

DIE ERHALTUNG DER TUBULÄREN STRUKTUR DES ENDOPLASMATISCHEN RETIKULUMS IN DER NEBENNIERE VON VÖGELN UND SÄUGETIEREN

von

L. KONDICS

Lehrstuhl für Allgemeine Zoologie der Eötvös Loránd Universität, Budapest

Eingegangen: 14. Oktober 1972

Es ist verhältnismäßig seit langem bekannt, daß in der Nebenniere das mit der Steroidsynthese zusammenhängende Enzymsystem sich in den Mitochondrien und in dem ungranulierten endoplasmatischen Retikulum (ER) befindet. Während bezüglich der Struktur der Mitochondrien kein besonderes Problem aufgetaucht ist, besteht im Zusammenhang mit dem Aufbau des ungranulierten ER eine ziemlich große Unsicherheit. Aufgrund der uns zur Verfügung stehenden 80 literarischen Angaben erblickt die entscheidende Mehrheit der Verfasser im ungranulierten ER eine in der Nebenniere isolierte, aus leeren Vakuolen bestehende Struktur (z. B. De Robertis — Sabatini 1958, Giacomelli — Wiener — Spiro 1965, Kahri 1966, Kondics — Kjaerheim 1968, Nußdorfer 1968, — Sabatini — De Robertis 1961, Sato 1968). Christensen (1965) hat im Zusammenhang mit den steroidproduzierenden Zellen der Hoden nachgewiesen, daß das ungranulierte ER im Falle der Perfusionsfixierung ein aus verzweigenden Tubuli bestehendes Retikulum ist, die vesikuläre Struktur stellt demnach ein künstliches Produkt dar. Bezüglich der Nebenniere erhielten Friend und Gilula (1972) trotz der Perfusionsfixierung ein ausgesprochen vesikuläres, ungranuliertes ER, aber auch Kjaerheim (1968) und Rhodin (1972) konnten die tubuläre Struktur durch Perfusionsfixierung in keiner zufriedenstellender Weise bewahren. Gleichzeitig jedoch gelang es sieben Autoren (Berchtold 1970, Brenner 1966, Long — Jones 1967, Mäusle 1971, McNutt — Jones 1970, Shelton — Jones 1971, Yonetsu 1966) auch im Falle einer Immersionsfixierung den tubulären Aufbau des ungranulierten ER in zufriedenstellendem Maße zu sichern.

Aufgrund all dieser liegt es auf der Hand, daß in der Nebenniere die tatsächliche Struktur des ungranulierten ER tubulär ist, der Zerfall auf Vesikulae folgt aus der unrichtigen Fixierung, andererseits ist die Perfusionsfixierung in sich selbst noch nicht genügend ausreichend. Untersuchen

wir die von den erwähnten sieben Verfassern gebrauchten Fixierungsverfahren, so stellt es sich heraus, daß sie von den üblichen nicht abweichen. Da uns keine entsprechende, sichere Methode zur Verfügung steht, haben wir im Falle der Immersionsfixierung die Bedingungen der Bewahrung der tubulären Struktur in der Nebenniere der Vögel und der Säugetiere ausführlich untersucht.

Material und Methode

Es wurden 25 männliche und weibliche Tauben durch Dekapitation getötet, die Nebennieren innerhalb von 3 Minuten herausgenommen und in orientierter Weise zerstückelt, bei Zimmertemperatur in den folgenden Lösungen fixiert:

- a) 3%iges Glutaraldehyd, in 0,1 M-Phosphatpuffer, pH 7,4
- b) 4%iges Formaldehyd, aus Paraformaldehyd frisch gewonnen, in 0,1 M-Phosphatpuffer
- c) 3%iges Glutaraldehyd, in 0,1, 0,12, 0,14, 0,16, 0,18, 0,2 M-Phosphatpuffer
- d) 3%iges Glutaraldehyd, in 0,1 M-Phosphatpuffer, mit 1–8%iger Saccharose
- e) 6%iges Glutaraldehyd, in 0,1 M-Phosphatpuffer, mit 7%iger Saccharose
- f) 4%iges Formalin, aus Paraformaldehyd frisch präpariert in 0,1 M-Phosphatpuffer, mit 7%iger Saccharose
- g) Gemisch von je 2%igem Formalin und Glutaraldehyd, in 0,1 M-Puffer, mit 7%iger Saccharose.

