

Aus dem Rheinisch-Westfälischen Institut für Übermikroskopie in Düsseldorf (Direktor: Prof. Dr. B. v. BORRIES) und dem Pathologischen Institut der Medizinischen Akademie in Düsseldorf (Direktor: Prof. Dr. H. MEESSEN)

Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Uterusmuskel der Ratte unter Follikelhormonwirkung

Von

HEDI GANSLER

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 13. April 1956)

In einer früheren Arbeit² haben wir ringkernige Spezialzellen beschrieben, die in Abhängigkeit von Follikelhormon (FH) in der Muskulatur und im submukösen bindegewebigen Stroma auftreten. Von den physiologischen Veränderungen während des Cyclus ausgehend, haben wir experimentell die verschiedenen hormonell möglichen Uterusstadien erzeugt. Es ergab sich, daß diese sogenannten ringkernigen Zellen bei der infantilen Ratte fehlen. Bei der geschlechtsreifen Ratte sind sie im Oestrus sehr reichlich und fehlen im Dioestrus. Kommt es zu einem Sistieren der FH-Produktion, sei es durch Schwangerschaft oder durch Kastration, so kann man das allmähliche Verschwinden der RZ aus der Uterusmuskulatur beobachten. Behandelt man eine kastrierte Ratte mit Follikelhormon, so treten in Abhängigkeit von Wirkungsdauer und Dosis des FH erneut ringkernige Zellen auf. Wir nahmen damals an, daß sich die RZ im Uterus aus bindegewebigen Zellen umwandeln und zum Formkreis der von v. MÖLLENDORFF erstmalig beschriebenen Gewebsleukocyten gehören.

Es interessierte uns nun, ob sich unsere damaligen Befunde im Elektronenmikroskop bestätigen lassen würden. Kann man auch elektronenoptisch ringkernige Zellen beobachten und wenn ja, welche Informationen lassen sich über submikroskopische Feinstruktur und ihre Entstehung gewinnen?

Material und Methode

Zur Untersuchung gelangten Uteri von 4 Ratten, die 4 Wochen nach der Kastration mit Follikelhormon behandelt worden waren (0,1 mg Ovocyclin pro 100 g Ratte). 2 und 4 Wochen nach der Injektion wurden die Tiere durch Dekapitieren getötet. Aus dem unteren Uterinsegment wurde je eine Scheibe mit der Rasierklinge herausgeschnitten. Diese wurde weiter in kleine Würfelchen von etwa 1 mm³ unterteilt. Das Material fixierten wir 1 Std in 1%iger Osmiumsäure nach PALADE. Nach Entwässern über Alkohol wurden die Präparate in Butylmetacrylat eingebettet. Die Blockchen wurden mit dem von v. BORRIES und HUPPERTZ konstruierten Ultramikrotom geschnitten; die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Siemens-Elektronenmikroskop gemacht.

Um die Verbindung zu den Befunden im Lichtmikroskop zu gewinnen, haben wir von jedem Blöckchen im Anschluß an die Dünnschnitte (150—250 Å) noch einige dickere (500—1000 Å) angefertigt, die wir auf Glasobjektträger aufzogen und nach Herauslösen des Metacrylats im Phasenkontrastmikroskop untersuchten.

I. Phasenkontrastmikroskopische Befunde

Am leichtesten orientiert man sich an Blöckchen, deren Schnitt- richtung annähernd senkrecht zur Längsachse des Uterus liegt. Hier suchen wir die innere Ringmuskelschicht auf. Deutlicher als an Paraffin- schnitten kann man zwei verschiedene Arten von Muskelzellen be- obachten. Es finden sich länglich ovale Muskelzellen mit einem Kern, der sich gegen das umgebende Cytoplasma nur wenig abhebt. Dann sind gequollene Muskelzellen mit einem wesentlich helleren Cytoplasma nach- zuweisen, das den Kern kontrastreicher erscheinen läßt. Auch die Zell- membranen sind gut zu sehen, so daß der Zellverband das Aussehen von Pflanzenzellen hat. Zwischen den Muskelzellen und vor allem an der Grenze zwischen Muskulatur und submukösem Stroma liegen mehr oder weniger reichlich Zellen, die meist einen etwas dunkleren Kern haben als die Muskelzellen, der von osmiophilen Körnchen umgeben ist. Die Kerne sind oft hakenförmig oder zeigen gelegentlich zwei Kernanschnitte in einer Zelle.

