

## Histologische und Histochemische Untersuchungen an den Leberpigmentzellen von Frosch- und Schwanzlurchen

MICHAEL LINNENBACH

Mit 7 Abbildungen

### Abstract

The pigment cells of the livers of *Xenopus laevis*, *Rana esculenta* and *Triturus cristatus* have been studied light- and electronmicroscopically by using histochemical techniques. Strong concentrations of acid phosphatase were found in the pigment cells of *X. laevis* and *T. cristatus*, while the alkaline phosphatase only stained the liver sinusoids. By utilization the THIÉRY-technique for polysaccharide staining, the pigment granules (melanosomes) of *R. esculenta* responded positively to this procedure.

### Einleitung

Die Verbreitung von Pigmentzellen ist nicht allein auf das Integument beschränkt. Auch in der Leber von Fischen und Amphibien ist dieser Zelltypus nachgewiesen (EBERTH 1867, KREMER 1932, ZYLBERSZAC 1936, SLONIMSKI 1940, LANGER 1979). Hierbei handelt es sich um die dunkel pigmentierten Melanocyten (Synonym: Melanophoren), die im besonderen Maße bei Amphibien auftreten und deren Feinstruktur bereits in mehreren Arbeiten beschrieben ist (WELSCH & STORCH 1972, TANAKA et al. 1974, SPORNITZ 1975, NODA et al. 1977, BAGNARA et al. 1979).

Unklarheit aber herrscht noch über die allgemeine Funktion und die chemische Konsistenz dieser Zellen. Obwohl hierzu in der älteren Literatur (Literaturübersicht siehe KREMER 1932) zahlreiche Hinweise vorliegen, — unter anderem wird beschrieben, daß sowohl exogene Einflüsse (Temperatur, Jahreszeit) als auch endogene Einflüsse (Vitellogenese, Lebensalter) den Pigmentzellegehalt in der Leber verändern — fehlen dennoch weitgehend gesicherte Erkenntnisse. Erst durch die neueren Arbeiten von CICHOCKI & ACKERMANN (1967), ANDREW (1969) und STORCH et al. (1985) ist ein erster aussagekräftiger Ansatz möglich. Die vorliegende Arbeit hat dabei als Ziel, diesen Kenntnisstand zu präzisieren und den Sachverhalt einer breiteren Öffentlichkeit darzulegen, was möglicherweise der weiteren Aufklärung des komplexen Problemkreises förderlich sein wird.

## Material und Methoden

Ich untersuchte die Arten *Xenopus laevis* (DAUDIN, 1803) *Rana „esculenta“* (LINNÉ, 1758) und *Triturus cristatus* (LAURENTI, 1768). Die Lichtmikroskopie erfolgte an geschnittenen (5-8  $\mu\text{m}$ ), in Paraffin eingebetteten Leberstückchen, die zuvor nach BOUIN (aus ADAM & CZIHAK 1964) fixiert wurden. Das für den Enzymnachweis vorgesehene Gewebe wurde unfixiert mit Hilfe eines Kryostaten (Frigocut 2700, REICHERT-JUNG) geschnitten. Die Gefrierschnitte (10  $\mu\text{m}$ ) wurden anschließend für die alkalischen Phosphate (nach PEARSE 1968) und für die saure Phosphatase (nach BARKA & ANDERSON 1962) weiterbehandelt. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen entstanden an einem ZEISS JM-35 Inversmikroskop. Die Fixierung 1mm<sup>2</sup> kleiner Gewebestückchen für die Elektronenmikroskopie erfolgte in einer Lösung aus 3,5% Glutaraldehyd und 0,1 M Cacodylatpuffer bei pH 7,2. Nach Ablauf von 2h wurden die Proben dreimal in Cacodylatpuffer gewaschen und für 1h in 2%  $\text{OSO}_4$  nachfixiert. Zur Entwässerung diente eine aufsteigende Alkoholreihe (Ethanol 50%/70%/90%/95%/100%) und zur Einbettung ein Kunstharzgemisch (Epon/Araldit). Die an einem REICHERT-Ultramikrotom angefertigten Schnitte wurden nachkontrastiert (7' Uranylacetat — 5'REYNOLD's Bleicitrat) und in einem ZEISS EM-9 Elektronenmikroskop betrachtet.

