht der unbeeinflussten Epidermis der Extremität nimmt der Zellkern etwa $\frac{2}{3}$ des gesamten Zellvolumens ein, das Volumenverhältnis ist also annähernd 2. Dieses Verhältnis verringert sich nach der Amputation in allen drei Messbereichen kontinuierlich bis zum 10. Tag und beträgt bei maximal vergrösserten Zellen (D) annähernd 1,0; Kern und Zytoplasma nehmen also in diesen Zellen etwa gleiches Volumen ein. Nach dem 10. Tag nimmt – besonders deutlich an der Extremitäten-

¹ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

² M. SINGER and M. M. SALPETER, in *Growth in Living Systems* (Basic Books Inc., New York 1961), p. 277.

³ C. S. THORNTON, in *Regeneration in Animals and Related Problems* (Eds. V. KIORTSIS and H. A. L. TRAMPUSCH; North Holland Publishing Co., Amsterdam 1965), p. 333.

⁴ H. J. ANTON, in *Regeneration in Animals and Related Problems* (Eds. V. KIORTSIS and H. A. L. TRAMPUSCH; North Holland Publishing Co., Amsterdam 1965), p. 377.

⁵ H. J. ANTON, Wilhelm Roux Arch. EntwMech. Org. 161, 49 (1968).

⁶ D. T. CHALKLEY, J. Morph. 94, 21 (1954).

⁷ E. D. HAY and D. FISCHMAN, Devl. Biol. 3, 26 (1961).

⁸ A. J. SCHMIDT, *The Molecular Basis of Regeneration: Enzymes* (University of Illinois Press, Urbana and London 1966).

⁹ C. W. BODMER and N. B. EVERETT, Devl. Biol. 1, 327 (1959).

¹⁰ H. J. ANTON, Wilhelm Roux Arch. EntwMech. Org. 153, 363 (1961).

¹¹ H. J. ANTON, Wilhelm Roux Arch. EntwMech. Org. 161, 49 (1968).

¹² T. CASPERSSON, T. FREDRIKSSON and K. G. THORSSON, Hereditas 39, 201 (1953).

¹³ A. HENNIG, Mikroskopie 12, 174 (1957).