II. Elektronenmikroskopische Befunde

Auch hier kann man zwei extreme Zustandsbilder der Muskelzelle beobachten, außerdem alle Übergangsstadien. Einmal sieht man Zellen mit hellem ovalen Kern. Die Kernmembran ist meist gefältelt; mitunter reichen die Falten so tief, daß der Kern regelrecht durchgeschnürt wird. Wenige kleine Mitochondrien sind meist um den Kernpol gruppiert; im übrigen sind die Zellen vollgepackt mit dicht aneinanderliegenden Myofibrillen (Abb. 1). Dann finden sich Muskelzellen, die durch einen geringeren Myofibrillenbestand ausgezeichnet sind. Die von Myofibrillen freie Cytoplasmazone um den Kern ist verbreitert; darin liegen entweder kleine dichte oder helle geschwollene Mitochondrien. Die gesamte Zelle ist inhomogener und polymorpher als die zuerst beschriebenen. Zwischen den Mitochondrien ist das endoplasmatische Reticulum ausgebildet. Ferner sieht man Vacuolen und osmiophile Körnchen. Die Myofibrillen sind oft nur noch im peripheren Zellbereich erhalten (Abb. 2). Die dritte Zellart ist durch osmiophile Granula charakterisiert. Die Zellen finden sich vereinzelt in der Muskelschicht, zahlreich in den Rand- partien, d. h. am Übergang zur Submucosa. Hier bilden sie ent- weder einen geschlossenen Zellverband (Abb. 3) oder liegen einzeln (Abb. 4) und sind dann meist von intercellulärer Fasersubstanz (Kolla- gen) umgeben. Die äußere Zellmembran ist immer gut ausgebildet. Die Kerne sind meist etwas dichter als die Muskelkerne; hin und wieder