Der Polysaccharid-Nachweis (nach THIÉRY 1967) erfolgte an unkontrastierten, auf Goldnetzen aufgefangenen Ultradünnschnitten, die nacheinander jeweils 30 min in 1%iger Perjodsäure, 3h in 0,2%iger Thiocarbohydrazitlösung, und weitere 30 min in 1%iger Silberproteinatlösung verbrachten. Zwischen den verschiedenen Schritten wurde mehrmals mit aqua bidest gewaschen.

Die Gefrierbruchpräparate wurden für 4h mit 3,5% Glutaraldehyd vorfixiert, über Nacht glyzeriniert (30% Glycerin) und anschließend in FREON 22 bei  $-150^\circ\text{C}$  tiefgefroren. Für den Gefrierbruch stand ein BALZERS BAF 400 Apparat zur Verfügung. Die damit gewonnenen Replica wurden mit Platin bedampft und in 60% Chromschwefelsäure gereinigt.

## Ergebnisse

Die Leberpigmentzellen der meisten Amphibienarten sind auf Grund ihrer dunkelbraunen bis schwarzen Färbung schon bei schwacher Vergrößerung im Lichtmikroskop gut erkennbar (Abb. 1).

Diese auffallend kontrastreiche Morphologie basiert auf der intrazellulären Akkumulation zahlreicher, elektronendichter Granula, die hinsichtlich ihres Melaningehaltes auch als Melanosomen bezeichnet werden. Sie besitzen meist eine runde bis ellipsoide Gestalt von unterschiedlicher Größe (Abb. 2 und 3). Anhand von Gefrierbruchpräparaten erkennt man eine homogene äußere Oberfläche (Abb. 2).

Bei Anwendung eines lichtmikroskopischen Nachweisverfahrens für saure Phosphatase zeigen sich an Pigmentzellen von *X. laevis* und *T. cristatus* dichte Niederschläge (Abb. 4). Vom Nachweis für alkalische Phosphatase werden die

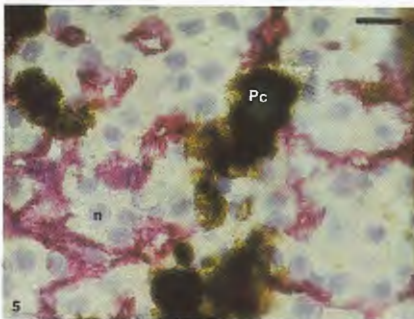
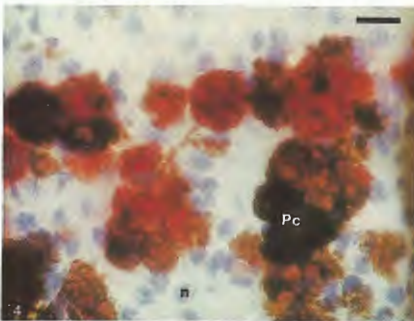
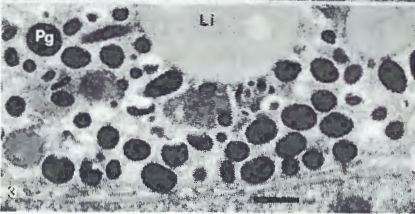
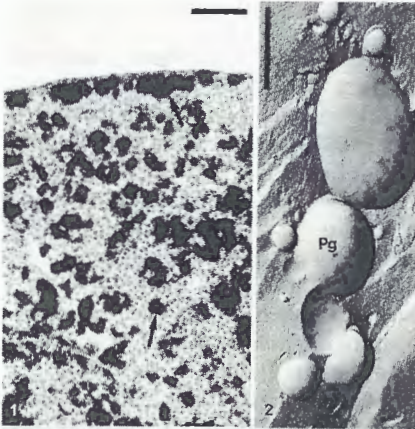


Abb. 1—3. Leberpräparate von *Xenopus laevis*.

Liver preparations of *Xenopus laevis*.

Abb. 1. Lichtmikroskopische Übersicht von der Leberperipherie mit zahlreichen, dunklen Pigmentzellen (Pfeile). Vergr.: 150 $\times$ . Maßstab 100 $\mu$ m.

Lightmicroscopical survey about the liver periphery with numerous opaque pigment cells (arrows). Magn.: 150 $\times$  Bar 100 $\mu$ m.