Weitere 2 Tauben erhielten innerhalb von 48 Stunden 4×10 IU ACTH, 2 Goldhamster innerhalb von 24 Stunden 2×5 IU ACTH. Die Nebennieren der behandelten Tiere sowie die von 2 unbehandelten Goldhamstern und Ratten wurden in 3%igem Glutaraldehyd fixiert, das 0,1 M-Phosphatpuffer und 7% Zucker enthielt.

Zu bemerken sei, daß zu einem jeden Experiment ein durch Destillation gereinigtes Glutaraldehyd verwendet worden ist. Sämtliche Stoffe wurden nach der Fixierung 24 Stunden lang mit 0,1 M-Phosphatpuffer bei einer Temperatur von 4 °C gewaschen, die Spülflüssigkeit enthielt auch Saccharose in einer bei der Fixierung gebrauchten Konzentration. Die Nachfixierung erfolgte zwei Stunden lang bei Zimmertemperatur in 1%igem OsO_4 , außer dem Phosphatpuffer enthielt das Fixierungsmittel auch hier die bei der Aldehydfixierung gebräuchliche Zuckerkonzentration. Unter dem im bisherigen bekanntgegebenen Verfahren bildete nur jenes Experiment eine Ausnahme, wo die Wirkung der Konzentration des Puffers untersucht wurde (c); die Spülflüssigkeit und das OsO_4 enthielt hier natürlicherweise die bei der Aldehydfixierung gebräuchliche Pufferkonzentration.

Die Entwässerung und Einbettung (Durcupan ACM, Fluka) erfolgte in üblicher Weise. Die Schnitte wurden mit einem eigenhändig gefertigten

Ultramikrotom gemacht und nach Kontrastierung mit Bleizitrat-Uranylazetat mit einem in der Sowjetunion hergestellten Elektronenmikroskop vom Typ UEMV-100-b untersucht.

Ergebnisse

Wenn wir die Nebenniere der Taube in 3%igem Glutaraldehyd fixieren, den pH-Wert mit 0,1 M-Phosphatpuffer einstellen, so können wir das Ergebnis auf Abb. 1 sehen. Für die steroidproduzierenden Zellen sind die Mitochondrien tubulärer Struktur, ferner das reichliche ungranulierte ER und die Lipidtropfen charakteristisch. Das ungranulierte ER zerfällt mit dieser Methode – ähnlich wie bei der Mehrheit der Verfasser – auf einzelstehende, leere Vesikel. Dasselbe erhalten wir auch dann, wenn wir statt Glutaraldehyd Formalin verwenden (Abb. 2). Als nächsten Schritt des Experiments versuchten wir die Konzentration des Puffers zu steigern. Von 0,16 M konnte eine starke Schrumpfung der Mitochondrien beobachtet werden, jedoch blieb das ungranulierte ER unverändert von vesikulärer Struktur. (Abb. 3)

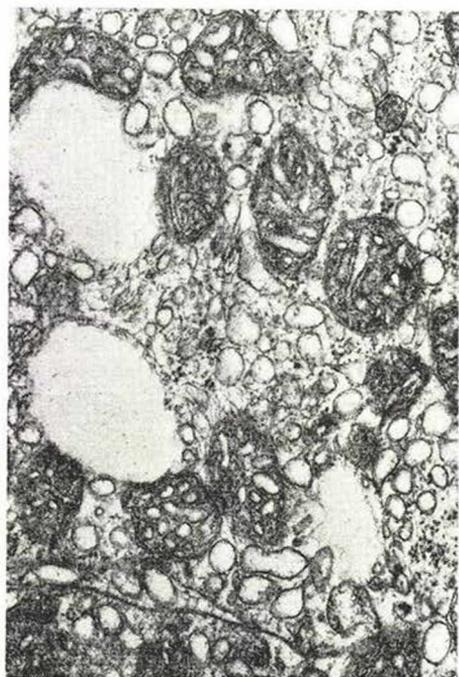


Abb. 1. Nebenniere einer Taube, interrenale (steroidproduzierende) Zelle. Fixierung: 3%iges Glutaraldehyd in 0,1 M-Phosphatpuffer. 16 000x

