

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNG DER WIRKUNG VON ÄUSSEREN FAKTOREN AUF DAS NEUROSEKRETORISCHE SYSTEM DES WASSER- FROSCHES, *RANA ESCULENTA* L.

von

DR. MAGDOLNA MÖDLINGER-ODORFER

und

ZSUZSANNA HÁRSKUTI-HORVATOVICH

Lehrstuhl für Allgemeine Zoologie und Vergleichende Anatomie der Eötvös Loránd Universität,
Budapest

Eingegangen: 15. September 1966

Aus der Analyse der an homoiothermen Tieren ausgeführten Rhythmenuntersuchungen konnte der Schluss gezogen werden, dass in der Aufrechterhaltung und Regulierung der in dem Organismus dieser Tiere sich abspielenden jahreszeitlichen und tagesperiodischen rhythmischen Änderungen die Qualität des Lichtes bzw. der Wechsel von Licht und Dunkelheit als Zeitgeber eine wichtige Rolle spielt. Diese Feststellung wurde auch durch die Versuche bekräftigt, in welchen die rhythmischen Vorgänge durch Lichtstrahlen verschiedener Wellenlänge [Mödlinger (12)], Überbelichtung [Bissonnette (1, 2, 3)], Dauerlicht und Dauerdunkel [Mödlinger-Odorfer (13)] beeinflusst worden waren.

Während die periodischen Lebensvorgänge der homoiothermen Tiere von der Aussentemperatur im allgemeinen unabhängig sind [Bünning (4), Sollberger (16)], musste man bei den Poikilothermen laut der van t'Hoff'schen Regel einen regulierenden Einfluss der Temperatur erwarten [Hoffmann (11)]. Diesbezüglich liegen in der Literatur verhältnismässig wenige und widerspruchsvolle Angaben vor. Deshalb erhob sich der Gedanke, zu untersuchen, welchen Einfluss die niedrige bzw. hohe Temperatur mit Dauerlicht bzw. Dauerdunkel kombiniert auf das hypothalamisch-hypophysäre System des zu den poikilothermen Tieren gehörigen Wasserfrosches, *Rana esculenta* L. ausübt.

Material und Methodik

34 geschlechtsreife, männliche Wasserfrösche, *Rana esculenta* L. wurden in vier Gruppen geteilt und eine jede Gruppe unter andere experimentelle Verhältnisse gebracht, namentlich wurden sie der Einwirkung von Kälte und

Dauerlicht, Wärme und Dauerlicht, Kälte und Dauerdunkel, ferner Wärme und Dauerdunkel ausgesetzt. Die Kälte bedeutete $+3 - +4^{\circ}\text{C}$, die Wärme $+20^{\circ}\text{C}$. Das Dauerlicht wurde durch Glühlampen von 200 W-Leistung gesichert. Die Glühlampen waren von den Tieren in solchem Abstand, dass die Wärmestrahlen sie nicht erreichten. Die Versuche wurden Ende Januar, Anfang Februar mit einer Zeitdauer von zwei Wochen durchgeführt. Die Gehirne der in den Vormittagsstunden mittels Dekapitation getöteten Tiere fixierten wir in dem Bouinschen Fixierungsgemisch und die nach dem Péterfischen Methylbenzoat-Zelloidin-Paraffin Einbettungsverfahren angefertigten, $5\ \mu$ dicken Serienschitte wurden mit der Chromhämatoxylin-Phloxin Färbung nach Gömöri gefärbt.

Ergebnisse

Der aus neurosekretorischen Zellen bestehende Nucleus praeopticus magnocellularis des Wasserfrosches befindet sich an beiden Seiten des Recessus praeopticus, unmittelbar unter dem Ependym. Die Fortsätze dieser Zellen ergeben den Tractus praeoptico-hypophysaeus, der das Neurosekret in die Eminencia mediana und in den Hinterlappen der Hypophyse befördert.

