

Cellular Membrane Activity in the Corneal Endothelium of the Intact Eye

It is well known in ophthalmology that the outlines of the endothelial cells of the cornea may be seen by using the reflected beam of the slit-lamp. In clinical practice the useful magnification is limited by the subject's eye movements, but restrictions on space would prevent the use of high magnification with conventional instruments.

An apparatus has been constructed which allows the corneal surfaces to be examined under an objective of high power. Essentially, the aperture of the objective is divided across its centre. Light is then shone down one side of it so that by reflection in the plane cellular sheet it passes up the other side, which forms an image that can be viewed or photographed in the conventional manner (Figure 1). The term reflection microscopy is already used in another sense, so the term specular microscopy is suggested for this procedure.

A $\times 40$ water immersion objective with a 1.6 mm working distance is employed for this purpose. The image can be focussed by moving the stage, but greater stability of focus is ensured if the outer surface of the cornea is moved relative to the objective by means of a glass coverslip fixed to a cap screwed over the outside of the objective itself. The source of light is in the form of a slit focussed on the object plane. This is desirable to prevent details of the image being concealed by glare from the overlying stromal tissue, and contrast can be improved by inserting a yellow or orange filter. Although the objective is not being used under the proper optical conditions, it appears to be resolving useful detail without evident distortion, at least up to magnifications of $\times 400$ in the centre of the field.

This technique allows functioning endothelial cells to be examined in the intact eyeball. Apart from the cell boundaries, numerous markings can be seen (Figure 2). The form of these markings does not correspond to that of mitochondria or other intracellular organelles, and it is most probable that they represent discontinuities in one of the cellular surface membranes. A prominent recurring appearance is that of doubled lines and, less frequently,

completed circles. Doubling of the cell boundaries is a so frequently seen and these also show discontinuities and tortuosities. All these appearances can be duplicated in

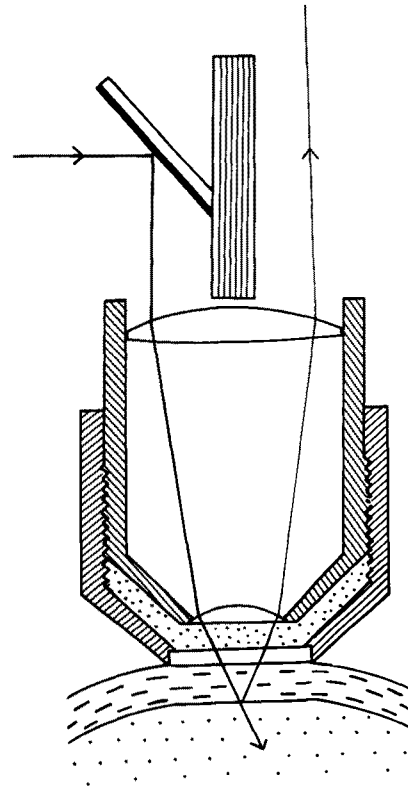


Fig. 1. Schematic optical system of specular microscope. Corneal endothelium is focussed by screwing cap on outside of objective.