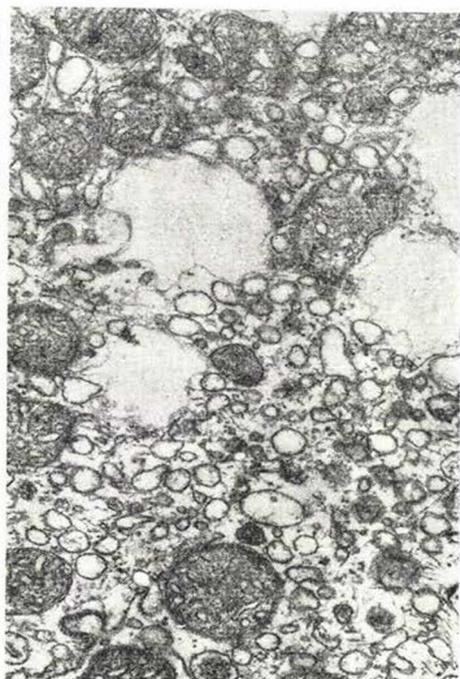


Abb. 2. Nebenniere einer Taube, interrenale Zelle. Fixierung: 4%iges Formaldehyd in 0,1 M-Phosphatpuffer. 16 000x



Abb. 3. Nebenniere einer Taube, interrenale Zelle. Fixierung: 3%iges Glutaraldehyd in 0,2 M-Phosphatpuffer 16 000x



Abb. 4. Nebenniere einer Taube, interrenale Zellen. Fixierung: 3%iges Glutaraldehyd in 0,1 M-Phosphatpuffer + 7%ige Saccharose. 3000x

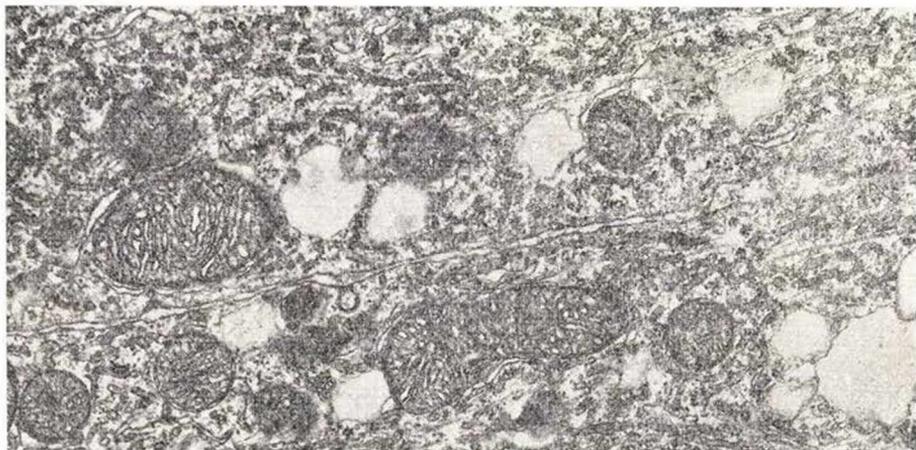


Abb. 5. Nebenniere einer Taube, interrenale Zelle. Fixierung wie bei Abb. 4. 14 000x