Abb. 2. Pigmentgranula (Pg.) Gefrierbruchtechnik. Vergr.: 21 200 $\times$ . Maßstab 1  $\mu$ m.

Pigmentgranules (Pg.) Freeze-etched preparation. Magn.: 21 200 $\times$ . Bar 1  $\mu$ m.

Abb. 3. Im Elektronenmikroskop sind innerhalb einer Pigmentzelle Ansammlungen elektronendichter Granula (Pg) erkennbar. (Li) Lipidtropfen. Verg.: 11 800 $\times$ . Maßstab 1  $\mu$ m.

Electron micrograph from a pigment cell reveals large numbers of electron-dense granules (Pg). (Li) Lipid droplet. Magn.: 11 800 $\times$ . Bar 1  $\mu$ m.

Abb. 4 und 5. Histochemische Untersuchungen an der Leber von *Triturus cristatus*.

Histochemical investigations on the liver of *Triturus cristatus*.

Abb. 4. Lichtmikroskopischer Nachweis der sauren Phosphatase. Das Reaktionsprodukt (roter Niederschlag) lagert sich an die Pigmentzellen (Pc) an. (n) Leberzellkern. Vergr.: 1 200 $\times$ . Maßstab 1  $\mu$ m.

Demonstration of acid phosphatase (light microscopy). The pigment cells (Pc) show significant reactions (red precipitations). (n) Hepatocyte nucleus. Magn.: 1 200 $\times$ . Bar 1  $\mu$ m.

Abb. 5. Lichtmikroskopischer Nachweis der alkalischen Phosphatase. Das Reaktionsprodukt (violetter Niederschlag) lagert sich längs der Lebersinusoiden an. Die Pigmentzellen zeigen hier keine Reaktion. Vergr.: 1 200 $\times$ . Maßstab 1  $\mu$ m.

Demonstration of alkaline phosphatase (light microscopy). The violet precipitations outline the hepatic sinusoids. The pigment cells (Pc) view no reaction products. Magn.: 1 200 $\times$ . Bar 1  $\mu$ m.

Pigmentzellen dagegen nicht berührt. Hierbei lagert sich das Reaktionsprodukt lediglich längs des Endothels an (Abb. 5).

Die THIÉRY-Technik (Nachweis von Polysacchariden) dokumentiert, in den Melanosomen von *R. esculenta*, das Vorhandensein von Polysacchariden (Abb. 6). Der schwarze, punktförmige Niederschlag weist dabei eine unterschiedliche Anlagerung auf. Diese ist im Elektronenmikroskop besonders bei höherer Vergrößerung gut sichtbar (Abb. 7). Bisweilen findet man aber auch Granulabereiche, die auf den Nachweis nicht reagiert haben.

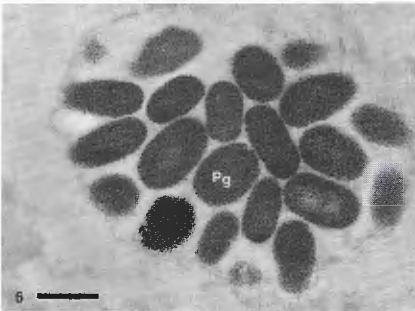


Abb. 6 und 7. Polysaccharidnachweis nach THIÉRY (1967) an der Leber von *Rana esculenta*.

Demonstration of polysaccharids after THIÉRY (1967) on the liver of *Rana esculenta*.

Abb. 6. Pigmentgranula (Pg) zeigen dichte Reaktionsniederschläge. Vergr.: 16 500  $\times$ . Maßstab 1  $\mu$ m.

The pigmentgranules (Pg) show strong darkspotted precipitations. Magn.: 16 500  $\times$ . Bar 1  $\mu$ m.

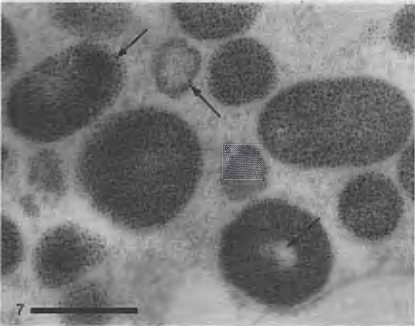


Abb. 7. Bei höherer Vergrößerung erkennt man eine differenzierte, heterogene Anlagerung des Reaktionsproduktes (Pfeile). Vergr.: 60 000  $\times$ . Maßstab 0,5  $\mu$ m.