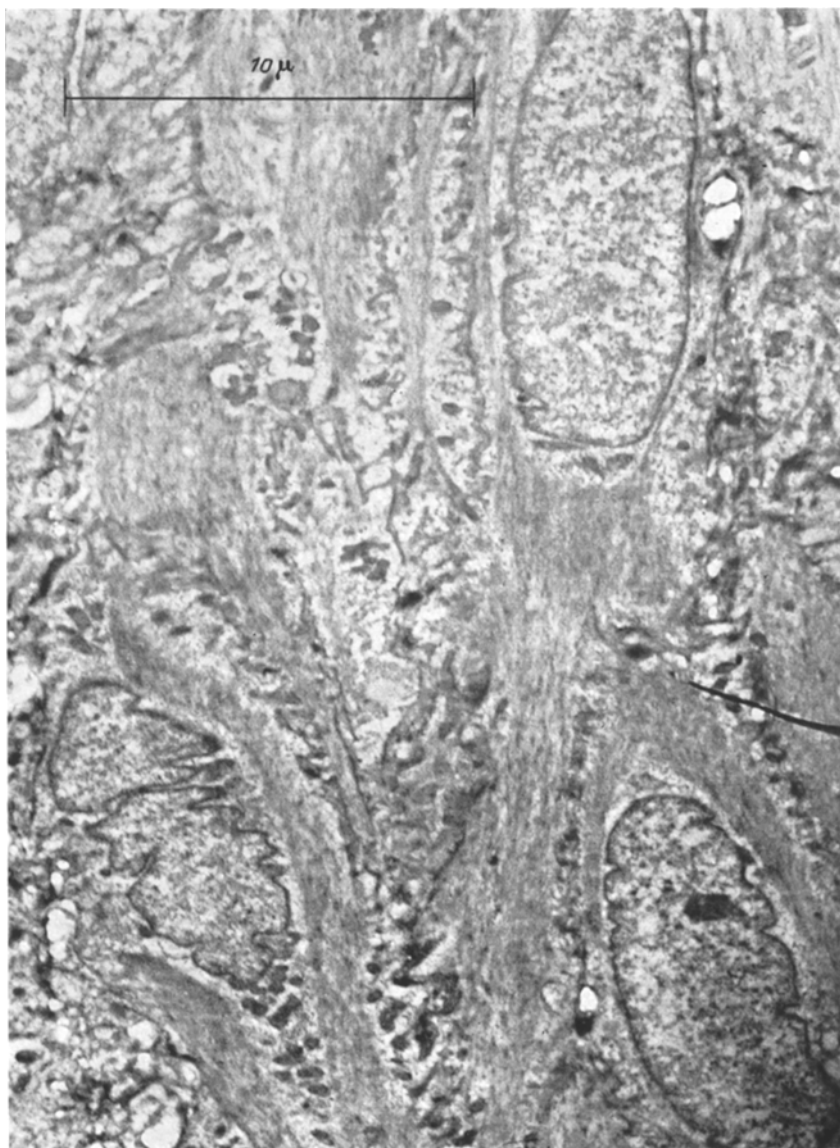


Abb. 1. Glatte Muskelzellen längs geschnitten. Der größte Teil der Zellen besteht aus Myofibrillen. Wenige kleine Mitochondrien sind vorwiegend um die Kernpole lokalisiert. Die Kernmembranen sind mehr oder weniger stark gefältelt, mitunter führen sie zu echten Abschnürungsfiguren. (Kern links unten)

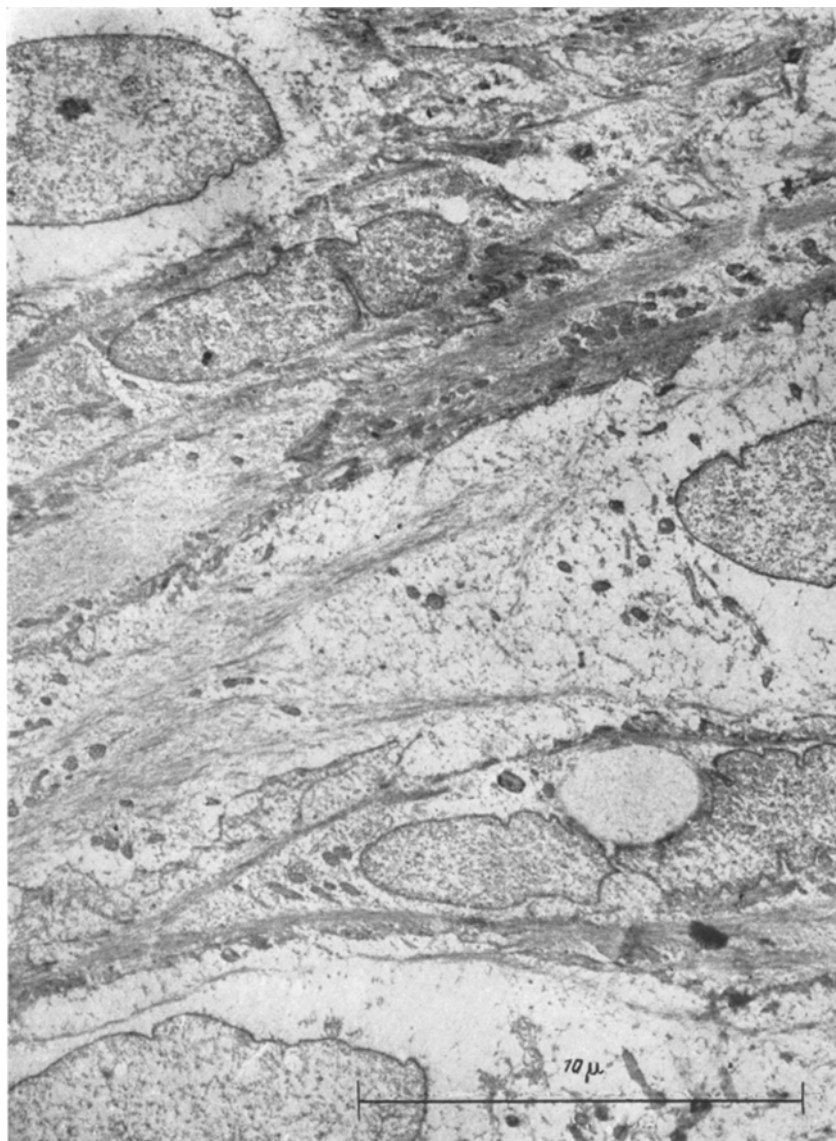


Abb. 2. Glatte Muskelzellen aus der inneren Ringschicht des Uterus längs geschnitten. Das Cytoplasma ist hell, die Myofibrillen weitgehend nur noch in der Peripherie der Zellen, wodurch sie an das Aussehen von Pflanzenzellen erinnern