Die Erhöhung der Konzentration des Puffers ist demnach kein gangbarer Weg. Gerade deshalb blieben wir im weiteren bei einer Konzentration 0,1 M und stellten Versuche mit Hinzugabe von Zucker, ganz bis 8% an. Bei Anwendung von Zucker haben sich die sog. „dunklen und hellen“ Zellen viel mehr abgesondert. (Abb. 4) Im Falle des Gebrauches von 5–7%iger Saccharose zeigte sich das ungranulierte ER in den hellen Zellen als von tubulärer Struktur. (Abb. 5) Eine niedrigere Zuckerkonzentration ist wirkungslos, im Falle einer höheren schrumpfen die Mitochondrien stark ein. In ähnlicher Weise fixiert kann die tubuläre Struktur des ungranulierten ER nicht nur in der Nebenniere der Taube, sondern auch in der der Ratte (Abb. 6) und des Hamsters (Abb. 7) in den „hellen“ Zellen

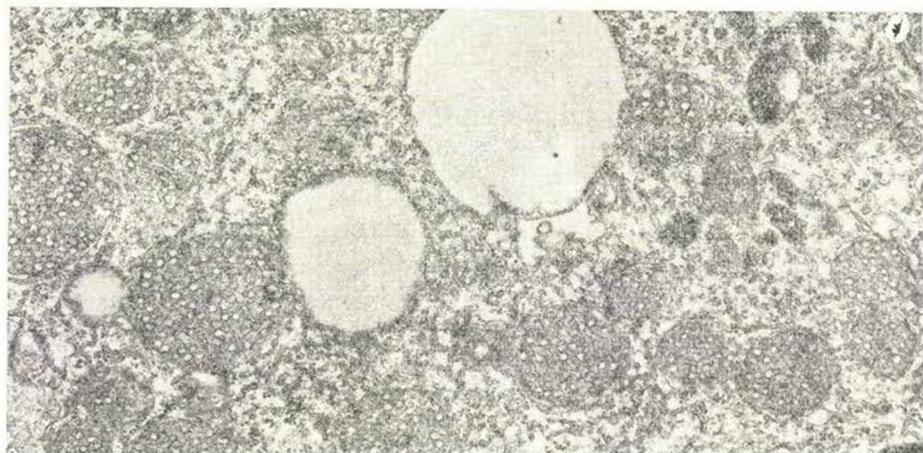


Abb. 6. Nebenniere einer Ratte, zona fasciculata. Fixierung wie bei Abb. 4. 12 000x



Abb. 7. Nebenniere eines Goldhamsters, zona fasciculata. Fixierung wie bei Abb. 4. 13 000x

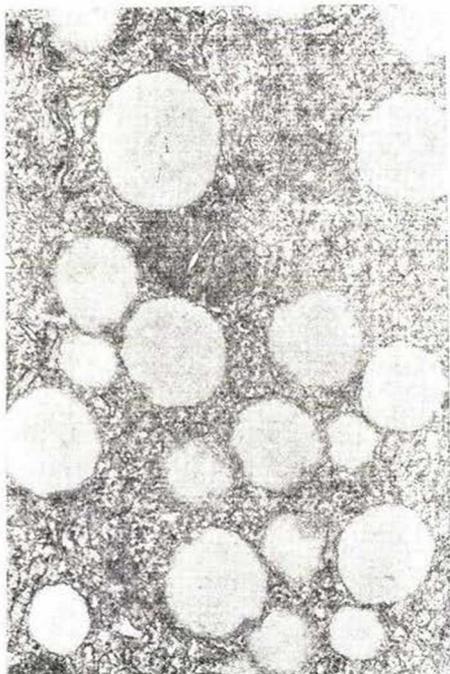


Abb. 8. Nebenniere einer Taube, sog. „dunkle“ Zelle. Fixierung wie bei Abb. 4. 16 000x



Abb. 9. Nebenniere einer Taube nach der Behandlung mit ACTH. Fixierung wie auf Abb. 4. 19 000x

gut erhalten blieben. Zugleich ist in den „dunklen“ Zellen bei einem jeden Versuchstier auch eine partielle Vesikulation wahrzunehmen. (Abb. 8)

Stimulieren wir die Nebenniere der Taube mit ACTH, so bleibt die übliche Dilatation des ungranulierten ER bei Anwendung von Zucker weg. (Abb. 9) Die sog. „dens bodies“, die nach ACTH in großer Anzahl in der Nebenniere gefunden werden können, schnüren sich in gut sichtbarer Weise nicht nur aus dem Golgi-Apparat, sondern auch aus dem um ihn gelegenen ungranulierten ER bzw. von ihm entfernten, aus dem ungranulierten ER ab. (Abb. 10, 11) Dies konnte man hingegen bisher wegen der Vesikulation des ungranulierten ER nicht nachweisen.