At higher magnification an heterogenous accumulation of the reaction product is recognizable (arrows). Magn.: 60 000  $\times$ . Bar 0,5  $\mu$ m.

## Diskussion

Die unter dem Begriff Pigmentzellen zusammengefaßten Iridophoren, Xanthophoren und Melanophoren waren auf Grund ihrer weiten Verbreitung im Wirbeltiergewebe bereits Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (weiterführende Literatur s. STORCH & WELSCH 1973, BAGNARA et al. 1979, EPPERLEIN & LÖFBERG 1984, FROST et al. 1984). Demnach können Pigmentzellen entsprechend ihrer Lokalisation wahrscheinlich unterschiedliche Funktionen ausüben. Den in der Amphibienleber vorkommenden Melanophoren spricht man seit längerer Zeit eine gewisse Makrophagenfunktion zu (ZYLBERSZAC 1936, ANDREW 1969, WELSCH & STORCH 1972). Der positive Nachweis saurer Phosphatase bei *R. esculenta* (CICHOCKI & ACKERMANN 1967) sowie bei *X. laevis* und *T. cristatus*

könnte dafür ein Hinweis sein. Auch die zahlreichen heteromorphen Einschlußkörper und das gelegentliche Auftreten eingeschlossener Viren und Bakterien innerhalb der Melanocyten sprechen für eine solche Hypothese.

Hinsichtlich der biochemischen Zusammensetzung von Leberpigmentzellen gelang ANDREW (1969) beim mexikanischen Axolotl der Nachweis für Eisen. Die Untersuchungen von STORCH et al. (1985) mit Hilfe der Microanalyse (EDX) bestätigten diesen Befund auch in der Leber der Gymnophione (*Ichthyophis glutinosus*). Darüber hinaus erfolgte durch diese Arbeitsgruppe der Nachweis unterschiedlicher Zn-, Na- und Cu-Konzentrationen innerhalb der Pigmentgranula. Daß diese Zellorganellen aus einem Konglomerat verschiedener chemischer Substanzen bestehen müssen, wird auch an dem unterschiedlichen Affinitätsverhalten des Polysaccharid-Nachweises erkennbar. Die in den Gefrierbruchpräparaten sichtbare homogene Melanosommembran weist dabei auf eine dichte Einkapselung dieser Substanzen hin.

Die Beobachtungen von ANDREW (1969) und TANAKA et al. (1974) bezüglich einer Zunahme von Leberpigmentzellen bei älteren Amphibien könnte ein weiteres Indiz dafür sein, daß diese Zellen vorwiegend der Aufnahme und Ablagerung von organischen und anorganischen Stoffen dienen.

Ein vermehrtes Auftreten von Melanocyten kann aber auch durch eine besondere Ernährungssituation verursacht werden. So berichtet KREMER (1932) von einem deutlichen Anstieg der Pigmentzellenanzahl nach einer Nahrungspause (zum Beispiel Winterschlaf).

#### Dank

Herrn Prof. Dr. V. STORCH danke ich für stete Förderung. Herr Prof. Dr. K. HAUSMANN ermöglichte die Aufnahmen zur Lichtmikroskopie.

#### Zusammenfassung

Die Leberpigmentzellen (Melanocyten) von *Xenopus laevis*, *Rana esculenta* und *Triturus cristatus* werden unter Anwendung histologischer und histochemischer Techniken licht- und elektronenmikroskopisch untersucht. Hierbei wird in den Pigmentzellen von *X. laevis* und *T. cristatus* das Verdauungsenzym saure Phosphatase lokalisiert, und anhand der Pigmentgranula (Melanosomen) von *R. esculenta* ein Nachweis für Polysaccharide erbracht.

Die Ergebnisse werden hinsichtlich der noch unklaren Funktion amphibischer Leberpigmentzellen diskutiert.

