

chondrien gebundene Stoffwechselprozesse in diesen beiden Fasertypen verschieden ablaufen. Im folgenden wird untersucht, ob die durch Magnesium aktivierte ATPase in Gegenwart von EGTA – welches Kalzium cheliert – bei roten und weissen Fasern durch Azid verschieden gehemmt wird.

Nach von BROCKE und RÜEGG² wird einem Homogenat von Insektenmyofibrillen etwa die Hälfte der totalen Aktivität der Magnesium-aktivierten ATPase durch eine in den Mitochondrien lokalisierten ATPase bestimmt, wenn das System in kalziumfreier Form vorliegt.

Material und Methode. Bei 4–6 Monate alten Wistar-Ratten wurden verschiedene Teile von weissen und roten Muskeln aus der Becken- und Oberschenkelregion präpariert. Zum Vergleich wurden der rote M. soleus und der weisse M. gastrocnemius aus der Unterschenkelmuskulatur verwendet. Alle Präparationen wurden in der Kühlkammer bei $\pm 2^\circ\text{C}$ vorgenommen.

Die Muskelstücke von 0.5–1.0 g wurden in der zehnfachen Menge Borat-Puffer (39 mM $\text{H}_3\text{BO}_3 + 25 \text{ mM KCl}$) mit dem Virtis-Homogenisator während 2 min homogenisiert. Diese Suspension, welche die Proteine der Myofibrillen enthält, wurde innerhalb der nächsten 2 Stunden auf die Aktivität der Mg-ATPase untersucht. Hierzu wurde nochmals zehnmal verdünnt, und es wurden

0,2 bis 0,5 ml für die Messungen der ATPase genommen. Das entspricht 0,2–0,8 mg Protein.

Die Homogenatsproben wurden in eine Lösung pipettiert, welche 2,5 mM MgCl_2 , 0,5 mM EGTA und 25 mM HCl Tris-Puffer enthielt. Vor der Inkubation wurde mit Wasser auf 2,0 ml aufgefüllt³. Von jedem Homogenat wurden 2 Proben mit Zusatz von je 0,1 ml 100 mM Azid und 2 Proben ohne Azid inkubiert. Nach 5 min Inkubation bei 25°C wurde die Reaktion durch Hinzusetzen von 0,1 ml 50 mM ATP gestartet und nach genau 5 min mit 1 ml 25% Trichloressigsäure abgestoppt. Der Zusatz von ATP führt zur Spaltung des ATP, wobei anorganischer Phosphor (P_i) frei wird. Die Hemmung der ATPase-Aktivität durch Azid wurde mit der ATPase-Aktivität der Probe ohne Azid desselben Homogenates verglichen. Es wurde die relative Aktivität der ATPase bestimmt ($\mu\text{g P}_i/\text{ml Homogenat}$ in 5 min bei 25°C). Die Bestimmung des bei der Reaktion freigesetzten Phosphors wurde nach der Methode von FISKE und SUBBAROW⁴ ausgeführt.

Resultate. In der Tabelle sind die untersuchten Muskeln zusammengestellt und ihr Verhalten aufgrund des Azid-Testes angegeben. Dabei zeigt sich, dass die Mg-ATPase der roten Muskeln stark und diejenige der weissen Muskeln nur schwach gehemmt wird. Der Vergleich mit dem typisch weissen M. gastrocnemius und roten M. soleus beweist dies.

Es ist demnach möglich, mit diesem Test weisse und rote Muskelfasern deutlich voneinander zu unterscheiden, auch wenn die präparativ festgestellte Farbe der Muskelfasern unsicher ist⁵.

Hemmung der Mg-ATPase in Muskelhomogenaten durch Azid

Muskelfasern	ATPase ungehemmt (kein Azid)	ATPase gehemmt (10 mM Azid)	Hemmung %	Fasertyp
M. rectus femoris; zentraler Teil	37.0	19.2	48	rot
M. vastus lateralis	40.1	18.9	53	rot
M. vastus intermedius	36.3	15.3	58	rot
M. gluteus max.; zentraler Teil	35.8	16.4	54	rot
M. piriformis	32.6	13.0	60	rot
M. soleus	31.4	14.8	53	rot
M. rectus femoris; peripherer Teil	36.4	31.0	12	weiss
M. vastus medialis	48.0	43.6	9	weiss
M. gluteus max.; peripherer Teil	44.8	40.7	9	weiss
M. gluteus medius	39.3	34.9	11	weiss
M. gastrocnemius	41.5	36.5	12	weiss

Die Aktivität ist ausgedrückt in μg anorganischem Phosphor, freigesetzt pro ml Homogenat in 5 min Inkubation bei 25°C ($\mu\text{g P}_i/\text{ml Homogenat}/5 \text{ min } 25^\circ\text{C}$).

Summary. With a simple test – inhibition of the Mg-activated ATPase in a total homogenate of muscle by azide – it is possible to distinguish clearly between red and white muscle fibres. A number of muscles of the pelvic and thigh region of the rat are investigated by this method.

M. ERMINI

*Institut für experimentelle Gerontologie,
Nonnenweg 7,
Basel (Schweiz), 3. Oktober 1969.*

² H. H. von BROCKE und J. C. RÜEGG, *Helv. physiol. Acta* 23, 79 (1965).

³ EGTA, Äthylen-glykol-bis-(2-aminoäthyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (Fluka, Buchs). HCl-Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Merck) mit HCl auf pH 7,6 eingestellt. P_i , anorganischer Phosphor. Azid, NaN_3 (Fluka, Buchs). ATP, Adenosin-5'-triphosphorsäure (Fluka, Buchs).