Die neurosekretorischen Zellen der *in Kälte und Dauerlicht* gehaltenen Tiere sind klein, am Rande des schmalen Zytoplasmasaumes sind Nissl-Schollen und zwischen diesen kleine Randvakuolen wahrnehmbar. Neurosekretorische Körnchen kommen im Zytoplasma entweder gar nicht vor oder sind nur klein und sehr selten zu beobachten. Die von den Zellen ausgehenden Fortsätze lassen sich höchstens über eine kurze Strecke verfolgen, da sie im allgemeinen leer sind oder nur wenige, feine Körnchen enthalten, die Randvakuolen können auch in die Fortsätze eindringen. (Abb. 1.) Im proximalen Abschnitt des Tractus praeoptico-hypophysaeus kommen perlschnurartige Gebilde nur vereinzelt und Herring-Körper gar nicht vor.

Als Folge der gemeinsamen Wirkung der *Wärme und des Dauerlichtes* vergrössern sich die neurosekretorischen Zellen, sie enthalten nur spärlich Nissl-Schollen, hingegen ist das Zytoplasma voll mit gleichmässig verteilten, feinen, mit Chromhämatoxylin färbbaren Körnchen. Vakuolen sind nicht zu beobachten. Die Fortsätze der Zellen lassen sich weithin verfolgen, diese sind auch reich an neurosekretorischen Körnchen, die sich vom Zelleib entfernt zu einer homogenen Sekretmasse verschmelzen. Häufig sehen wir auch mit grossen Neurosekrettropfen beladene Zellen. Viele feine Tröpfchen kommen interzellulär vor, auch sind solche unter dem Ependym in grosser Anzahl zu beobachten. (Abb. 2.) Im Gebiet des Tractus praeoptico-hypophysaeus sind Perlschnurfasern gut wahrnehmbar, ferner kommen auch häufig grosse Herring-Körper vor.

Die neurosekretorischen Zellen der *in Kälte und Dauerdunkel* gehaltenen Frösche sind klein, ihr Zytoplasma ist mit groben und zerstreuten, mit Chromhämatoxylin färbbaren Körnchen gefüllt, die Nissl-Schollen fehlen, dagegen sehen wir häufig kleinere und grössere Vakuolen, die nicht nur am Zellrande, sondern im ganzen Zelleib vorkommen können. Die Fortsätze der Zellen können wir nur unmittelbar an ihrem Ursprung beobachten, (Abb. 3.) nur wenige Perlschnurfasern sind zu sehen und selbst kleine Herring-Körper kommen nur vereinzelt vor.

Der Einfluss der *Wärme und des Dauerdunkels* äussert sich darin, dass die unter diesen Verhältnissen gehaltenen Tiere gegenüber den vorausgehenden drei, einheitlichen Gruppen ziemlich grosse individuelle Unterschiede zeigen. Die Zellen sind im allgemeinen klein, sie enthalten in der Regel Nissl-Schollen, dagegen können wir Neurosekretkörnchen nicht in jeder Zelle beobachten, und wenn letztere auch vorkommen, so sind sie sehr fein verteilt. An mehreren Tieren sehen wir im Nucleus praeopticus vieleckige, der Einschmelzung anheimfallende, mit Phloxin sich färbende Zellen. (Abb. 4.) Auch interzelluläre, vakuolisierte Sekretmassen kommen häufig vor und auf dem Gebiete des Tractus praeoptico-hypophyseus sind viele, gleichfalls vakuolisierte perlschnurartige Gebilde zu beobachten. Ebenda kommen wenige Herring-Körper vor.

