

O-Mikrotubuli in fokalen Cytoplasmanekrosen von Leberepithelien und ihre Beziehung zu Mikrokörpern

ULRICH PFEIFER

Pathologisches Institut der Universität Würzburg
(Direktor: Prof. Dr. H.-W. ALTMANN)

Eingegangen am 4. Juli 1968

O-Microtubules within Sites of Focal Cytoplasmic Degradation of Liver Cells; Their Relation to Microbodies

Summary. Osmium resistant microtubules of approximately 280 Å in outer and 150 Å in inner diameter are found within sites of focal cytoplasmic degradation of rat liver parenchymal cells. These microtubules are often closely associated with a nucleoid of a microbody and therefore are thought to be derived from the matrix of segregated microbodies.

Zusammenfassung. Innerhalb fokaler Cytoplasmanekrosen von Leberparenchymzellen kommen mit Osmium fixierbare Mikrotubuli vor, deren Außendurchmesser etwa 280 Å und deren Innendurchmesser etwa 150 Å beträgt. In enger räumlicher Beziehung zu ihnen können Nukleole von Mikrokörpern identifiziert werden. Es wird angenommen, daß die Mikrotubuli aus der Matrix von Mikrokörpern entstehen.

Wie in anderen Parenchymzellen treten auch in Leberepithelien unter den verschiedensten pathologischen Bedingungen fokale Cytoplasmanekrosen auf (z. B. HRUBAN u. Mitarb., 1963; zur Nomenklatur s. ERICSSON u. Mitarb., 1965). Sie belegen morphologisch eine abnorme Steigerung cellulärer Autophagie, eines Prozesses also, der in geringem Ausmaße schon physiologischerweise zu beobachten ist (NOVIKOFF u. SHIN, 1964). In solchen Degradationsherden können die verschiedenen Cytoplasmaorganellen, wie Mitochondrien, rauhes und glattes endoplasmatisches Reticulum oder auch Mikrokörper (microbodies) anfänglich noch gut zu erkennen sein. In späteren Stadien des intracellulären Verdauungsprozesses (Übersicht bei DeDUVE u. WATTIAUX, 1966) kommt es dagegen zu einer weitgehenden Zerstörung, so daß dann die einzelnen Organellen in der Regel nicht mehr zu identifizieren sind. Von myelinartigen Figuren abgesehen ist das Auftreten von Gebilden, die im Cytoplasma sonst nicht vorkommen, bisher weitgehend unbekannt. Deshalb soll eine in fokalen Cytoplasmanekrosen nach $3/4$ -Hepatektomie (PFEIFER u. BANNASCH, 1968) beobachtete eigentümliche Struktur im Folgenden näher beschrieben und nach Herkunft und Bedeutung diskutiert werden.

Material und Methoden

Es handelt sich um Lebergewebe nach $3/4$ -Hepatektomie. Der Eingriff war 6 Std vor der Tötung an äthernarkotisierten männlichen Albinoratten (*Sprague-Dawley*, Körpergewicht um 200 g) durchgeführt worden. Zur Fixation (2 Std bei 4°C) diente 1% phosphatgepufferte OsO_4 -Lösung. Dünnschnitte des in Epon eingebetteten Materials wurde mit Uranylacetat oder Bleihydroxyd nachkontrastiert und mit dem Elmiskop I untersucht.