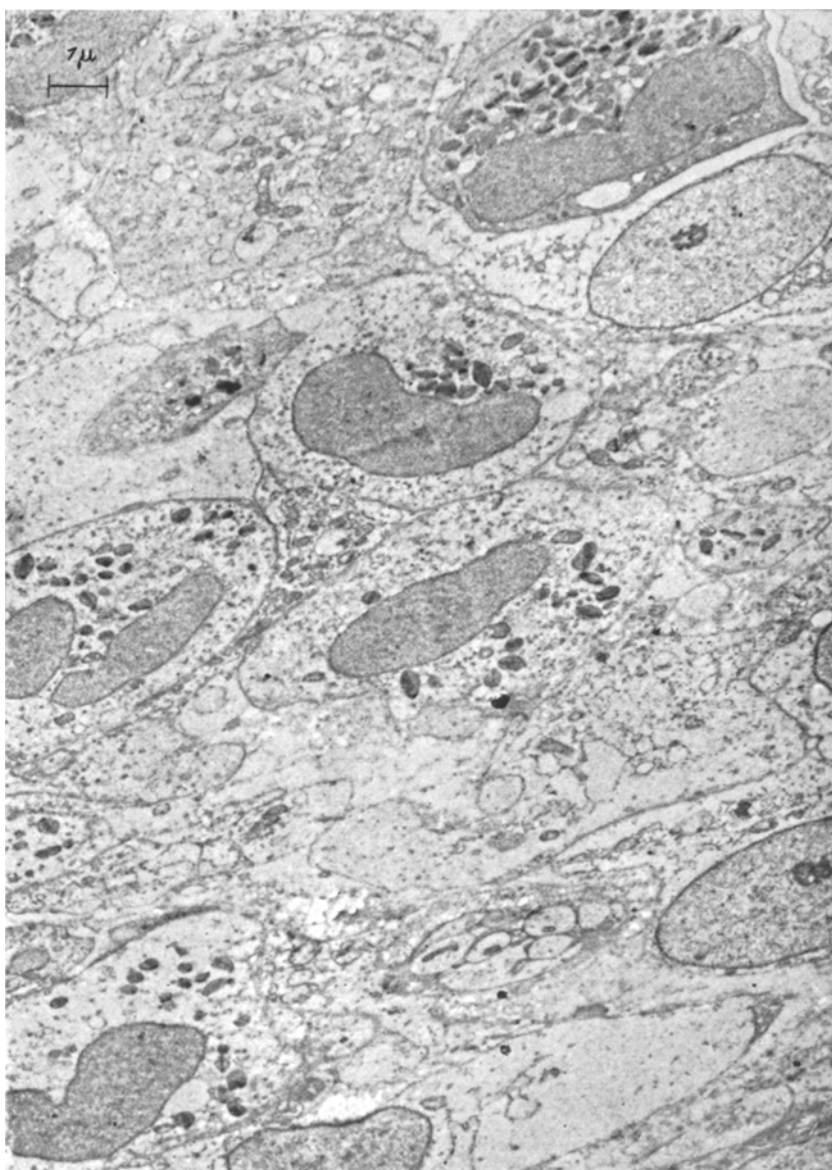


Abb. 3. Grenzgebiet Muskulatur—Submucosa. Rechts unten ist noch ein schmaler Streifen der inneren Ringschicht der Muskulatur zu sehen. Die Spezialzellen mit den osmiophilen Granula liegen noch in einem geschlossenen Zellverband. Der große helle Kern rechts oben ist mit großer Wahrscheinlichkeit noch als einer Muskelzelle zugehörig anzusehen. Die Kerne der Spezialzellen sind einfach oder doppelt angeschnitten, die Zellen rund bis oval; im Cytoplasma gleichmäßig verteilt liegen osmiophile Granula und normale Mitochondrien. Oben rechts eine isoliert liegende Spezialzelle

