

Über den Einfluß der Milzexstirpation auf die Nucleolenzahl von Deciduazellen*

Ein weiterer Hinweis auf die polyploidisierende Wirkung der Milz

Von R. RIGLER und W. ROSENKRANZ

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Graz (Vorstand Prof. Dr. R. RIGLER)

(Z. Naturforschg. 13 b, 543—545 [1958]; eingegangen am 20. März 1958)

Die Zählung der in den Decidualzellkernen normaler und milzloser Ratten vorhandenen Nucleolen hat einen signifikanten Unterschied zu erkennen gegeben. Er wird im Sinne eines Ploidieunterschiedes gewertet und daraus in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen auf einen polyploidisierenden Einfluß der Milz geschlossen.

Seit in erster Linie durch die variationsstatistischen Kerngrößen-Bestimmungen von JACOB¹ auf die Möglichkeit hingewiesen wurde, daß nicht sämtliche Zellen eines Organs oder Gewebes diploid sind, d. h. einen doppelten Chromosomensatz besitzen, sondern in einem gewissen Verhältnis daneben auch tetraploide oder octoploide, mit einem Wort also polyploide Zellen vorkommen können, erhob sich zugleich die Frage nach der Ursache dieser Erscheinung und nach ihrem biologischen Sinn. Auf beides läßt sich bis heute noch keine abschließende Antwort geben. Im folgenden soll versucht werden, das Zustandekommen der Polyploidie an einer bestimmten Gewebsart, und zwar am Deciduom der Ratte, dem Verständnis näher zu bringen.

Ob eine Zelle haploid, diploid oder polyploid ist, läßt sich unmittelbar aus der Zahl der vorhandenen Chromosomen erschließen. Sie beträgt nach SACHS² bei der Albinoratte (*Rattus norvegicus*) $2n = 42$. Die Zählung der Chromosomen bereitet bei bestehender Polyploidie nicht unerhebliche Schwierigkeiten. Selbst D'ANCONA³, der solche Zählungen durchführte, mußte sich bei Ermittlung des Polyploidiegrades im wesentlichen doch mit der Bestimmung des Durchmessers des Muttersterns, also einem indirekten Verfahren, begnügen. Außerdem verlieren, wie WHITE⁴ zusammenfassend berichtet, endopolyploidisierte Zellen im allgemeinen die Fähigkeit, sich mitotisch zu teilen,

womit aber die Schwierigkeit der Chromosomen-Zählung zunimmt.

In einer vorausgehenden Arbeit konnten wir zeigen⁵, daß die Kerngröße von Deciduazellen des antimesometrialen Schleimhautanteiles eines bei der Ratte artefiziell hervorgerufenen Deciduoms von der Abgabe eines Stoffes seitens der Milz abhängt. Die Entfernung der Milz führt zu einer Verkleinerung des Kernvolumens auf etwa die Hälfte. Da unter diesen Umständen die Zahl der Kerne in der Raumeinheit auf das Doppelte zunimmt, lag es nahe, einen polyploidisierenden Einfluß der Milz bzw. des von ihr gebildeten Inkrets anzunehmen.

Nun besteht nach McCLINTOCK⁶, FANKHAUSER und HUMPHREY⁷, HUSKINS⁸, SMITH⁹ u. a. in der numerischen Erfassung der vorhandenen Nucleolen bzw. heterochromatischen Kernkörperchen eine weitere Möglichkeit, den Grad der Ploidie zu bestimmen. Es ist nicht möglich, hier auf die Bedeutung der Nucleolen im Zellkern einzugehen, ob sie nur Depotfunktion besitzen oder Kernorganellen darstellen, ob ferner ein Chromosomensatz nur einen oder mehrere Nucleolenorganisatoren besitzt. Zu diesen Fragen sind in letzter Zeit mehrere umfassende Abhandlungen erschienen, von denen die von C. und O. VOGT (1947)¹⁰, STOCKINGER (1953)¹¹, ALTMANN (1955)¹² und HERTL (1957)¹³ genannt seien. Neueste elektronenmikroskopische Untersuchungen des Nucleolus einer Zelle der Körnerschicht des Kleinhirns durch

* Herrn Prof. Dr. A. MUSGER zum 60. Geburtstag gewidmet.