Befunde

Die reichlich vorkommenden, bis mehrere Mikron großen fokalen Cytoplasmanekrosen enthalten neben identifizierbaren Organellen (Abb. 1a) unregelmäßig verteilt amorphes, ziemlich elektronendichtes Material und werden in der Regel durch eine Membran gegen das übrige Cytoplasma abgegrenzt. Innerhalb dieser Herde findet man mehr oder weniger umschriebene, nur ganz selten durch eine eigene Membran abgegrenzte (Abb. 1a †, b), oft vergleichsweise transparente Areale, in denen bis etwa 0,25 μ lange, stets gestreckt verlaufende röhrenförmige Gebilde (Abb. 1b—e) vorhanden sind. Liegen diese mit ihrer Längsachse in der Schnittebene, so sind sie durch zwei parallel verlaufende osmiophile Linien charakterisiert, ohne daß an ihren Enden eine scharfe Abgrenzung zu erkennen wäre. Quer zur Längsachse getroffen stellen sie sich als ringförmige Profile dar, deren Außendurchmesser von etwa 280 Å (230—330 Å) dem Abstand der Grenzlinien von Längsschnitten entspricht. Für den Innendurchmesser ergibt sich ein Mittel von 150 Å (120—180 Å), für die Wandstärke ein solches von 75 Å (60—90 Å). Es handelt sich also um Strukturen, die rein deskriptiv als Mikrotubuli zu bezeichnen sind. Sie liegen gelegentlich locker verstreut, meistens allerdings dicht beieinander, sind jedoch nie in einer gesetzmäßigen Ordnung ausgerichtet. Manchmal setzen sie sich unscharf in eine das Areal umgebende amorphe Substanz fort (Abb. 1c ‡). Hin und wieder sieht man innerhalb einer Gruppe von Mikrotubuli einen kristalloiden Körper, der durch parallel verlaufende osmiophile Linien mit unterschiedlichem Abstand (~ 100 Å, ~ 170 Å) charakterisiert ist (Abb. 1d, e, †). Solche Kristalloide gleichen Mikrokörper-Nukleoiden (Abb. 1f), deren komplizierter räumlicher Aufbau (TSUKADA u. Mitarb., 1966) die Inkonstanz der Streifenabstände verständlich macht.

Erörterung

„Mikrotubuli“ (SLAUTTERBACK, 1963; LEDBETTER u. PORTER, 1963) sind im Cytoplasma tierischer Zellen mit einer gewissen Regelmäßigkeit erst nach Einführung der Fixation mit Glutaraldehyd beschrieben worden (BEHNKE, 1964; SANDBORN u. Mitarb., 1964; DETHE, 1964), kommen aber auch in osmiumfixiertem Gewebe vor (z. B. SLAUTTERBACK, 1963). Nach der von BEHNKE u. ZELANDER (1967) vorgeschlagenen rein deskriptiven Einteilung sind die oben beschriebenen, innerhalb fokaler Cytoplasmanekrosen gefundenen röhrenförmigen Gebilde wegen ihrer Fixierbarkeit mit Osmium als *O-Mikrotubuli* zu bezeichnen. Ihr mittlerer Außendurchmesser von 280 Å gestattet zwar zunächst keine sichere Unterscheidung von den 180—270 Å dicken (BEHNKE, 1964; DETHE, 1964), mit

Abb. 1. a Fokale Cytoplasmanekrosen (FN) 6 Std nach $\frac{3}{4}$ -Hepatektomie. Mehrere noch erkennbare Mitochondrien (Mi). Mikrotubuli in einem membranbegrenzten Areal (\leftrightarrow). OsO_4 -Fixation, Bleihydroxyd, 18000 \times . b Stärkere Vergrößerung der in a mit † markierten Stelle. Mehrere längs und quer getroffene Mikrotubuli. 63000 \times . c Fokale Cytoplasmanekrose 6 Std nach $\frac{3}{4}$ -Hepatektomie. In zahlreichen Arealen liegen Mikrotubuli (MT). Einige setzen sich unscharf in eine amorphe Substanz fort (\leftrightarrow). Kristalloides Gebilde (\leftrightarrow) mit parallel angeordneten Streifen inmitten einer Gruppe von Mikrotubuli. OsO_4 -Fixation, Uranylacetat, 52000 \times . d Stärkere Vergrößerung des Kristalloid in c. Abstand der Streifen ca. 170 Å. 110000 \times . e Regulär im Cytoplasma liegender Mikrokörper (MK). Rechts im Bilde Teil eines Degradationsherdes, dessen Grenzmembran schnittbedingt nicht dargestellt ist. In einem Areal gleicher Größenordnung wie der Mikrokörper (MK) mehrere Mikrotubuli (\rightarrow) sowie ein