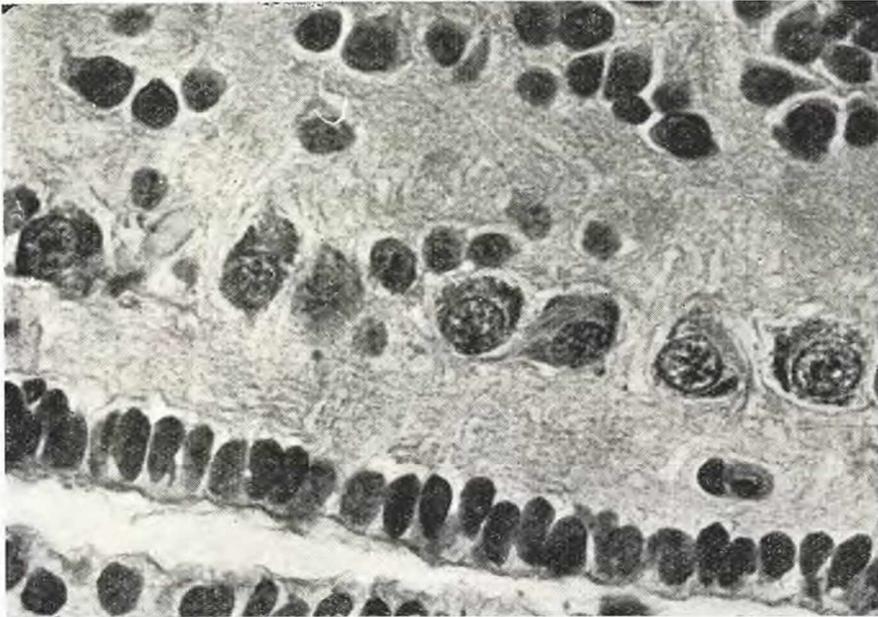


Abb. 1. Nucleus praeopticus des Wasserfrosches. Kälte-Dauerlicht.
Chromhäm.-Phloxin Färbung. 640 \times

Die Eminentia mediana der Frösche teilt sich in zwei Zonen [Diepen (7), Dawson (5, 6), Dierickx und vanden Abeele (8)], in eine innere, subependymale und in eine äussere Zone. Der inneren Zone entlang ziehen sich die meisten Fasern des Tractus praeoptico-hypophyseus, welche das Neurosekret in den Hinterlappen der Hypophyse befördern. In der äusseren Zone enden um die Kapillaren des portalen Gefässsystems des Vorderlappens die übrigen Fasern des Tractus. In dieser Zone stapelt sich das Neurosekret, an die Struktur des Hinterlappens erinnernd, um die Gefässe auf.

Die, in der inneren Zone der Eminentia mediana der in Wärme gehaltenen Tiere vorkommenden vielen, kleinen und grossen Neurosekrettropfen (Abb. 5.) lassen auf einen regen Transport folgern, was mit unserer Wahrnehmung, laut



Abb. 2. Nucleus praeropticus des Wasserfrosches. Wärme-Dauerlicht.
Chromhäm.-Phloxin Färbung. 640×

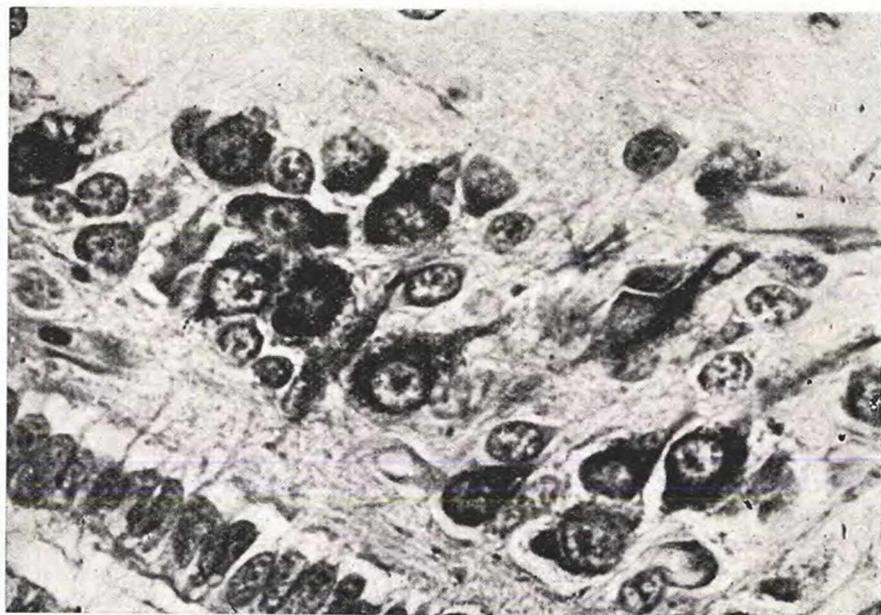


Abb. 3. Nucleus praeropticus des Wasserfrosches. Kälte-Dauerdunkel.
Chromhäm.-Phloxin Färbung. 640×