Da es sich erwiesen hat, daß das mit 3%iger Destillation gereinigte Glutaraldehyd mit einem Puffer von 0,1 M im Falle der Zugabe von 5–7%igem Zucker die tubuläre Struktur des ungranulierten ER zum guten Teil intakt erhält, haben wir versucht die Konzentration des Glutaraldehyds zu steigern. Bei Anwendung von 6%igem Glutaraldehyd hat sich das ungranulierte ER in den „hellen“ Zellen stellenweise dilatiert, weshalb wir im weiteren die 3%ige Konzentration beibehalten haben. Formalin oder Glutaraldehyd-Formalinalgemisch bewahren trotz Anwesenheit

von 7%igem Zucker die tubuläre Struktur in der Nebenniere nicht. Das ungranulierte ER zerfiel in beiden Fällen in einer auf Abb. 1 sichtbaren Weise auf Vesikel.

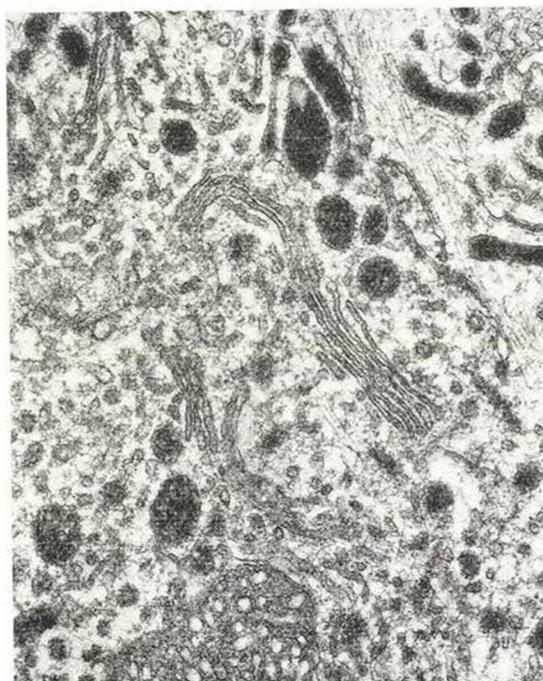


Abb. 10. Nebenniere eines Goldhamsters nach der Behandlung mit ACTH. In der Region des Golgi-Apparates zahlreiche „dens bodies“. 17 000x



Abb. 11. Nebenniere eines Goldhamsters, zona fasciculata, nach einer Behandlung mit ACTH. Neben der Zellmembran zwei „dens bodies“, das eine steht mit dem ER im Zusammenhang. 35 000x

Besprechung der Ergebnisse

Es ist bekannt, daß in der lebensstreuen Erhaltung der Ultrastruktur auch der osmotischen Konzentration des Fixierungsmittels eine Rolle zukommt. Gerade deshalb geben einige Forscher zwecks Sicherung der Isotonie zur Fixierungsflüssigkeit auch Zucker bzw. NaCl hinzu und halten dies vom Gesichtspunkt der guten Erhaltung der Struktur für notwendig (Caulfield 1957). Pallade (1952) fand hingegen, falls er zu dem ursprünglich hypertonen Fixierungsgemisch NaCl oder Zucker hinzugab, in der Struktur, keine Änderung. Millonig (1962) konnte im Falle der Osmiumfixierung ebenfalls nicht entscheiden, ob die Glukose die Qualität der Fixierung verbessert oder nicht. Eben deshalb ist es verständlich, daß die Forscher heutzutage im allgemeinen den Gebrauch von NaCl oder von Zucker vermeiden.