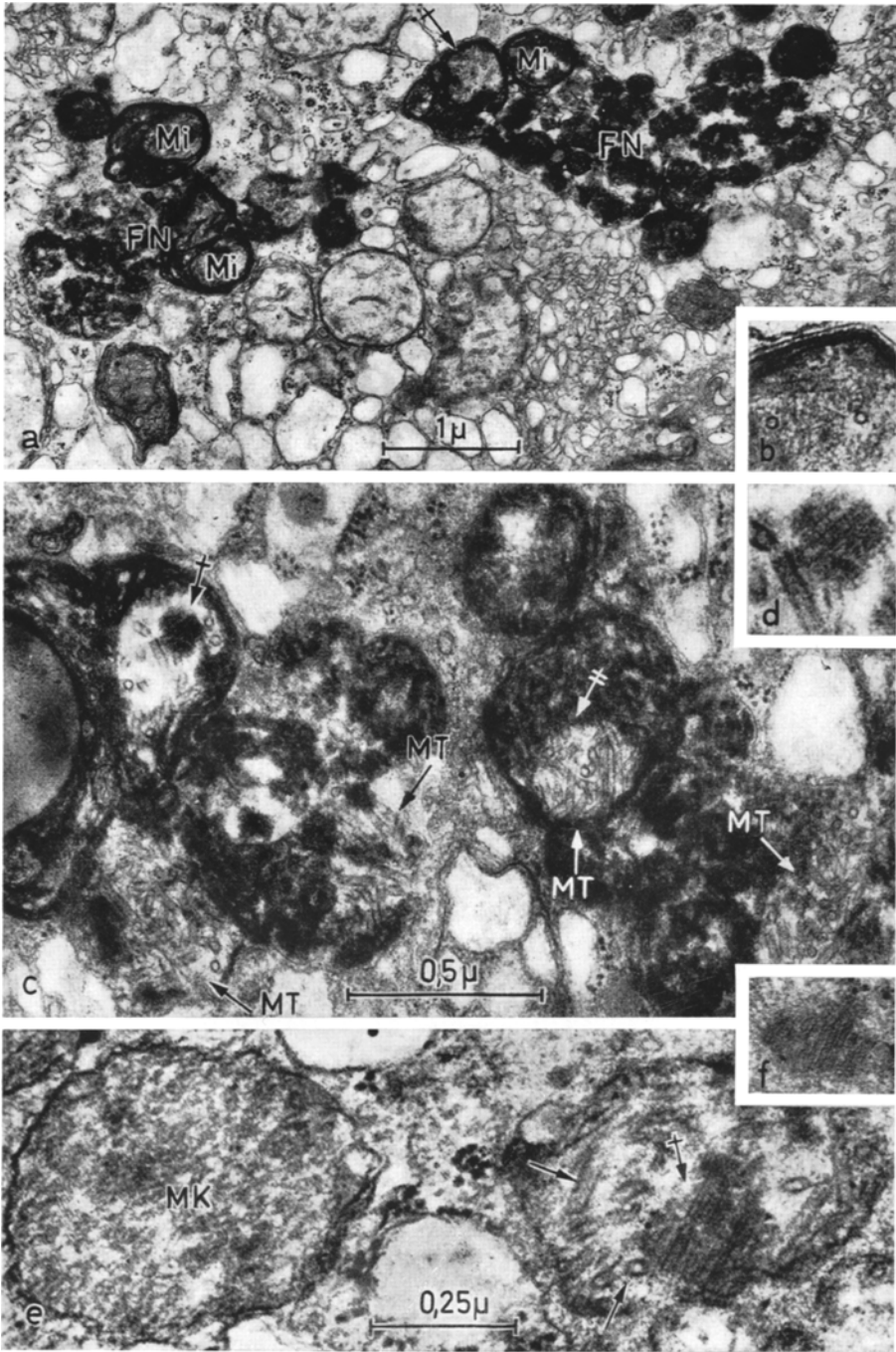


Abb. 1a—f

kristalloides Gebilde (\leftrightarrow) mit unterschiedlichem Streifenabstand (ca. 100 Å, ca. 170 Å). OsO_4 -Fixation, Bleihydroxyd, 76000 \times . f Nukleoid eines regulär im Cytoplasma liegenden Mikrokörpers. Der Streifenabstand entspricht dem des kristalloiden Gebildes in e

Glutaraldehyd fixierbaren *G-Mikrotubuli*. Abgesehen von dem Verhalten gegenüber dem Fixans sind aber die hier beschriebenen O-Mikrotubuli durch ihre offenbar limitierte Länge bis zu $0,25 \mu$, durch ihre meist dichte Lagerung sowie durch das ausschließliche Vorkommen in fokalen Cytoplasmanekrosen von den G-Mikrotubuli in Leberzellen unterschieden; denn diese liegen nach BRUNI u. PORTER (1965) im Grundplasma, erreichen eine Länge von $1,5 \mu$ und kommen nie gruppenweise vor.