¹ W. JACOB, Arch. Entw. Gesch. 106, 124 [1925]; Z. mikr. anat. Forsch. 38, 161 [1935].

² L. SACHS, Stain Techn. 28, 169 [1953].

³ U. D'ANCONA, Arch. ital. Anat. 47, 253 [1942].

⁴ M. J. D. WHITE, Animal Cytology a. Evolution, University Press, Cambridge 1954.

⁵ W. ROSENKRANZ u. R. RIGLER, Z. ges. exp. Med. 129, 627 [1958].

⁶ B. McCLINTOCK, Z. Zellforsch. mikroskop. Anat. 21, 294 [1934].

⁷ G. FANKHAUSER u. R. R. HUMPHREY, Proc. nat. Acad. Sci. USA. 29, 344 [1943].

⁸ C. L. HUSKINS, Nature [London] 161, 80 [1948].

⁹ S. SMITH, Nature [London] 181, 290 [1958].

¹⁰ C. VOGT u. O. VOGT, Ärtzl. Forsch. 1, 8 u. 43 [1947].

¹¹ L. STOCKINGER, Protoplasma 42, 365 [1953].

¹² H. W. ALTMANN, Klin. Wschr. 1955, 306.

¹³ M. HERTL, Z. Zellforsch. mikroskop. Anat. 46, 18 [1957].

HORSTMANN und KNOOP¹⁴ zeigen einen Aufbau aus plumpen Fäden, die aus Ansammlungen von runden bis ovalen Granula bestehen. Jedenfalls ist der Nucleolus nicht homogen. Es kann auch hier nicht das Phänomen der Nucleolenextrusion oder einer möglichen Nucleolenfusion erörtert werden. BIESELE, POYNER und PAINTER¹⁵ haben jedenfalls gezeigt, daß die in drei Größenklassen mit den Volumverhältnissen 1:2:4 fallenden Kerne der Mausleber ein Maximum von 4 bzw. 8 oder 16 Nucleolen enthalten. Der jeweils beobachtete Nucleolen-Maximalwert entspricht somit dem Grad der Ploidie.

Zur Ergänzung unserer Untersuchungen über den polyploidisierenden Einfluß der Milz haben wir als weiteren Beweis daher die Nucleolenzahl der Deciduazellkerne herangezogen. Da sich der Begriff „Nucleolus“

Die verwendeten Versuchstiere waren wie in den vorangehenden Mitteilungen weibliche Ratten mit einem Durchschnittsgewicht von 200 g. Nach Herbeiführung der Pseudogravidität wurde die deciduale Reaktion in bekannter Weise ausgelöst und gleichzeitig die Milz oder ein anderes Organ (z. B. eine Niere) entfernt. Die Fixierung des Uterus erfolgte in neutralem Formalin. An den 10 μ dicken Schnitten wurden die Nucleolen oder richtiger ihre „Chromatinschalen“, soweit vorhanden, mittels der Feulgen-Reaktion unter Verwendung von standardisiertem acridinfreiem Pararosanilin (Bayer) nach der Modifikation von GRAUMANN¹⁶ dargestellt, wobei mit einer 0,1-proz. Lösung von Fast Green FCF (Bayer) in n/10-HCl gegengefärbt wurde. Die Schale, d. h. das umgebende Chromatin erscheint dabei rot, während der eigentliche Nucleolus eine tiefgrüne Farbe aufweist. Die nebenstehende Schwarz-Weiß-Aufnahme wurde mit Gelbfilter angefertigt.

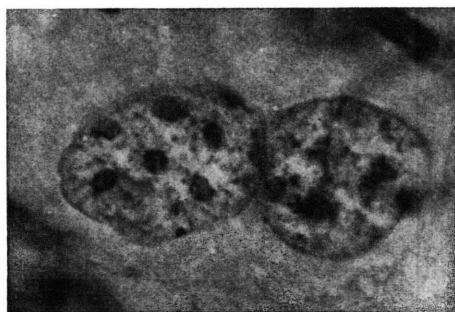


Abb. 1 a.