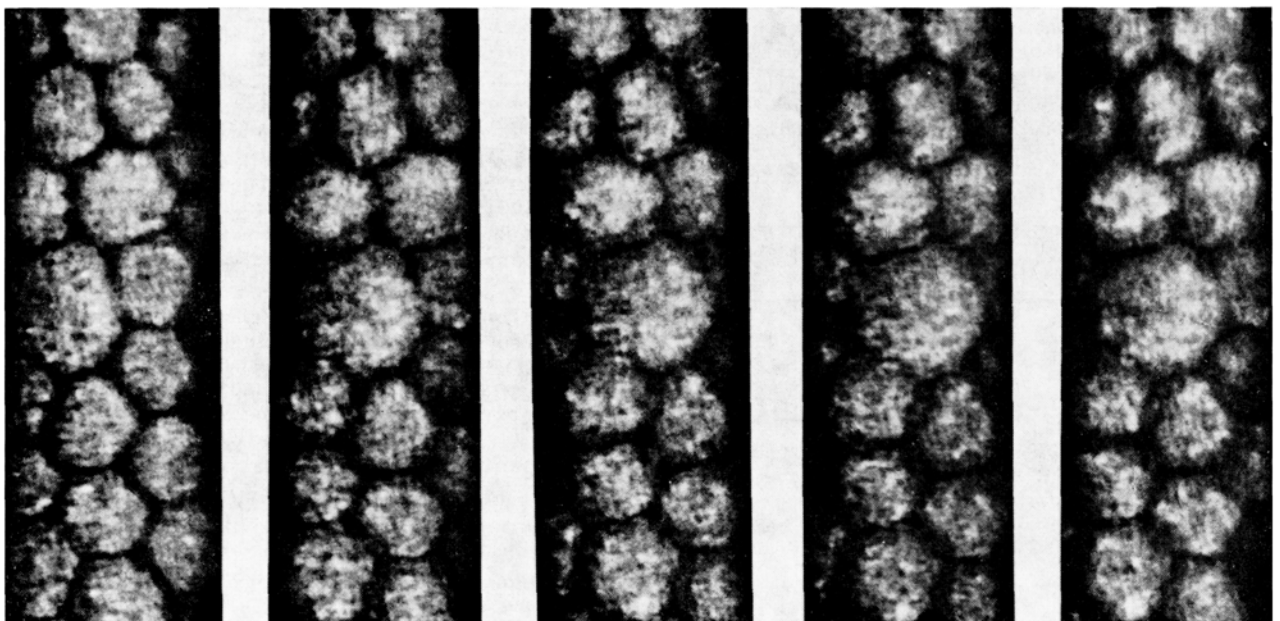


Fig. 2. Photographs of corneal endothelium of rabbit's eye at 35°C taken at $\frac{1}{2}$ min intervals, immediately after warming from storage at 4°C for 2 h. $\times 500$ approx.

the isolated stained cell layer¹⁻³ showing that the optical irregularities have more than a superficial structural basis. Continued observation shows that these markings are undergoing continual changes in form, as are the cell boundaries to a lesser extent in certain places.

This has a particular significance because the endothelium is believed to be the site of an active fluid transport mechanism which controls the corneal hydration^{4,5}. There is suggestive evidence that the intercellular spaces, which are involved in considerable infoldings on the basal surface of the cells, are implicated in this transport mechanism⁶⁻⁸, and that membrane-bound vesicles may also play a part in the process. Until the nature of these markings can be established by comparison with electron micrographs, their relationship to the transport process must remain speculative, and this study is presently being undertaken.

Zusammenfassung. Die direkte Beobachtung des Hornhautendothels wird mit einem speziellen Mikroskop mög-

lich. Formveränderungen der Zellen, besonders ihrer Oberflächenmembranen, lassen sich zeigen.

D. M. MAURICE⁹

Department of Physiology, Institute of Ophthalmology, London, W.C.1 (England), 4 April 1968.

¹ E. ZANDER and G. WEDDELL, *J. Anat.* 85, 68 (1951).

² J. S. SPEAKMAN, *Br. J. Ophthal.* 43, 139 (1959).

³ K. E. SKRZYPSAK, *Acta ophthal.* 41, 377 (1963).

⁴ S. MISHIMA and T. KUDO, *Invest. Ophthal.* 6, 329 (1967).

⁵ D. M. MAURICE, in *The Eye* (Ed. H. DAVSON; Academic Press, New York and London 1962; 2nd edn in press).

⁶ G. I. KAYE and G. D. PAPPAS, *J. Cell Biol.* 12, 457 (1962).

⁷ G. I. KAYE, G. D. PAPPAS, A. DONN and N. MALLETT, *J. Cell Biol.* 12, 481 (1962).

⁸ S. HODSON, *Expl Eye Res.* 7, 221 (1968).

⁹ Present address: Division of Ophthalmology, Stanford Medical School, Palo Alto, Calif. 94305.

Elektronenmikroskopische Beobachtungen bei experimenteller Poliomyelitis

Bei einem Javaneraffen (*Cynomolgus irus*), der nach einer i.m. Poliovirus-Inokulation (hochvirulenter Stamm vom Typ III¹; 2×10^7 TCD₅₀ in 2 ml Gewebekulturüberstand) eine schwere Tetraplegie entwickelt hatte, wurden 6 Tage post infectionem mehrere Gewebestückchen aus den Vorderhörnern der Lumbalintumeszenz unter Anwendung gebräuchlicher Fixierungs- und Einbettungsmethoden (Glutaraldehyd, Osmiumtetroxyd, Epon 812) mit dem Elektronenmikroskop (Zeiss EM 9A) untersucht. Die übrigen Anteile des Rückenmarks dienten für lichtmikroskopische und fluoreszenz-immunologische Kontrollen.