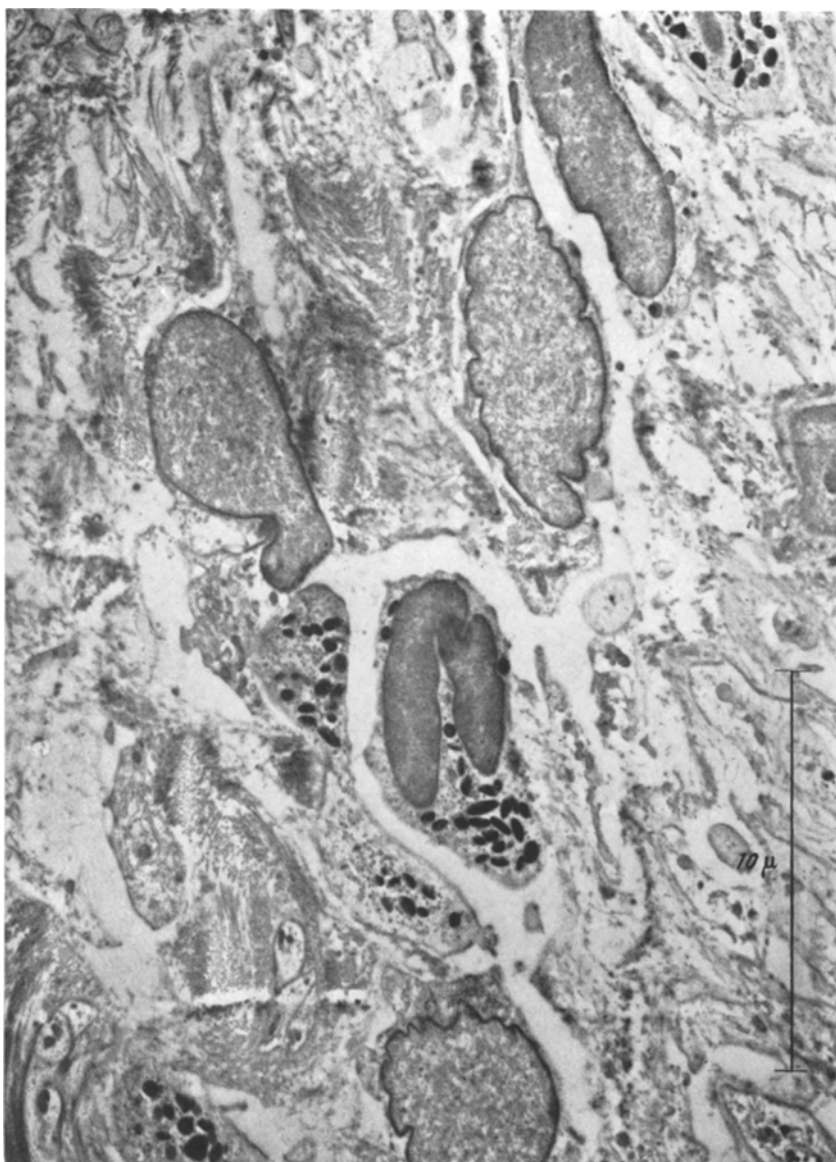


Abb. 4. Isoliert liegende Spezialzellen in der Submucosa. Dazwischen reichlich kollagene Fasern

sieht man aber auch Kerne, die sich weder in die eine noch in die andere Gruppe eindeutig einreihen lassen. Häufig sind zwei Kernanschnitte in einer Zelle zu sehen oder der Kern ist hakenförmig. Das Cytoplasma ist reich an verschiedenartigen Strukturelementen. Neben normalen