Abb. 1 b.

Abb. 1 a. Deciduazellkerne einer normalen Ratte mit 6 bis 7 Nucleolen je Kern, b) einer vor 5 Tagen splenektomierten Ratte mit 1–2 Nucleolen je Kern. Gleicher Abbildungsmaßstab 1:1500 (Zeiss Neofluar Ölimm. 100-fach, KPl 12,5-fach; mikroskop. Techn. Feulgen-Fastgreen; Gelbfilter).

zur Zeit noch nicht hinreichend genau definieren läßt, sondern je nach Autor Verschiedenes bedeuten kann, sei vorerst durch Angabe der Methodik klar gemacht, was gemessen bzw. gezählt wurde.

¹⁴ E. HORSTMANN u. A. KNOOP, Z. Zellforsch. mikroskop. Anatom. 46, 100 [1957].

¹⁵ J. J. BIESELE, H. POYNER u. T. S. PAINTER, Univ. Texas Publ. 1942. Nr. 4243.

¹⁶ W. GRAUMANN, Z. wiss. Mikroskop. 61, 225 [1953].

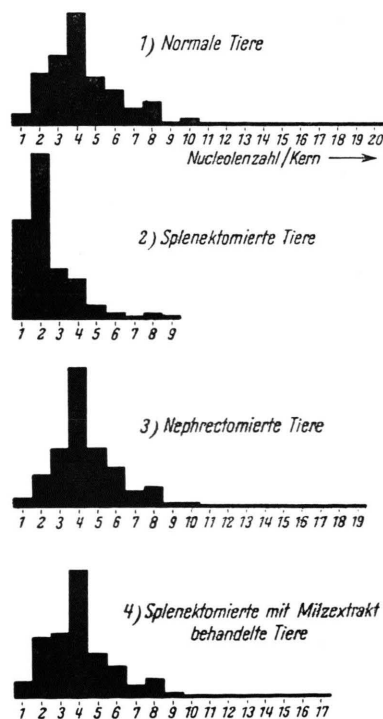


Abb. 2. Nucleolenhistogramme aus je 3000 untersuchten Deciduazellkernen.

Im antimesometrial gelegenen Anteil des Endometriums wurden bei einer 1250-fachen Vergrößerung in 1000 Deciduazellen eines Tieres die je Kern vorhandenen Nucleolen gezählt und daraus der Mittelwert (s. Tab. 1) gebildet. Folgende Gruppen zu je 3 Tieren wurden untersucht: 1. Normale Gruppe, 2. Splenektomierte Gruppe, 3. Nephrektomierte Gruppe, 4. Splenektomierte mit Milzextrakt behandelte Gruppe. Angesichts der trotz Anwendung einer verhältnismäßig selektiven Färbemethode nicht restlos zu beseitigenden Unsicherheit in der Beurteilung eines Kernpartikels als

Nucleolus zeigt das Nucleolenhistogramm der normalen Tiere (s. Abb. 2) eine bemerkenswerte Übereinstimmung mit den Jacobyschen Regelklassen, insofern

	Versuchsgruppe	A. Mittelwerte der in 1000 Decidua-zellkernen eines Versuchstieres gezählten Nucleolen	B. Mittelwert einschließlich Streuung der unter A angegebenen Werte
1.	Normale Tiere	4,431 4,247 4,404	4,360 ± 0,1
2.	Milzexstirpierte Tiere	2,315 2,290 2,325	2,310 ± 0,02
3.	Nephrektomierte Tiere	4,062 4,575 4,668	4,435 ± 0,32
4.	Milzexstirpierte, mit Milzextrakt beh. Tiere	3,982 4,073 4,098	4,051 ± 0,06

Tab. 1. Statistik der im Gefolge verschiedener Eingriffe auftretenden Nucleolenzahl-Änderungen.