Innerhalb membranbegrenzter Räume, wie sie fokale Cytoplasmanekrosen darstellen sind Mikrotubuli bisher nur zweimal beschrieben worden. JOURNEY (1964) fand bei der Untersuchung von Peritonealmakrophagen zahlreiche O-Mikrotubuli in Gebilden, die er als Lyso-somen und Phagocytosevacuolen ansprach. Anders als die hier gezeigten waren sie meist regelmäßig parallel und oft ausschließlich in der Randzone angeordnet. BOLER u. ARHELGER (1966) beschrieben G-Mikrotubuli unterschiedlicher Dicke ($\sim 200 \text{ \AA}$, $\sim 400 \text{ \AA}$) in Cytosomen und Cytosegresomen von Nierenepithelien. In beiden Arbeiten wird eine Bedeutung für den Stoffaustausch zwischen den vacuolären Gebilden und dem Cytoplasma erörtert; BOLER u. ARHELGER (1966) halten aber auch für möglich, daß die eingeschlossenen Mikrotubuli als reine Abbauprodukte aufzufassen sind.

Da die hier gezeigten O-Mikrotubuli ausschließlich in umschriebenen Cytoplasmanekrosen zu finden sind, ist anzunehmen, daß sie aus sequestrierten Cytoplasmaorganellen hervorgehen. Die folgenden Gründe können dafür sprechen, daß sie aus der Matrix eingeschlossener Mikrokörper (microbodies) stammen: 1. Mikrokörper werden in fokale Cytoplasmanekrosen einbezogen. Dies gilt sowohl für Leberparenchymzellen (NOVIKOFF u. SHIN, 1964; SVOBODA u. Mitarb., 1967; PFEIFER u. BANNASCH, 1968) als auch für Tubuluszellen der Niere (ERICSSON u. Mitarb., 1965; LANGER, 1968). 2. Innerhalb einer Gruppe der beschriebenen Mikrotubuli kann immer wieder ein kristalloides Gebilde identifiziert werden (Abb. 1d, e, †), welches von einem Mikrokörper-Nukleoid (Abb. 1f) nicht zu unterscheiden ist. 3. Die Areale, in denen Mikrotubuli liegen, sind oft von gleicher Größenordnung wie Mikrokörper (Abb. 1e).

Dabei muß offen bleiben, ob die Mikrotubuli — etwa unter dem Einfluß eines differenten Milieus — durch Umlagerung amorpher Bestandteile der Matrix entstehen, oder ob sie bereits in intakten Mikrokörper vorliegen und durch Herauslösen von Substanzen demaskiert werden. An der Matrix *sequestrierter* Mikrokörper ist bisher lediglich eine Verdichtung aufgefallen (LANGER, 1968); allerdings kann sie bei *regulär im Cytoplasma* liegenden Mikrokörper fibrilläre (HRUBAN u. Mitarb., 1966) beziehungsweise lamalläre (SVOBODA u. AZARNOFF, 1966) Formationen oder parallel angeordnete, offenbar doppelwandige Tubuli mit einem Durchmesser von 1000 \AA (DALTON, 1964) aufweisen.

Ob die Einbeziehung von Mikrokörpern in die fokalen Cytoplasmanekrosen für den weiteren Abbau des eingeschlossenen Materials enzymatisch von Bedeutung ist (BRUNI u. PORTER, 1965) oder ob es sich lediglich um ein Teilphänomen einer grundsätzlich die verschiedensten Organellen betreffenden cellulären Autophagie handelt (ERICSSON u. Mitarb., 1965; SVOBODA u. Mitarb., 1967; LANGER, 1968; THOENES u. Mitarb., 1968), ist zwar aufgrund der hier demonstrierten Befunde nicht zu entscheiden. Solange sich aber für die Hypothese von BRUNI u. PORTER keine Belege finden lassen, wird man den von LANGER zusammenfassend angeführten Argumenten mehr Gewicht beimessen und die eingeschlossenen Mikrokörper ebenso wie die aus ihnen hervorgehenden Mikrotubuli als ein mehr zufälliges Begleitphänomen fokaler Cytoplasma-degradation ansprechen müssen.