#### Schriften

- ADAM, H. & G. CZIHAK (1964): Arbeitsmethoden der makroskopischen und mikroskopischen Anatomie. — Stuttgart (G. Fischer), 583 S.
- ANDREW, W. (1969): The nature of pigment cells in the liver of *Ambystoma mexicanum* and their changes with age. — J. Cell Biol., New York, 43: Abstracts 7a.
- BAGNARA, J. T., J. MATSUMOTO, W. FERRIS, S. K. FROST, W. A. TURNER, T. T. TCHEN & J. D. TAYLOR (1979): Common origin of pigment cells. — Science, Washington D. C., 203: 410-415.

- BARKA, T. & P. J. ANDERSON (1962): Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler. — J. Histochem. Cytochem., Baltimore, **10**: 741-753.
- CICHOCKI, T. & J. ACKERMANN (1967): Histochemical investigation of the pigment in frog livers. — Fol. Histochem. Cytochem., Vol. 5 (2): 145-150.
- EBERTH, C. J. (1867): Untersuchungen über die normale und pathologische Leber. II. Die Pigmentleber der Frösche und die Melanämie. — Virchows Arch. path. Anat. Physiol., Berlin, **40**: 316-332.
- EPERLEIN, H. H. & J. LÖFBERG (1984): Xanthophores in chromatophore groups of the premigratory neural crest initiate the pigment pattern of the axolotl larva. — W. Roux's Arch. Dev. Biol., Heidelberg, **193**: 357-369.
- FROST, S. K., F. BRIGGS & G. M. MALACINSKI (1984): A color atlas of pigment genes in the mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). — Differentiation, Heidelberg, **26**: 182-188.
- KREMER, J. (1932): Die fortlaufenden Veränderungen der Amphibienleber im Hungerzustande. — Z. mikr.-anat. Forsch., Leipzig, **28**: 81-157.
- LANGER, M. (1979): Histologische Untersuchungen an der Teleosteerleber. II. Das Blutgefäßsystem. — Z. mikr.-anat. Forsch., Leipzig, **93**: 849-875.
- NODA, K., T. NOMAGUCHI & Y. TANAKA (1977): Ultrastructural study on hepatic melanin in *Xenopus laevis*. — Cell Tiss. Res., Berlin, **185**: 331-337.
- PEARSE, A. G. E. (1968): Histochemistry. Theoretical and applied. Vol. 1. Third edition. — London (J. & A. Churchill Ltd.) 998 S.
- SLONIMSKI, P. W. (1940): Die Leber als blutbildendes Organ bei *Ambystoma mexicanum* COPE. — Anat. Anz., Jena, **90**: 64-78.
- SPORNITZ, U. M. (1975): Studies on the liver of *Xenopus laevis*. II. The ultrastructure of the peritoneal cover and the perihepatic layer. — Anat. Embryol., Berlin, **146**: 265-277.
- STORCH, V. & U. WELSCH (1973): Zur Ultrastruktur von Pigmentepithel und Photorezeptoren der Seitenaugen von *Ichthyophis kohtaoensis* (Gymnophiona, Amphibia). — Zool. Jb. Anat., Jena, **90**: 160-173.
- STORCH, V., F. PROSI, K. GORGAS, H. J. HACKER, J. RAFAEL & P. VSIANSKI (1985): The liver of *Ichthyophis glutinosus* LINNÉ, 1758 (Gymnophiona). — Bull. Soc. zool. Fr., Paris, (in press).
- TANAKA, Y., K. NODA, T. NOMAGUCHI & H. YAMAGISHI (1974): Hepatic melanosis and ageing in Amphibia. A preliminary observation on two species of anura *Xenopus laevis* and *Rana nigromaculata*. — Exp. Gerontol., Oxford etc., **9**: 263-268.
- THIÉRY, J. P. (1967): Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. — J. Microsc., Paris, **6**: 987-1018.
- WELSCH, U. & V. STORCH (1972): Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Leber von *Ichthyophis kohtaoensis* (Gymnophiona). — Zool. Jb. Anat., Jena, **89**: 621-635.
- ZYLBERSZAC S. (1936): Sur la nature des cellules pigmentaires dans le foie des Amphibiens. — Arch. int. Med. exp., Liège, **11**: 545-571.

Eingangsdatum: 17. November 1984

Verfasser: Dipl.-Biol. MICHAEL LINNENBACH, Zoologisches Institut I (Morphologie/Ökologie), Im Neuenheimer Feld 230, D-6900 Heidelberg 1.