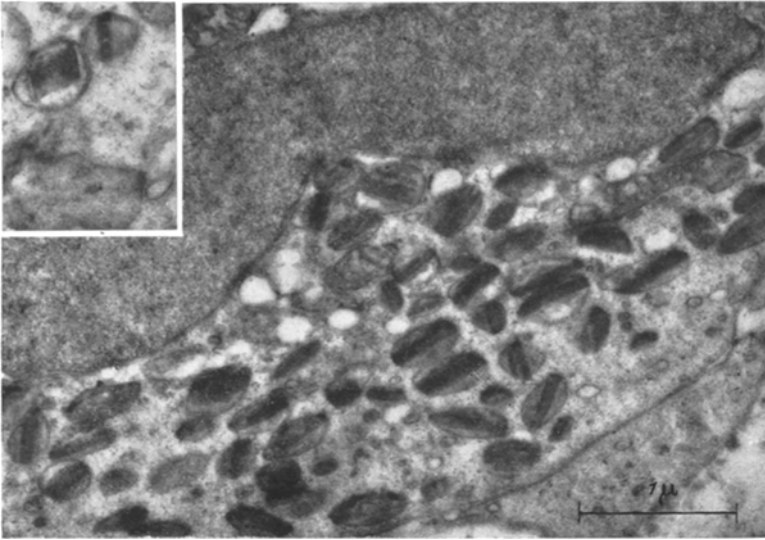


Abb. 6

Abb. 5. Ausschnitt aus einer Spezialzelle; osmiophile Granula, die noch eine äußere Doppelmembran haben.

Abb. 6. Stärkere Vergrößerung der auf Abb. 3 rechts oben abgebildeten Spezialzelle. Man sieht nebeneinander normale Mitochondrien und Granula mit den osmiophilen Bändern. Die Formen dieser Bänder sind in den einzelnen Granula sehr verschieden.

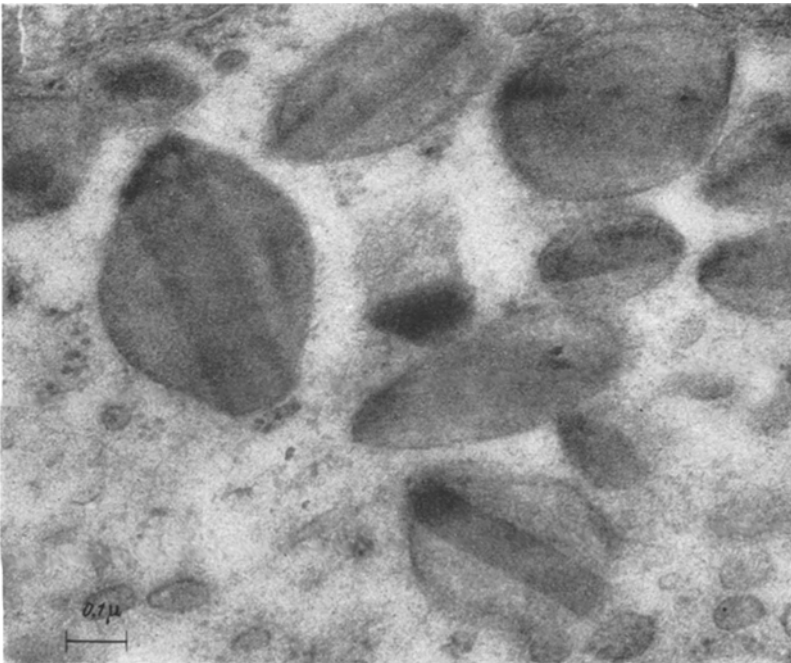


Abb. 7. Osmiophile Granula. 95 000fach

Mitochondrien sind Granula, die meist nur noch eine einfache Außenmembran haben und deren Innenstruktur sich in charakteristischer Weise verändert hat, nachzuweisen. In einer mehr oder minder dichten homogenen oder fein fibrillären Grundsubstanz liegt ein rechteckiger oder rhombischer dunklerer Streifen (Abb. 7). Außerdem sieht man nicht selten Bilder, die man als Übergangsstadien zwischen den normalen Mitochondrien und den zuletzt beschriebenen verstehen kann. Manchmal sind diese rechteckigen dichten Streifen in einem Granulum gelegen, das von einer Doppelmembran umgeben ist (Abb. 5); oder es lassen sich noch Reste von Innenmembranen um das rechteckige Band erkennen. Oft sind auch zwei dieser charakteristischen Gebilde in einem Granulum anzutreffen und nicht immer sind sie so regelmäßig wie geometrische Figuren, sondern bandartig gefaltet (Abb. 6). Golgizonen, cytoplasmatische Membranen und Vacuolen sind in wechselnder Menge vorhanden. Mit großer Regelmäßigkeit sieht man in diesen Zellen noch kleine runde Körperchen, deren Durchmesser etwa 100 Å beträgt; sie sind nach außen durch eine einfache Membran begrenzt; der Innenkörper ist homogen oder fein fibrillär. Ein sicherer Zusammenhang mit anderen intraplasmatischen Strukturelementen konnte bisher nicht beobachtet werden.