In der Nebenniere hält man das ungranulierte ER von wenigen Ausnahmen abgesehen für eine vesikuläre Struktur. Dies ist jedoch mit unserer über das ungranulierte ER im allgemeinen ausgebildeten Vorstellungen nicht übereinstimmbar. Das ungranulierte ER muß auch im Falle der Nebenniere ein sich verzweigendes, zusammenhängendes Kanalsystem sein. Das aus abgesonderten Vesikeln bestehende System kann nicht die Funktion des ungranulierten ER versehen, was jene Autoren unterstützen, die in der Nebenniere ein ER tubulärer Struktur nachgewiesen haben. Dies haben wir auf Grund der mitgeteilten Bilder entschieden, denn manchmal spricht man auch dann von einem tubulären ungranulierten ER, wenn auf den Bildern die Struktur des Retikulums vesikulär ist (Yoshimura und Mitarb. 1969).

Als ersten Schritt des Versuches haben wir, um eine Isotonie zu erreichen, die Konzentration des Puffers allmählich gesteigert. Von der 0,16 M-Konzentration angefangen, konnte eine stets zunehmende Schrumpfung und parallel mit dieser eine Myelinisation beobachtet werden, ohne daß im Aufbau des ungranulierten ER eine Verbesserung zu bemerken gewesen wäre. Demfolgend stellten wir Versuche mit Zucker an und bei der Anwendung von 5–7%iger Saccharose und Glutaraldehyd blieb zu unserer Überraschung die ursprüngliche, tubuläre Struktur des ungranulierten ER gut erhalten (Abb. 5, 6, 7). Dies bezieht sich vor allem auf die „hellen“ Zellen, in den „dunklen“ Zellen sind nebst den Tubuli stellenweise auch Vesikel zu finden (Abb. 8).

Manche sind der Meinung, daß die „dunklen“ und „hellen“ Zellen keinen verschiedentlichen Funktionszustand bedeuten, sondern als künstliche Produkte der Fixierung entstehen (Kjaerheim 1968, Rhodin 1971). Nußdorfer (1969) hat auf dem Wege autoradiographischer Untersuchungen nachgewiesen, daß in der Rindensubstanz der Nebenniere der Ratte die „dunklen“ Zellen das mit Tritium (H^3) markierte Cholesterin langsamer aufnehmen und es auch langsamer abgeben, als die „hellen“ Zellen. Deshalb sind laut ihm die hellen Zellen aktive, die dunklen hingegen inaktive Zellen. Er hat auch darauf hingewiesen, daß die zweierlei Zellen im Aufbau voneinander etwas abweichen.

Deshalb ist es offenkundig, daß sich die Zellen in der Nebenniere in verschiedenem Funktionszustand befinden können, was zum Teil auch in der Densität der Zellen Ausdruck erhalten kann. Um diese Frage in beruhigender Weise regeln zu können, sind jedenfalls noch weitere Daten nötig.

Glutaraldehyd und Saccharose von entsprechender Konzentration bewahren demnach die tubuläre Struktur des ungranulierten ER. Dies war mit der Erhöhung der Konzentration des Puffers nicht erreichbar, deshalb muß vorausgesetzt werden, daß es sich hier nicht allein um die Sicherung der Isotonie handelt, sondern, daß die Saccharose das leicht zerfallende ungranulierte ER wahrscheinlich stabilisiert. Jedoch genügt Zucker für sich allein nicht, bei Anwendung von Formalin oder formalinhaltigen Fixierungsmitteln tritt trotz der Anwesenheit des Zuckers eine starke Vesikulation auf.

Der Durchmesser der Tubuli des ungranulierten ER beträgt etwa 600–800 Å, sie sind mit osmiophilem Stoff gefüllt. Dies letztere ist chemisch nicht bekannt, *Friend* und *Gilula* (1972) sind der Meinung, daß es Cholesterin oder ein anderer Präkursor, eventuell auch Steroid sein kann.

