

undifferentiated as it is known from conventional electron micrographs. It appears granular containing a few mitochondria and profiles of vesicles. Neurotubuli when broken crosswise showed a central lumen only in a few cases.

Terminal axons are frequently found by ultra thin sections. In freeze-etched replicas it is rather difficult to identify vegetative axons because of the absence of the characteristic envelope by the SCHWANN cell and the resulting similarity to muscle cell processes. The range of diameter of the vesicles varied between 320–1100 Å in the unfixed specimen, including clear vesicles as well as granular ones. The data coincide with the measurements obtained by conventional electron micrographs and confirm the observation made in the CNS by the use of the freeze-etching method. The terminal axolemma when exposed to the interstitium showed an increase of particulate elements at its exterior surface sometimes congregated in a rosette-like arrangement and lying in flat impressions of the membrane (Figure 2a).

In some cases we were able to obtain synaptic contacts of unmyelinated axons and smooth muscle cells. The striking observation in these 'active regions' are particles arranged in plaques at the exterior face of the presynaptic membrane (Figures 2, 3a and b). Some of these membrane-associated particles were just as grouped in the rosette-like formation as mentioned above (Inset). A similar distribution of the particles could be found at the interior presynaptic face, but they do not give the impression of such a circumscribed localisation as occurred at the exterior one (Figure 3b).

Considerable evidence indicates that these areas may represent the 'efficient zones' of the peripheral autonomic axons. The particulate elements may probably represent active protein complexes involved in the releasing mechanism of the transmitter substances. The terminal ax-

olemma occurs in cross fractures as well as in the 'en face' aspect rather flat without irregularities like invaginations or undulations that are common in conventional electron micrographs. Sometimes, however, when the axolemma was facing the interstitial space we found it bulged as if protruding from an underlying vesicle (Figure 2, →). Synaptopore-like formations that were found in synapses of the CNS and believed to be an essential feature of the presynaptic region were not definitely identified⁹.

Evidently, a detailed study with special reference to this problem should be carried out before data of the synaptic region of the CNS and the peripheral autonomic nerves can be successfully compared.

Zusammenfassung. Erstmals werden mit Hilfe der Gefrierätzung die Synapsen im Ductus deferens dargestellt, und es kamen dabei partikuläre Auflagerungen auf das Axolemma erstmals zur Darstellung.

R. DERMETZEL¹⁰

*Institute of Topographical Anatomy,
Klinikum Essen,
Hufelandstrasse 55,
D-43 Essen (Germany),
16 March 1972.*

⁹ K. AKERT, *Klin. Wschr.* 49, 509 (1971).

¹⁰ Acknowledgement: Thanks are due to Prof. H. BRETTSCHEIDER for his valuable advice and discussions and to Mrs P. DIERKES for her technical assistance. The author became aware of the study of C. E. DEVINE et al. (*J. Cell Sci.* 9, 411, 1971) after preparing the manuscript. In some points their results are in well agreement with the demonstrated finding.

Activité Cholinestérasique dans le rein du rat

Une activité butyrylcholinestérasique a pu être localisée dans la paroi des vaisseaux cérébraux chez le rat (DELBARRE et al.¹). Dans un travail récent, CONSTANTINIDIS et al.² ont montré que la barrière capillaire pour la DOPA était identique dans le cerveau et dans le rein. Il nous a donc paru intéressant de rechercher l'existence d'une activité cholinestérasique dans le rein du rat.

Matériel et méthode. Nous avons utilisé des rats de souche Charles-River dont le poids variait entre 200 et 400 g. Nos expériences ont porté sur 26 rats. L'animal est anesthésié avec du pentobarbital à la dose de 40 mg/kg par voie i.p. Par voie intracardiaque, on perfuse une solution isotonique de Na₂ SO₄ (16,7 g/l) suivie d'une solution isotonique de Na₂ SO₄ contenant du formol à 10% (30% p/v).

Le rein est alors rapidement prélevé et placé dans une solution isotonique de Na₂ SO₄-formol 10% pendant 4 h, à la température de 4°C. Le rein est ensuite lavé à l'eau distillée puis déposé dans une solution d'éthanol à 20% pendant au moins 24 h. La méthode de mise en évidence des cholinestérases est celle de KOELLE-FRIEDENWALD³. L'incubation est de 2 heures à 37°, pH 5,5. Les substances que nous avons utilisées sont les suivantes: Comme substrats: l'acétylthiocholine-iodide (Calbiochem) qui met en évidence l'activité cholinestérasique totale: acétylcholinestérases et butyrylcholinestérases. La butyrylthiocholine-iodide (Calbiochem) qui révèle spécifiquement l'activité des butyrylcholinestérases. Comme inhibiteurs:

l'iso-OMPA: tetra-isopropyl pyrophosphamide (Koch-Light Laboratories) qui inhibe spécifiquement les butyrylcholinestérases. Le BW 284 C 51: 1,5 bis (4 alkyl diméthyl ammonium pentan-3-one-dibromide) (Wellcome Research Laboratories) qui inhibe spécifiquement les acétylcholinestérases.