In den histologischen Präparaten waren ein erheblicher Ausfall von spinalen Motoneuronen sowie eine herdförmige bis diffuse Infiltration der Vorderhörner mit vornehmlich mononukleären Zelltypen zu erkennen. Polymorphkernige Granulozyten traten verhältnismässig spärlich in Erscheinung. Immunhistochemisch liess sich Poliovirus-Antigen in den Wänden der meisten intraspinalen Blutgefässe und in zahlreichen mononukleären Elementen nachweisen. Elektronenmikroskopisch konnten in den Perikaryen von Endothelzellen intraspinaler Kapillaren und Venen wiederholt Ansammlungen von rundlichen, ziemlich dichten Partikeln beobachtet werden. Diese Teilchen wiesen einen einheitlichen Durchmesser von ungefähr 27 nm auf und waren überwiegend in Form kristallgitterartiger Gefüge mit hexagonalem oder quadratischem Verteilungsmuster angeordnet (Figur 1). Solche intrazytoplasmatische Partikelaggregate trafen wir weiterhin überaus häufig in Zellen mit den feineren Strukturmerkmalen von Monozyten, Histiozyten und Makrophagen an (Figur 2). In polymorphkernigen Granulozyten sowie in Nervenzellen, Astrozyten und Oligodendrogliazellen bekamen wir sie eigentümlicherweise bisher niemals zu Gesicht. Die kristalloiden Partikelansammlungen, deren dreidimensionale Ausdehnung sich an Hand von Serienschnttaufnahmen leicht feststellen liess, lagen meist ohne Membranbegrenzung im Grundzytoplasma, vereinzelt aber auch innerhalb von Zisternen des endoplasmatischen Retikulums. Hervorzuheben ist, dass sie sich weder bei den Endothelien noch

bei den mobilen Zelltypen innerhalb von Phagosomen oder Restkörpern vorfinden.

Die von uns festgestellte Abmessung der Einzelpartikel stimmt weitgehend mit den Grössenangaben überein, die andere Autoren für komplette Polioviren gemacht haben²⁻⁸. Ausserdem zeigen die Partikelanordnungen grosse Ähnlichkeit mit Polioviruskristallen, wie sie in Viruspräparationen von hoher Reinheit³⁻⁷, in Elementen infizierter Zellkulturen⁸⁻¹² und in Zellen von infizierten Versuchstieren^{13,14} zur Beobachtung gekommen sind. Für die Identität der Partikel mit Polioviren sprechen nicht zuletzt auch unsere bereits oben erwähnten fluoreszenz-immunologischen Untersuchungsergebnisse.

Es dürfte wohl kaum einem Zweifel unterliegen, dass für die intrazelluläre Bildung von Viruskristallen in der Hauptsache eine hohe örtliche Konzentration relativ reiner Viren erforderlich ist. Somit kann das gehäufte Vorkommen von Polioviruskristallen in den Endothelzellen intraspinaler Blutgefässe und in verschiedenen

¹ D. MAGRATH und Mitarb., Manuskript in Vorbereitung.

² A. B. SABIN, W. A. HENNESSEN und J. WARREN, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 85, 359 (1954).

³ C. E. SCHWERDT, R. C. WILLIAMS, W. M. STANLEY, F. L. SCHAFFER und M. E. MCCLAIN, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 86, 310 (1954).

⁴ C. E. SCHWERDT und F. L. SCHAFFER, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 67, 740 (1955).

⁵ A. R. TAYLOR und M. J. McCORMICK, *Yale J. Biol. Med.* 28, 589 (1956).

⁶ R. L. STEERE und F. L. SCHAFFER, *Biochim. biophys. Acta* 28, 241 (1958).

⁷ F. S. SJÖSTRAND und A. POLSON, *J. Ultrastruct. Res.* 1, 365 (1958).

⁸ D. C. STUART und J. FOGH, *Expl Cell Res.* 18, 378 (1959).

⁹ J. FOGH und D. C. STUART, *Virology* 11, 308 (1960).

¹⁰ D. C. STUART und J. FOGH, *Virology* 13, 177 (1961).

¹¹ H. D. MAYOR und L. E. JORDAN, *Virology* 16, 325 (1962).

¹² S. DALES, H. J. EGERS, I. TAMM und G. E. PALADE, *Virology* 26, 379 (1965).

¹³ K. MANNWEILER und O. PALACIOS, *Z. Naturf.* 16b, 705 (1961).

¹⁴ M. KANAMITSU, A. KASAMAKI, M. OGAWA, S. KASAHARA und M. IMAMURA, *Jap. J. med. Sci. Biol.* 20, 175 (1967).