Mehrere Autoren haben nachgewiesen, daß in der stimulierten Nebenniere das ungranulierte ER dilatiert (*Asworth* und Mitarb. 1959, *Nishikawa* und Mitarb. 1963, *Sharawy* und *Penney* 1969, *Volk* und *Scarpelli* 1964, *Yamori* und Mitarb.). Um dies nachzuprüfen, wurde bei Tauben die Nebenniere mit einer großen Dosis ACTH stimuliert. Wir haben keinerlei Dilatationen wahrgenommen, stellenweise hafteten sich jedoch Ribosomen an die Oberfläche des ER. Bekannterweise kann in der Nebenniere bei der Stimulation die Anzahl der „dens bodies“ beträchtlich zunehmen. Diese sind – zumindest teilweise – Lysosomen (*Szabó* und Mitarb. 1967). Von einem Teil der „dens bodies“ wurde neuerdings nachgewiesen, daß sie Katalase enthaltende Peroxisomen sind (*Magalhães* – *Magalhães* 1971). Aus Abb. 10 ist es ersichtlich, daß sich ein Teil der „dens bodies“ im Golgi-Feld entwickelt, jedoch schnüren sie sich wahrscheinlich zum Teil aus dem ungranulierten ER ab. Für letzteres spricht auch, daß fern von dem Golgi-Apparat, neben der Zellmembran, z. B. zwischen den „dens bodies“ und dem ungranulierten ER oft eine direkte Verbindung nachgewiesen werden kann (Abb. 11). Darauf hat man wegen des Zerfalles des ungranulierten ER bisher nicht geachtet. Jedenfalls muß die Genese der Peroxisomen in der Nebenniere näher untersucht werden.

Zusammenfassung

3%iges Glutaraldehyd, das auch 5–7%ige Saccharose enthält, bewahrt in der Nebenniere der Vögel und der Säugetiere die tubuläre Struktur des ungranulierten ER gut. Bei Anwendung von Zucker besteht das ungranulierte ER aus Tubuli mit einem Durchmesser von 600–800 Å, mit osmiophilem Stoff im Inneren. Formalin oder Glutaraldehyd-Form-

aldehydgemisch ist selbst bei Anwendung von Saccharose zur Fixierung des ungranulierten ER nicht geeignet. Falls man die Fixierung mit Zucker enthaltendem Glutaraldehyd verrichtet, entfällt auf die Wirkung des ACTH die übliche Dilatation des ungranulierten ER, andererseits schnüren sich die sog. „dens bodies“ zumindest teilweise aus dem ungranulierten ER ab.