Avec les inhibiteurs, une période de préincubation d'une demi-heure est réalisée, le pH étant ajusté à 5,5.

Nous avons réalisé les protocoles suivants: 1. acétylthiocholine; 2. butyrylthiocholine; 3. acétylthiocholine + iso-OMPA; 4. butyrylthiocholine + iso-OMPA; 5. acétylthiocholine + BW 284 C 51; 6. butyrylthiocholine + BW 284 C 51.

Résultats. Nous n'avons trouvé aucune activité acétylcholinestérasique au niveau du parenchyme rénal. La réaction à l'acétylthiocholine, révélatrice de l'activité des acétylcholinestérase et ces butyrylcholinestérases est positive dans la paroi de certains vaisseaux, mais elle est négative en présence d'iso-OMPA, inhibiteur spécifique des butyrylcholinestérases et par contre, elle reste entière-

¹ B. DELBARRE, G. DELBARRE et P. JOBARD, *Experientia* 27, 922 (1971).

² J. CONSTANTINIDIS, J. C. DE LA TORRE, R. TISSOT et F. GEISSBUHLER, *Psychopharmacologia* 75, 75 (1969).
G. B. KOELLE and J. S. FRIEDENWALD, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 70, 617 (1949).

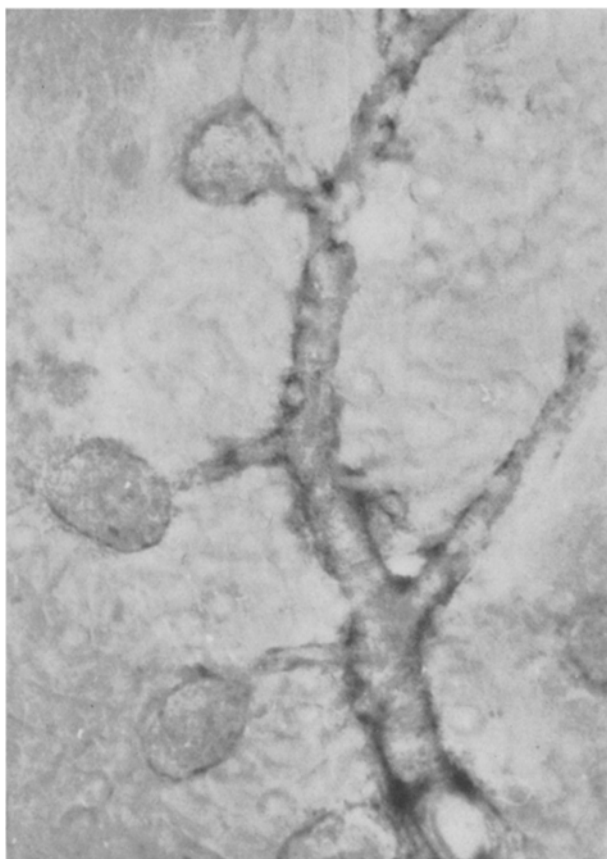


Fig. 1. Coupe transversale du rein chez le rat. Mise en évidence des cholinestérases par la méthode de KOELLE-FRIEDENWALD³. Réaction à la butyrylthiocholine. Présence d'une activité pseudocholinestérasique dans les parois des artères interlobulaires, des artères afférentes, dans la capsule de Bowman et le bouquet des capillaires glomérulaires.

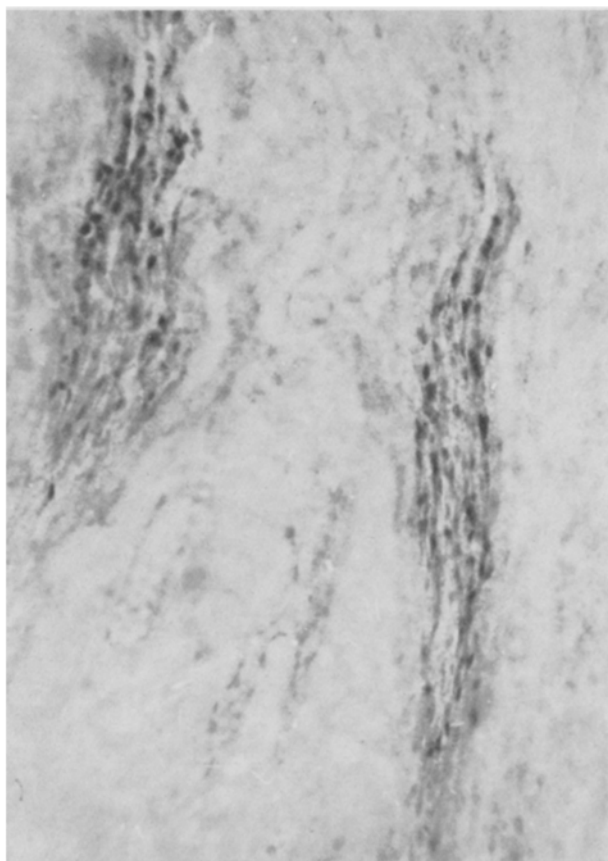


Fig. 3. A un plus fort grossissement, l'activité cholinestérasique apparaît nettement localisée dans les cellules endothéliales des artérioles droites fausses.