Besprechung der Ergebnisse

Die elektronenmikroskopische Untersuchung des unter FH-Wirkung stehenden Rattenuterus hat ergeben, daß sich in Ultradünnschnitten Zellen nachweisen lassen, deren Auftreten als spezifisch für die FH-Wirkung angesehen werden muß. Die an Paraffinschnitten beobachteten ringkernigen Formen lassen sich allerdings an Dünnschnitten nicht darstellen. Denkt man sich die Bilder von hakenförmigen und doppelten Kernanschnitten übereinanderprojiziert, so ergibt sich aber die offene oder geschlossene Ringform. Die Ultrastruktur dieser Kerne zeigt jedoch nie eine zentrale Vacuolenbildung, so daß wir unsere frühere Annahme, die RZ entstünden durch Vacuolen- und Lochbildung eines kompakten Kernes, nicht aufrechterhalten können. Die elektronenmikroskopischen Bilder sprechen vielmehr dafür, daß ein spindelig länglich-ovaler Kern sich auf einen bestimmten Reiz hin so verbiegt, daß er auf dicken Paraffinschnitten als Ring (geschlossen oder offen) imponiert, während man an dünnen Plexiglasschnitten nur Hakenformen oder zwei Kernanschnitte zu sehen bekommt.

Die andere Frage betrifft die Herkunft dieser Spezialzellen. Die locker im submukösen Bindegewebe liegenden Spezialzellen zeigen im Elektronenmikroskop die gleichen Strukturen, wie sie an eosinophilen Leukocyten bereits beschrieben worden sind¹. Trotzdem meinen wir nicht, daß es sich hierbei um aus den Gefäßen eingewanderte Leukocyten handelt. Einmal wird das Auftreten der RZ nach FH-Injektion zuerst immer nur in den Muskelschichten beobachtet (12—24 Std nach

der Injektion), erst nach längerer Wirkungsdauer des FH sind die RZ auch in der Submucosa. Das Elektronenmikroskop zeigt uns weiter, daß ein Teil der Muskelzellen des unter FH-Wirkung stehenden Rattenuterus eine Reduktion des Myofibrillenbestandes erfährt. Die Kerne zeigen charakteristische Einschnürungsfiguren. In solchen Bezirken sieht man häufig die Spezialzellen die zusammen mit den Muskelzellen noch einen geschlossenen Zellverband bilden. Wir nehmen an, daß sie sich erst dann aus dem Zellverband lösen und als isolierte Pseudoleukocyten in die Submucosa gelangen. In diesem Zusammenhang scheint uns auch die Tatsache wichtig, daß die Spezialzellen, die noch in einem geschlossenen Zellverband liegen, etwa zu gleichen Teilen normale Mitochondrien und osmiophile Granula enthalten, während die isoliert liegenden meist vollgestopft sind mit osmiophilen Granula und kaum mehr normale Mitochondrien haben. Elektronenoptisch weisen sich die Spezialzellen vor allem durch die osmiophilen Granula aus, die identisch sind mit den eosinophilen Granula im Lichtmikroskop. Es ist denkbar, daß ein Zusammenhang besteht zwischen der Reduktion der Myofibrillen und der Umwandlung der Mitochondrien in osmiophile Granula. Auf einen bestimmten hormonellen Reiz hin würde sich also der Kern morphologisch verändern (Ringform), die Myofibrillen verschwinden und ein Teil der Mitochondrien sich in osmiophile Granula umwandeln. Es ist sehr wahrscheinlich, daß wir bei der Besprechung unserer Befunde einen großen Teil der Spezialzellen noch gar nicht erfaßt haben, nämlich jene, die im Lichtmikroskop zwar einen Ringkern, aber noch keine eosinophilen Granula haben. Diese Frage könnte nur an Serienschnitten geklärt werden.