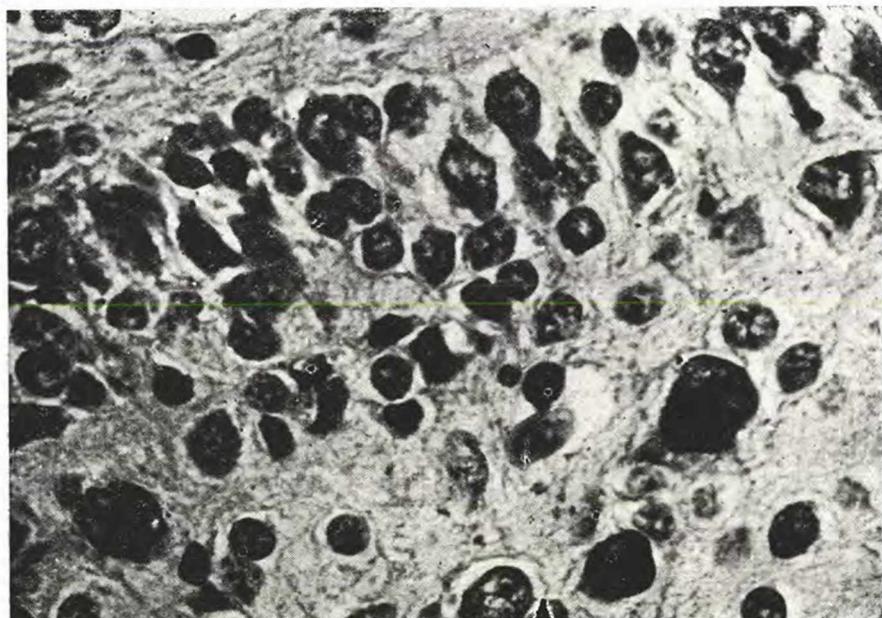


Abb. 4. Nucleus praeropticus des Wasserfrosches. Wärme-Dauerdunkel.
Chromhäm.-Phloxin Färbung. 640×

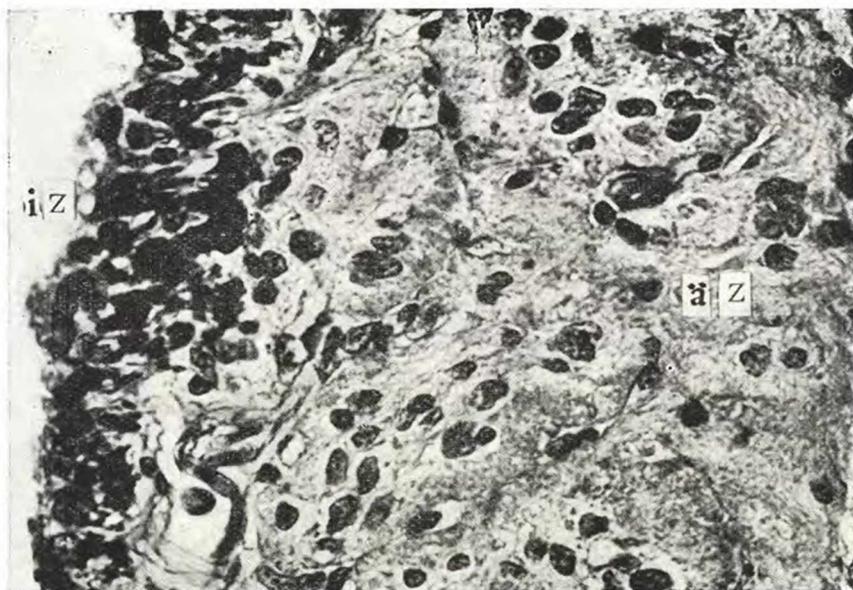


Abb. 5. Eminentia mediana des Wasserfrosches. Wärme-Dauerlicht. i. Z.
— innere Zone; ä. Z. — äussere Zone. Chromhäm.-Phloxin Färbung. 640×