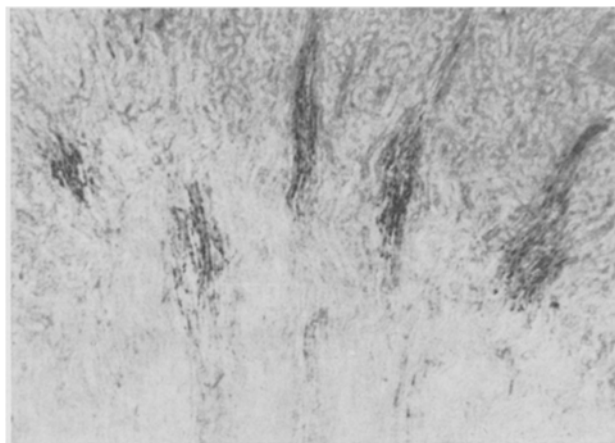


Fig. 2. Présence d'une activité pseudocholinestérasique dans la paroi des artérioles droites fausses.

ment positive en présence de BW 284 C 51, inhibiteur spécifique des acétylcholinestérases.

Nous avons localisé une activité butyrylcholinestérasique: au niveau des artères lobaires et arquées dans les fibres musculaires lisses de la média; au niveau des artères interlobulaires et des artères afférentes. Dans la

paroi de ces artères, l'intensité de la réaction n'est pas homogène et pourrait être localisée dans des cellules isolées (éléments contractiles ou cellules de Goormaghtigh) (Figure 1); au niveau des glomérules, dans les cellules de l'épithélium de revêtement de la capsule de Bowman et dans le bouquet des capillaires glomérulaires (Figure 1) (sans qu'on puisse préciser avec certitude le siège exact de cette activité); au niveau des artérioles droites fausses, réunies en petits groupes à la jonction de la corticale et de la médullaire, l'activité butyrylcholinestérasique apparaît nettement localisée dans les cellules endothéliales qui sont de grandes dimensions ovalaires ou aplaties (Figures 2 et 3).

Avec l'iso-OMPA, inhibiteur spécifique des butyrylcholinestérases, la réaction à la butyrylthiocholine est entièrement négative. Par contre, le BW 284 C 51, inhibiteur des acétylcholinestérases n'a aucune action sur l'activité des cholinestérases du rein. Nous n'avons pas localisé d'activité butyrylcholinestérasique dans les artères efférentes des glomérules, dans les veines droites fausses, dans les capillaires péri-tubulaires, ni dans les veines interlobulaires, arquées et lobaires.

Discussion. GRIETEN et GEREBTZOFF⁴ signalent la présence de la butyrylcholinestérase dans la paroi de certaines artères du hile du rein chez la souris. LONGLEY

⁴ J. GRIETEN and M. A. GEREBTZOFF, Ann. Histochim. 2, 217 (1959).

et al.⁵, dans une étude des «réseaux admirables» du rein chez le rat, décrivent une intense activité estérasiqne dans l'endothélium des artérioles droites fausses. ARVY⁶, démontre une intense activité cholinestérasiqne dans la paroi des artères interlobulaires, des artères afférentes et des glomérules mais l'attribue à l'acétylcholinestérase.

D'après nos constatations personnelles, les butyrylcholinestérases ont une localisation très particulière dans le rein du rat, puisque cette activité enzymatique n'apparaît que dans la paroi de certains vaisseaux.

La présence d'une importante activité butyrylcholinestérasiqne dans les fibres musculaires lisses de la média des artères lobulaires et arquées et dans la paroi des artères interlobulaires et afférentes laisse supposer que les butyrylcholinestérases pourraient intervenir dans la régulation du calibre de l'artère et par conséquent du débit sanguin dans le parenchyme rénal.

Dans les glomérules, les butyrylcholinestérases pourraient intervenir dans la filtration glomérulaire. Dans l'endothélium des artérioles droites fausses, elles pourraient jouer un rôle dans les modifications de perméabilité capillaire qui interviennent dans la régulation du mouvement des molécules et des ions soumis aux échanges par «contre-courant», par passage direct vers les veinules

droites fausses, cheminant parallèlement au contact des artérioles droites fausses et constituant avec elles un «réseau admirable». Le passage direct de certaines de ces substances vers les veinules droites fausses, du fait de «la multiplication de concentration par contre-courant» pourrait contribuer à la formation et à l'entretien de l'hyperosmolarité de la papille rénale.