Die in den osmiophilen Granula liegenden Bänder sind elektronenoptisch an den eosinophilen Leukocyten schon vielfach als Kristalle beschrieben worden (Literatur s. bei BERNHARD). Wir haben uns deshalb die Frage gestellt, ob wir es hier mit einem echten Massendickenkontrast zu tun haben oder ob ein Beugungsphänomen vorliegt, d. h. also, ob Streifen gleicher Neigung oder Streifen gleicher Dicke auftreten. Solche Streifen müßten bei Änderung der Einstrahlrichtung des beleuchtenden Bündels ihr Aussehen und ihre Lage ändern. Wir haben daher während der subjektiven Betrachtung den Kondensor des Elektronenmikroskops allmählich um sehr kleine und dann um größere Winkel gekippt. Dabei wurde niemals auch nur die geringste Lageverschiebung dieser dunklen Streifen beobachtet. Auch der relative Kontrast war von der Beleuchtung des Bündels unabhängig. Wir glauben daher, daß es sich nicht um Beugungsphänomene handelt, sondern daß diese Bilder unmittelbar auf die Dichteverteilung im fixierten Material schließen lassen. Die als Bänder erscheinenden Bezirke dürften demnach Gebieten zuzuordnen sein, die die Form flacher, runder Zylinder, (Mühlsteine) haben und besonders osmiophil sind.

Über die funktionelle Bedeutung dieser Spezialzellen können wir nicht mehr sagen, als daß ihr Auftreten und Verschwinden von hormonellen Faktoren abhängig ist und weder mit entzündlichen noch allergischen Reaktionsmechanismen in Zusammenhang gebracht werden kann.

Zusammenfassung

In einer früheren lichtmikroskopischen Arbeit am Uterusmuskel der Ratte wurde das Auftreten von ringkernigen Spezialzellen in Abhängigkeit vom Follikelhormon beschrieben. Die elektronenmikroskopische Untersuchung solcher unter Follikelhormonwirkung stehender Rattenuteri hat ergeben:

1. Ein Teil der glatten Muskelzellen ist ganz von Myofibrillen ausgefüllt. Die Kernmembran solcher Zellen ist vielfach gefältelt oder zeigt tiefe Einschnürungen. Wenige kleine Mitochondrien liegen um die Kernpole. Andere Muskelzellen lassen eine weitgehende Reduktion der Myofibrillen erkennen, sie sind nur noch als schmaler Streifen im peripheren Teil der Zelle sichtbar und erinnern dadurch bei schwachen Vergrößerungen an Pflanzenzellen. Das übrige Cytoplasma ist hell; gleichmäßig darin verteilt sind normale oder geschwollene Mitochondrien. Die Kerne solcher Muskelzellen zeigen weniger Membranfalten und -einschnürungen. Zwischen diesen beiden extremen Formen der Muskelzellen lassen sich alle Übergangsstadien beobachten.

2. Die im Lichtmikroskop beobachteten ringkernigen Zellen zeichnen sich im Elektronenmikroskop durch drei Charakteristika aus: Kerne, die oft hakenförmig oder zweifach angeschnitten sind, osmiophile Granula mit band- oder scheibenartigen Verdichtungen und kleine runde Körperchen von etwa 100 Å. Neben Zellen mit relativ wenigen osmiophilen Granula, die noch in einem geschlossenen Zellverband liegen, gibt es andere isoliert gelegene, deren Zelleib vorwiegend aus diesen Granula besteht.

Auf Grund des bisher untersuchten Materials halten wir es für wahrscheinlich, daß die Myofibrillen eines Teiles der unter FH-Wirkung stehenden Muskelzellen reduziert werden, die Mitochondrien in solchen „hellen“ Muskelzellen sich in osmiophile Granula umwandeln, und daß schließlich die ganze Zelle aus dem Verband gelöst wird und in die Submucosa gelangt.

Literatur

¹ BERNHARD, W., et R. LEPLUS: *J. suisse Méd.* 85, 897 (1955). — ² GANSLER, H.: *Virchows Arch.* 325, 90—97 (1954).

Dr. HEDI GANSLER, Rheinisch-Westfälisches Institut für Übermikroskopie
der Medizinischen Akademie, Düsseldorf, Moorenstr. 5