Häufigkeitsmaxima bei 4 und 8 Nucleolen pro Zellkern festzustellen sind. Sie im Sinne einer bestehenden Polyploidie zu interpretieren liegt um so näher, als das Nucleolenhistogramm der splenektomierten Tiere (s. Abb. 2) ein Frequenzmaximum bei 2 aufweist. Die

Nucleolenhistogramme der nephrektomierten sowie der mit Milzextrakt behandelten splenektomierten Tiere — über Art und Herstellung der Milzextrakte wurde in einer vorausgehenden Mitteilung¹⁷ ausführlich berichtet — zeigen weitgehende Ähnlichkeit untereinander und unterscheiden sich grundsätzlich von dem der milzlosen Tiere. Damit erscheint der polyploidisierende Einfluß der Milz auch von dieser Betrachtung her gesichert.

Nebenstehend geben wir das statistische Material wieder (Tab. 1), auf welches sich obige Angaben stützen.

Signifikanzprüfung: $t^* = 8,61$ bei $P = 0,001$ (bei 4 Freiheitsgraden)

Versuchsgruppe 1 : 2 $t = 35,75$
1 : 3 $t = 0,36$
1 : 4 $t = 4,71$
4 : 2 $t = 47,20$

$$t = \frac{\bar{x}' - \bar{x}''}{s} \sqrt{\frac{N_1 N_2}{N_1 + N_2}}$$

$$s^2 = \frac{1}{N_1 + N_2 - 2} \left[\sum_{i=1}^{N_1} (x_i' - \bar{x}')^2 + \sum_{i=1}^{N_2} (x_i'' - \bar{x}'')^2 \right] \quad (\text{LINDER})^{18}.$$

¹⁷ R. RIGLER u. W. ROSENKRANZ, Z. Naturforschg. **13b**, 291 [1958].

¹⁸ A. LINDER, Statistische Methoden, Birkhäuser Basel 1957.

Beobachtungen an den Fettkörper-Einschlüssen der Larven von *Chironomus thummi* und *Chir. anthracinus* bei erhöhter Temperatur (26 und 28° C)¹

Von O. HARNISCH

Aus der Hydrobiologischen Anstalt der Max-Planck-Gesellschaft Plön
(Z. Naturforschg. **13b**, 545—547 [1958]; eingegangen am 6. März 1958)

In dieser Mitteilung wird gezeigt, daß die Einschußkörper des Fettkörpers der Larven von *Chironomus thummi* und besonders von *Chir. anthracinus* bei 28° C erheblich vergrößert werden, ja bei *Chir. anthracinus* im Extremfall zu starker Deformation bei extremer Vergrößerung neigen. Es wird darauf hingewiesen, daß bei dieser Temperatur die Larven zur Emission eines durch KOH nicht absorbierbaren Gases neigen.

Ich habe in der letzten Zeit der Tätigkeit des Fettkörpers bei der Atmung von *Chironomus*-Larven Beachtung gewidmet (vgl. u. a. HARNISCH 1956²). Ich fand, daß der Fettkörper besonders bei euroxybionten Larven drüsenartige Funktion ausüben kann: seine Einschußkugeln werden unter dem Einfluß

von O₂-Mangel erheblich vergrößert, sie scheinen alsdann „geopfert“ zu werden, im Extremfall zu platzen. Ich habe an einen Zusammenhang zwischen diesen Vorgängen und der Bereitstellung von Gas (O₂) im Larvenkörper gedacht, ohne freilich an eine Sekretion von O₂ zu denken, da wahrscheinlich ein ziemlich komplizierter Emissionsprozeß vorliegt. Es ist keine Frage, daß die Einschußkörper des Fettkörpers beim Gaswechsel der *Chironomus*-Larven erhebliche Beachtung verdienen.

¹ Herrn Prof. Dr. G. Chr. HIRSCH (Göttingen) in Dankbarkeit zum 70. Geburtstag gewidmet.

² O. HARNISCH, Biol. Zbl. **75**, 464 [1956].