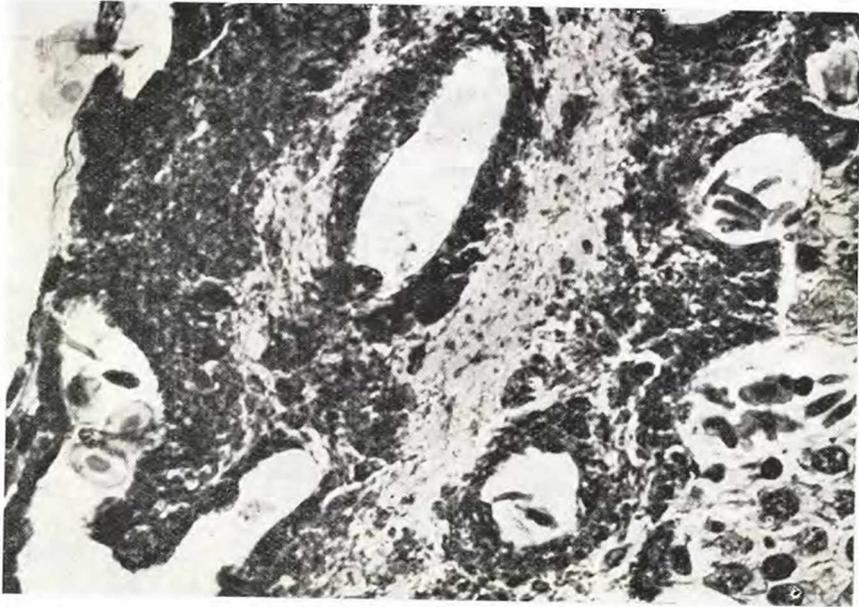


Abb. 6. Hinterlappen der Hypophyse beim Wasserfrosch. Wärme-Dauerdunkel.
Chromhäm.-Phloxin Färbung. 640 \times

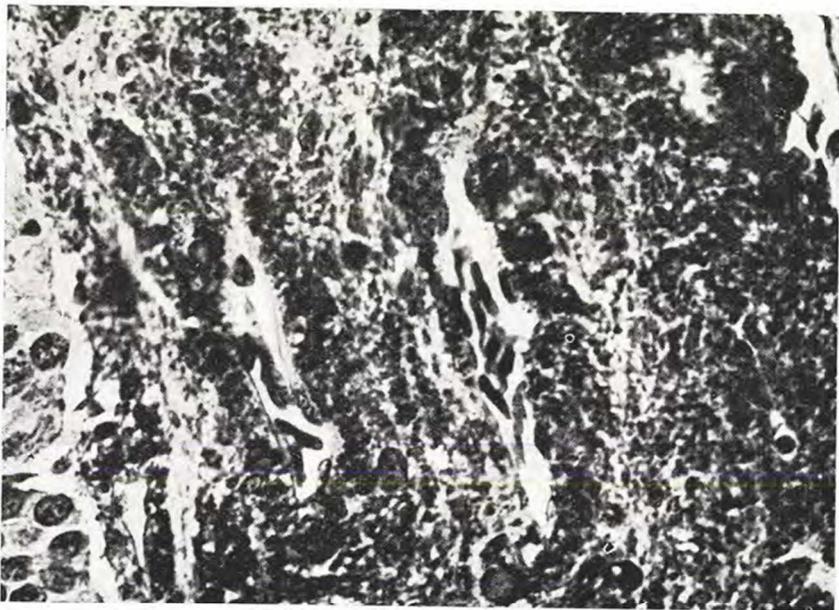


Abb. 7. Hinterlappen der Hypophyse beim Wasserfrosch. Kälte-Dauerlicht.
Chromhäm.-Phloxin Färbung. 640 \times

deren sich im Hinterlappen derselben Tiere um die weiten Gefässe eine grosse Menge Neurosekret aufstapelt und viele Herring-Körper vorkommen, in Einklang steht. (Abb. 6.) Dagegen enthalten die Fasern der inneren Zone der in Kälte gehaltenen Tiere nur wenige, kleine Neurosekrettropfen und in dem Hinterlappen dieser Tiere verteilt sich das Neurosekret gleichmässig, Herring-Körper fehlen oder sind nur sehr selten zu beobachten. (Abb. 7.)