SCHRIFTTUM

- Asworth, C. T. — Race, G. J. — Mollenhauer, H. H. 1959. Study of functional activity of adrenocortical cells with electron microscopy. *Amer. J. Path.* **35**: 425—437.
- Berechtold, J. P. 1970. Contribution à l'étude ultrastructurale des cellules interrenales de *Salamandra salamandra* L. (Amphibien Urodele). II. Action de l'ACTH endogène. *Z. Zellforsch.* **110**: 517—539.
- Brenner, R. M. 1966. Fine structure of adrenocortical cells in adult male rhesus monkeys. *Am. J. Anat.* **129**: 429—454.
- Caulfield, J. B. 1957. Effects of varying the vehicle of OsO_4 in tissue fixation. *J. biophys. biochem. Cytol.* **3**: 827—830.
- Christensen, A. K. 1965. The fine structure of testicular interstitial cells in guinea pig. *J. Cell. Biol.* **26**: 911—935.
- DeRobertis, E. — Sabatini, D. 1958. Mitochondrial changes in the adrenocortex of normal hamsters. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**: 667—668.
- Friend, D. — Gilula, N. B. 1972. A distinctive cell contact in the rat adrenal cortex. *J. Cell. Biol.* **53**: 148—163.
- Giacomelli, F. — Wiener, J. — Spiro, D. 1965. Cytological alterations related to stimulation of the zona glomerulosa of the adrenal gland. *J. Cell Biol.* **26**: 499—521.
- Kahri, A. 1966. Histochemical and electron microscopic studies on the cells of the rat adrenal cortex in tissue culture. *Acta Endocrinol. (Kbh). Suppl.* **108**: 1—96.
- Kjaerheim, Å. 1968. Studies of adrenocortical ultrastructure. 2. The interrenal cell of the domestic fowl as seen after glutaraldehyd perfusion fixation. *Z. Zellforsch.* **91**: 429—455.
- Kondics, L. — Kjaerheim, Å. 1966. The zonation of interrenal cells in fowls (An electron microscopical study). *Z. Zellforsch.* **70**: 81—90.
- Long, J. A. — Jones, A. L. 1967. The fine structure of the zona glomerulosa and the zona fasciculata of the adrenal cortex of opossum. *Amer. J. Anat.* **120**: 463—487.
- Magalhães, M. M. — Magalhães, M. C. 1971. Microbodies (peroxisomes) in rat adrenal cortex. *J. Ultrastruc. Res.* **37**: 563—573.
- Mäusle, E. 1971. Geschlechtsunterschiede in der Ultrastruktur der Nebennierenrinde der Ratte. *Z. Zellforsch.* **116**: 136—150.
- McNutt, N. S. — Jones, A. L. 1970. Observations on the ultrastructure of cyto-differentiation in the human fetal adrenal cortex. *Lab. Invest.* **22**: 513—527.
- Milloning, G. 1962. Further observations on a phosphate buffer osmium solution in fixation. *V. Internat. Congr. EM. Philadelphia*. Vol. **11**: 8.
- Nishikawa, M. — Murone, I. — Sato, T. 1963. Electron microscopic investigations of the rat adrenal cortex. *Endocrinology* **72**: 197—209.
- Nussdorfer, G. G. 1968. L'ultrastructure de la zone réticulaire de la corticosurrénale du rat pendant la grossesse. Fourth European Regional Conference on Electron Microscopy. *Roma 1968*. Vol. II: 373—374.
- Nussdorfer, G. G. — Mazocchi, G. 1969. Autoradiographic study of the incorporation of tritiated cholesterol into the zona reticularis of the rat adrenal cortex. *Z. Zellforsch.* **102**: 205—213.
- Pallade, G. E. 1952. The fine structure of mitochondria. *Anat. Rec.* **114**: 422.
- Rhodin, A. G. 1971. The ultrastructure of the adrenal cortex of the rat under normal and experimental conditions. *J. Ultrastruct. Res.* **34**: 23—71.
- Sabatini, D. D. — DeRobertis, E. 1961. Ultrastructural zonation of adrenocortex in the rat. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**: 105—119.

- Sato, T. 1968. The fine structure of the mouse adrenal X-zone. *Z. Zellforsch.* **87**: 315-329.
- Sharawy, M. - Penney, D. P. 1969. Alterations of the fine structure of the rat adrenal cortex after administration of metopirone. *Anat. Rec.* **163**: 325.
- Shelton, J. H. - Jones, A. L. 1971. The fine structure of the mouse adrenal cortex and the ultrastructural changes in the zona glomerulosa with low and high sodium diets. *Anat. Rec.* **170**: 147-182.
- Szabó, D. - Stark, E. - Varga, B. 1967. The localisation of acid phosphatase activity changes in lysosomes in the adrenal zona fasciculata of intact and hypophysectomized rats following ACTH administration. *Histochemie* **10**: 321-328.
- Volk, T. L. - Scarpelli, D. G. 1964. Alterations of fine structure of the rat adrenal cortex after administration of tripanol. *Lab. Invest.* **13**: 1205-1214.
- Yamori, T. - Matsuura, S. - Sakamoto, S. 1961. An electron microscopic study of the normal and stimulated adrenal cortex in the rat. *Z. Zellforsch.* **55**: 179-199.
- Yonetsu, T. 1966. Electron microscopy of the adrenal cortex of normal and unilaterally adrenalectomized syrian hamsters. *Endocrinol. Japon.* **13**: 269-290.
- Yoshimura, F. - Mahrumiya, K. - Watanabe, M. - Omoto, T. - Sekiguchi, T. 1969. Functional significance of the tubular agranular endoplasmic reticulum in the adrenocortical cells of albino rat. *Endocrinol. Japon.* **15**: 145-169.