Summary. A pseudocholinesterase activity was found in the wall of some vessels of the rat's kidney. The pseudocholinesterases could interfere in blood flow regulation and in capillary permeability.

G. DELBARRE, B. DELBARRE et P. JOBARD

Laboratoire d'Anatomie Pathologique, Faculté de Médecine, 2bis, Boulevard Tonnelle, F-37 Tours (France), 18 Février 1972.

⁵ J. B. LONGLEY, W. G. BANFIELD and D. C. BRINDLEY, J. biophys. biochem. Cytol. 7, 103 (1960).

⁶ L. ARVY, C. r. Acad. Sci., Paris 256, 1162 (1963).

Cell Proliferation and Cell Function of the Mesenchymal Cells of Lathyrotic Rats, as Revealed by the Nuclear Size

Several studies have been done in the past to examine the effect of lathyrism on the periodontal ligament of the rats¹⁻³. All these investigations mainly dealt with the weanling or adult rats kept on a lathyrus odoratus diet for various periods of time. So far no attempt has been made to produce lathyrism in rats during intrauterine life and to study the effect on the mesenchymal cells of the periodontal ligament after birth. The present study was initiated to study the differences between the lathyrotic and the normal control mesenchymal cells at a particular cellular level. A special technique was used to determine the changes in the size of cell nuclei.

Materials and methods. A total of 30 rats were used for this investigation. 10 belonged to the control and 20 to the experimental group. The experimental group was subdivided into 2; 10 rats were recovered from mothers who had received 2 mg of aminoacetonitrile from day 9 to 20 of gestation and the other 10 from mothers who had received 5 mg of aminoacetonitrile from 9 to 20 days of gestation. The rats were sacrificed on day 28, after birth.

The molar teeth were fixed in Susa (according to Heidenhain) decalcified in buffered EDTA and embedded in paraffin. For the determination of the nuclear size 7 μ m thick sections were stained according to Goldner. A Leitz projection microscope, built for horizontal projection, was mounted above a plane-table and the beam was bent vertically on the table by means of a prism. With a magnification of 2000:1 the nuclei were drawn from the projected contours and their size was determined with a planimeter. The measured values were classified in a logarithmically divided scale of rhythmic doubling intervals according to HINTZSCHE⁴. Each doubling interval (log 2), which represents the double nuclear volume, was divided into 4 subclasses (1a, b, c). Each subclass differed from the other and from the main class by a factor 1/4 log 2. The nuclear volumes were given in relative units (1-8). 100 nuclei of mesenchymal cells of the peri-

odontal ligament of 28-day-old rats from each of the 2 experimental groups and from the control group were drawn and measured by planimetry.

Findings. (Figure). In normal animals the distribution of the nuclear size is unlike a regular Gauss-distribution, because nuclei of a given size were more frequent (1c, 2a, 4, 4b, 8, 8b and c) than other sizes, thus several maxima were seen to spring up. However, the maxima are not distributed in 'rhythmic' doubling intervals. From this it can be inferred that in the normal animals the mesenchymal cells consist of at least 6 cell classes, with the nuclear size varying by about factor 10.

In the experimental animals the mean nuclear volume was distinctly larger than the controls, because in both experimental groups the small-sized nuclei were absent and the percentage of large-sized nuclei was higher. However, only in animals which received 5 mg of aminoacetonitrile a small number (4%) of nuclei belonged to a class which was never observed in the controls (class 16). The base of the curve of 3 nuclear size distributions was smaller than in the normal animals, thus, the nuclear size varied only by the factor 4 to 5. Furthermore, only 2 or 3 maxima were distinguishable, but these maxima were found to be arranged within the scope of 'rhythmic' doubling intervals (4b, 8b, and 2c, 8, 16).

Discussion. JACOB^{5,6} showed that in tissues and organs with a low rate of physiological regeneration the curve of nuclear volume distribution was unlike a Gauss-distribution, because 'maxima', that means accumulations of nuclei exhibiting nearly the same volume, were discernible.

¹ G. R. CASWELL, Iowa dent. Bull. 42, 193 (1956).

² A. F. GARDNER, J. Periodont. 30, 253 (1959).

³ G. A. KRIKOS, J. dent. Res. 38, 27 (1959).

⁴ E. HINTZSCHE, Experimentia 7, 103 (1945).

⁵ W. JACOB, Wilhelm Roux Arch. Entw. Mech. Org. 106, 124 (1925).

⁶ W. JACOB, Z. mikrosk.-anat. Forsch. 38, 161 (1935).