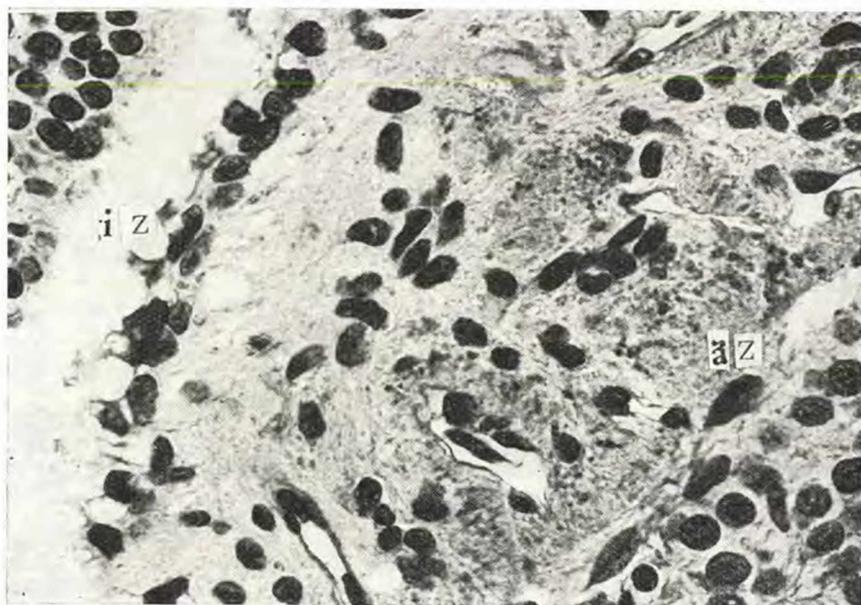


Abb. 8. Eminentia mediana des Wasserfrosches. Kälte-Dauerlicht. i. Z. — innere Zone; ä. Z. — äussere Zone. Chromhäm.-Phloxin Färbung. 640 \times

Die äussere Zone der Eminentia mediana enthält im Falle der bei niedriger Temperatur gehaltenen Tiere in grösserer Menge gleichmässig verteilte, kleinere Neurosekretkörnchen, (Abb. 8.) während in derselben Zone der Eminentia mediana von bei höherer Temperatur gehaltenen Fröschen nur wenige, grössere Körnchen vorkommen, welche an einigen Tieren um die Gefässe herum eine Palisadenstruktur zeigen.

Besprechung der Ergebnisse

Auf Grund unserer Versuchsergebnisse können wir feststellen, dass die niedrige Temperatur die Neurosekretion hemmt, während die höhere Temperatur, besonders mit Dauerlicht kombiniert, sowohl die Bildung des Neurosekrets in den Zellen des Nucleus praeopticus, als dessen Transport in den Hinterlappen des Hirnanhanges kräftig stimuliert. Unsere Feststellungen stehen in Einklang mit denen von *Woitkewitsch u. Mitarb.* (17), welche sie an Fröschen bei Anwendung von Wärme und Kälte im Frühling und im Herbst erhielten. Sie

fanden, dass die Wärme die Neurosekretion besonders im Frühling steigert, während die Kälte dieselbe hauptsächlich im Herbst hemmt. Nach unserer Ansicht haben in ihren Versuchen im Frühling die länger werdenden Tage, also die Mitwirkung des Lichtes die aktivierende Wirkung der Wärme verstärkt. Die stimulierende Wirkung des Lichtes und der hemmende Einfluss der Dunkelheit an die Neurosekretion der Frösche wurde auch von Re y und Cham bon (15) beobachtet.

Da die von uns gestellten experimentellen Verhältnisse zwischen gewissen Grenzen die Jahreszeiten nachahmten (die niedrige Temperatur und das Dauerlicht entsprechen dem Frühling, die höhere Temperatur und das Dauerlicht dem Sommer, die niedrige Temperatur und das Dauerdunkel dem Winter), scheint es wünschenswert, die von uns beobachteten Phänomene mit den von anderen Autoren festgestellten jahreszeitlichen Änderungen zu vergleichen. Sowohl Paulsen (14), als Dierickx u. Mitarb. (9), ferner Dierickx und van Meirvenne (10) fanden, dass im Winter die Zellen des Nucleus praeopticus des Grasfrosches, *Rana temporaria* L. inaktiv sind und in ihren Perikaryen sich grobe neurosekretorische Körnchen ansammeln. Dieses morphologische Bild entspricht dem Stadium, welches wir an den in Kälte und in Dauerdunkel gehaltenen Tieren beobachtet haben. Der Reichtum der neurosekretorischen Zellen an feinen Körnchen, das Vorkommen interzellulärer Tropfen und die vielen Perlschnurfasern und Herring-Körper im Gebiet des Tractus praeoptico-hypophyseus der der Wirkung von Wärme und Dauerlicht ausgesetzten Frösche zeigen jedoch eine auffallende Ähnlichkeit zu all den Eigenschaften, die Dierickx u. Mitarb. (9) als für den Frühling und Sommer charakteristisch schildern.