Literatur

- BEHNKE, O.: A preliminary report on "microtubules" in indifferentiated and differentiated vertebrate cells. *J. Ultrastruct. Res.* **11**, 139—146 (1964).
- , and T. ZELANDER: Filamentous substructure of microtubules of the marginal bundle of mammalian blood platelets. *J. Ultrastruct. Res.* **19**, 147—165 (1967).
- BOLER, R. K., and R. B. ARHELGER: Microtubules in cytosomes and cytosegresomes of rabbit proximal tubule epithelium. *Lab. Invest.* **15**, 302—311 (1966).
- BRUNI, C., and K. R. PORTER: The fine structure of the parenchymal cell of the normal rat liver. *Amer. J. Path.* **46**, 691—755 (1965).
- DALTON, A. J.: An electron microscopical study of a series of chemically induced hepatomas. In: *Cellular control mechanisms and cancer* (P. EMMELOT and O. MÜHLBOCK, eds.). Amsterdam-London-New York: Elsevier 1964.
- DETHE, G.: Cytoplasmic microtubules in different animal cells. *J. Cell Biol.* **23**, 265—275 (1964).
- ERICSSON, J. L. E., B. F. TRUMP, and J. WEIBEL: Electron microscopic studies of the proximal tubule of the rat kidney. II. Cytosegresomes and cytosomes: their relationship to each other and to the lysosome concept. *Lab. Invest.* **14**, 1341—1365 (1965).
- HRUBAN, Z., B. SPARGO, H. SWIFT, R. W. WISSLER, and R. G. KLEINFELD: Focal cytoplasmic degradation. *Amer. J. Path.* **42**, 657—683 (1963).
- H. SWIFT, and A. SLESERS: Ultrastructural alterations of hepatic microbodies. *Lab. Invest.* **15**, 1884—1901 (1966).
- JOURNEY, L. J.: Cytoplasmic microtubules in mouse peritoneal macrophages during rejection of MC1M Ascites tumor cells. *Cancer Res.* **24**, 1391—1405 (1964).
- LANGER, K. H.: Feinstrukturen der Mikrokörper (microbodies) des Nierentubulus. *Z. Zellforsch.* (1968) (im Druck).
- LEDBETTER, M. C., and K. R. PORTER: A "microtubule" in plant cell fine structure. *J. Cell Biol.* **19**, 239—250 (1963).
- PFEIFER, U., u. P. BANNASCH: Zum Problem der „hyalinen Eiweißtropfen“ im Cytoplasma der Leberparenchymzellen. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen nach $\frac{3}{4}$ -Hepatektomie. *Virchows Arch. Abt. B. Zellpath.* **1**, 365—388 (1968).
- SANDBORN, E., P. F. KOEN, J. D. McNABB, and G. MOORE: Cytoplasmic microtubules in mammalian cells. *J. Ultrastruct. Res.* **11**, 123—138 (1964).
- SLAUTTERBACK, D. B.: Cytoplasmic microtubules. I. Hydra. *J. Cell Biol.* **18**, 367—404 (1963).
- SVOBODA, D. J., and D. L. AZARNOFF: Response of hepatic microbodies to a hyperlipidemic agent, ethyl chlorophenoxy-isobutyrate (CPIB). *J. Cell Biol.* **30**, 442—450 (1966).
- H. GRADY, and D. AZARNOFF: Microbodies in experimentally altered cells. *J. Cell Biol.* **35**, 127—152 (1967).
- THOENES, W., K. H. LANGER u. U. PFEIFER: Eiweißresorption, Cytoplasmaeinschmelzung und lytische Aktivitäten im Nierentubulus. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **52**, 294—299 (1968).
- TSUKADA, H., Y. MOCHIZUKI, and S. FUJIWARA: The nucleoids of rat liver cell microbodies. *J. Cell Biol.* **28**, 449—460 (1966).

Dr. ULRICH PFEIFER
Pathologisches Institut der Universität
87 Würzburg