Nebenbei, dass unsere Ergebnisse die Feststellungen von Dierickx u. Mitarb. (9), bekräftigen, dass namentlich die Zellen des Nucleus praeopticus gegen die Änderungen der Aussentemperatur sehr empfindlich wären und schneller reagierten, als die meisten anderen Organe, sind jene Unterschiede ebenfalls charakteristisch, welche wir an den in die einzelnen Versuchsgruppen gehörigen Tieren im Gebiet der Eminentia mediana und im Hinterlappen beobachten konnten. Diese neurohämalen Organe weisen im Falle des Wasserfrosches auch eine sehr starke Temperaturabhängigkeit auf, insofern sie an den Tieren der je zwei in Wärme bzw. Kälte gehaltenen Gruppen, unabhängig von den Lichtverhältnissen, den gleichen Neurosekretgehalt und eine identische Verteilung zeigen. Die hohe Temperatur birgt als Folge der gesteigerten Wasserabgabe, die Gefahr des Austrocknens in sich, zu deren Beseitigung sich der Organismus der Frösche mit erhöhter Vasopressin-Mobilisierung adaptiert. Deshalb sehen wir das Neurosekret um die Gefässe herum aufgespeichert, während es im Hinterlappen der in Kälte gehaltenen Tiere gleichmässig verteilt ist. Diese zwei, voneinander abweichenden, verschiedenen Verteilungen des Neurosekrets im Hinterlappen haben auch Dierickx u. Mitarb. (9) an dem Grasfrosch als ein für das Sommer- und Winter Stadium charakteristisches Bild geschildert.

Das, durch die in der äusseren Zone der Eminentia mediana endenden Fasern beförderte Neurosekret übt seine Wirkung auf humoralem Wege auf den Vorderlappen aus, deshalb könnte im wesentlichen die äussere Zone nur in Zu-

sammenhang mit jenen Änderungen behandelt werden, welche im Vorderlappen der untersuchten Tiere durch die Einwirkung der Temperatur- und Lichtverhältnisse eingetreten sind. Auf diese Beziehungen gehen wir jetzt nicht ein, wir bemerken nur, dass die auf Einwirkung der Kälte auftretende Aufstapelung des Neurosekrets in der äusseren Zone eine interessante Übereinstimmung mit der Feststellung von *D i e r i c k x u.* Mitarb. (9) zeigt, dass nämlich bei dem Grasfrosch dieselbe Zone in den Monaten Januar und Februar die grösste Menge von Neurosekret enthält. Dieses Phänomen bringen die oben genannten Autoren mit dem Aufwachen aus der Winterruhe in Zusammenhang.

Schliesslich müssen wir uns mit jener Feststellung befassen, dass die Tiere der, dem gemeinsamen Einfluss von Wärme und Dauerdunkel ausgesetzten Gruppe nicht eindeutig reagierten. Dies lässt sich damit erklären, dass solange die experimentellen Umstände der anderen drei Gruppen zwischen bestimmten Grenzen die einzelnen Jahreszeiten nachahmen, treffen sich diese beiden Faktoren niemals unter natürlichen Lebensverhältnissen dieser Tiere. Auf Grund des morphologischen Bildes des Nucleus praeropticus kann man auf einen, der gesteigerten neurosekretorischen Aktivität folgenden funktionellen Erschöpfungszustand schliessen, damit steht auch der Umstand in Zusammenhang, dass der Hinterlappen dieser Tiere um die weiten Gefässe das am grössten verteilte Neurosekret und die meisten Herring-Körper enthält.

Zusammenfassung

An dem neurosekretorischen System männlicher Wasserfrösche wurde die kombinierte Wirkung von niedriger bzw. hoher Temperatur und Dauerlicht bzw. Dauerdunkel geprüft. Als Resultat der Versuche konnte festgestellt werden, dass Kälte die Neurosekretion hemmt, während Wärme, besonders mit gleichzeitiger Dauerlichtbehandlung sowohl die Bildung des Neurosekrets, als dessen Abfuhr in den Hinterlappen kräftig stimuliert.

Es konnte auch beobachtet werden, dass die neurohämalen Organe des Wasserfrosches eine starke Temperaturabhängigkeit aufweisen.

Die auf experimentellem Wege erhobenen Befunde wurden mit den von anderen Autoren ebenfalls an dem hypothalamisch-hypophysären System der Frösche festgestellten jahreszeitlichen rhythmischen Änderungen in Zusammenhang gebracht.

SCHRIFTTUM

1. *Bissonnette, H.* 1932: Modification of Mammalian sexual cycle reactions of Ferrets (*Putorius vulgaris*) of both to electric light added after dark in November and December. *Proc. Roy. Soc. London* **110**, 322.
2. *Bissonnette, H.* 1935: Modification of Mammalian sexual cycles. 3. Reversal of the cycle in male Ferrets (*Putorius vulgaris*) by increasing periods of exposure to light between October 2 and March 13. *J. Exper. Zool.* **71**, 341.
3. *Bissonnette, H.* 1935: Relations of hair cycles in ferrets to changes in the anterior hypophysis and to light cycle. *Anat. Rec.* **63**, 159.
4. *B ü n n i n g, E.* 1963: Die physiologische Uhr. Zeitmessung in Organismen mit ungefähr tagesperiodischen Schwingungen. Springer. Berlin-Göttingen-Heidelberg.

5. Dawson, A. B. 1952: Hypothalamo-hypophysial relationships in *Rana pipiens* demonstrated by Gomori's chromalum hematoxylin method. *Anat. Rec.* **112**. 443–444.
6. Dawson, A. B. 1957: Morphological evidence of a possible functional interrelationship between the median eminence and the pars distalis of the anuran hypophysis. *Anat. Rec.* **128**. 77–89.
7. Diepen, R. 1952: Vergleichend-anatomische Untersuchungen über das Hypophysen-Hypothalamus-System bei Amphibien und Reptilien. *Anat. Anz. (Erg.-Heft)* **99**. 79–89.
8. Dierickx, K. and A. van den Abeele. 1959: On the relation between the hypothalamus and the anterior pituitary in *Rana temporaria*. *Z. Zellforsch.* **51**. 78–87.
9. Dierickx, K., A. van den Abeele et M. Rysenaer, 1960: Phénomènes d'activité cyclique dans le système hypothalamo-hypophysaire de *Rana temporaria*. Données nouvelles. *Arch. d'Anat. Micr. Morph. Exp.* **49**. 73–88.
10. Dierickx, K. and N. van Meirvenne. 1961: Karyometric studies of the preoptic nucleus of *Rana temporaria*. *Gen. Comp. Endocr.* **1**. 51–58.
11. Hoffmann, K. 1957: Über den Einfluss der Temperatur auf die Tagesperiodik bei einem Poikilothermen. *Naturwiss.* **44**. 358.
12. Mödlinger, G. 1941: Der Einfluss von Lichtstrahlen verschiedener Wellenlänge und von Lichtmangel auf die Schilddrüse der Haustaube. *Z. Zellforsch.* **31**. 408–434.
13. Mödlinger-Odorfer, M. 1965: Die Wirkung von Dauerlicht und Dauerdunkel auf den 24 Stunden-Rhythmus des Nucleus supraopticus und Nucleus paraventricularis der weissen Maus. *Naturwiss.* **52**. 93.
14. Paulsen, K. 1956: Histologische Untersuchungen am Zwischenhirn-Hypophysensystem von Amphibien. *Acta neuroveg.* **13**. 171–178.
15. Rey, P. et M. A. Chambon. 1960: Influence de l'éclairement sur les manifestations histologiques de la sécrétion dans le complexe hypothalamo-neurohypophysaire et dans le lobe intermédiaire de l'hypophyse de *Rana viridis*, Linné. *Acta endocr. (Kbh.) Suppl.* **51**. 109.
16. Sollberger, A. 1965: Biological rhythm research. Elsevier. Amsterdam–London–New York.
17. Woitkewitsch, A. A., E. I. Zubkova i I. I. Grigorieva. 1960: Wlijanie temperaturi na neurosekreziyu w preoptitscheskom jadre l'jaguschki. *Dokl. Akad. Nauk. UdSSR* **130**. 940–943.