⁴ C. FISKE und Y. SUBBAROW, *J. biol. Chem.* 66, 375 (1925).

⁵ Diese Arbeit wurde durch die Roche-Studien-Stiftung ermöglicht, welcher ich hier meinen Dank ausspreche.

Morphometrische Untersuchungen an der Rattenleber - Parenchymzelle nach Anwendung verschiedener Fixationspuffer

Die Einführung morphometrischer Methoden in die Elektronenmikroskopie gestattet es, auf relativ einfache und zeitlich wenig aufwendige Art und Weise zu quantitativen Aussagen über die Volumen- beziehungsweise Membranoberflächenanteile der verschiedenen Zellorganellen zu gelangen. Besonders bei der Erfassung von ultrastrukturellen Veränderungen unter mannigfachen experimentellen Versuchsbedingungen gewinnt die Morphometrie zunehmend an Bedeutung.

Bisher liegt eine Vielzahl von experimentellen Arbeiten über das glatte endoplasmatische Retikulum der Leber unter verschiedenen physiologischen, als auch pathologischen Bedingungen vor¹. Dabei lässt dieses Zellkompartiment eine enge topographische Beziehung sowohl zu den

¹ H. DAVID, *Elektronenmikroskopische Organpathologie* (VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin 1967).

«microbodies», als auch zum Glykogen erkennen. Im Rahmen von Vorversuchen über ultrastrukturelle Veränderungen der Leberzelle unter gezielten Stoffwechsellhemmungen beziehungsweise Stoffwechselsteigerungen schien uns als Grundlage eine vergleichende Analyse der Leberparenchymzelle unter der Einwirkung von Kaliumphosphat- beziehungsweise s-Collidin gepuffertem OsO_4 von besonderer Bedeutung zu sein. Die Anwendung dieser Puffer bei der OsO_4 -Fixation lässt zwei sich in typischer Weise unterscheidende Bilder der Ultrastruktur der Leberzelle erkennen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die durch die verschiedenen Fixationspuffer entstehenden Unterschiede in der volumetrischen Zusammensetzung der Zellorganellen unter besonderer Berücksichtigung des glatten endoplasmatischen Retikulum und des Glykogen zu fassen.

Material und Methode. Zur Anwendung kamen 3 männliche Wistarratten mit einem Gewicht zwischen 230 und 240 g. Diese Ratten wurden aus einem Wurf von insgesamt 6 männlichen Ratten nach strengen Zufallskriterien für die morphometrische Untersuchung ausgewählt. Tötung der 3 Versuchsratten zur selben Tageszeit (9.00 Uhr).

Je 50–60 Gewebestücke des linken Leberlappens von einer Kantenlänge von 1 mm wurden 1) in 1%iger Lösung von OsO_4 in 0,16 molarem Phosphatpuffer (pH 7,4) und 2) in 1%iger Lösung von OsO_4 in 0,067 molarem s-Collidin-puffer (pH 7,4) bei 4°C während 120 Min fixiert und sodann nach kurzer Zwischenwässerung (30 Min) in den entsprechenden Waschpuffern über die aufsteigende Alkoholreihe und Propylenoxyd in Epon 812 eingebettet (pro Versuchsserie 25 Blöcke).

Zur Lokalisation von mittleren Leberläppchenabschnitten wurden alle Blöcke semidick aufgeschnitten. Auf eine Untersuchung verschiedener Läppchenabschnitte wurde bewusst verzichtet, da LOUD² nachweisen konnte, dass die Leberparenchymzellen sich in bezug auf die relative volumenmässige Verteilung ihrer Zellorganellen zu min-

destens 80% homogen verhalten. Die ersten 15 Blöcke mit geeigneter Lokalisation wurden für das elektronenmikroskopische «random sampling» ausgewählt, wobei pro Block nach strengen Zufallskriterien je 2 Aufnahmen bei einer Primärvergrößerung von 5000 hergestellt wurden, welche zusammen mit dem sogenannten Vielzweckraster nach WEIBEL et al.³ nachvergrössert und sodann ausgewertet wurden. Pro Versuchsserie wurden somit insgesamt 90 Abbildungen morphometrisch ausgezählt. Bei der morphometrischen Analyse berücksichtigten wir die folgenden Zellkompartimente: 1) Mitochondrien (Mit); 2) Rauhes endoplasmatisches Retikulum (rER); 3) Glattes endoplasmatisches Retikulum (glER); 4) Glykogenareale (Glyk); 5) Golgifelder (GF); 6) «Microbodies» (MB).

Die Auswertung der «Rasterbilder» erfolgte voneinander unabhängig durch 2 Untersucher. Die statistische Analyse umfasste die Berechnung der Mittelwerte, der Standardabweichungen, der Standardabweichung des Mittelwertes sowie eine einfache Varianzanalyse (Student-t-Test) zur Ermittlung der Signifikanzen.

Ergebnisse. 1) *Ultrastruktur der Leberparenchymzelle.* Nach Fixation mit Phosphat gepuffertem OsO_4 (Figur 1) lässt die Leberparenchymzelle das in typischer Weise zu Rosetten angeordnete, elektronendichte Glykogen erkennen, welches oft weite Zellbezirke erfüllt. In den Randbezirken dieser Glykogenfelder können Anteile des glatten endoplasmatischen Retikulum gefunden werden. Bei Anwendung eines s-Collidin gepufferten OsO_4 -Gemisches (Figur 2)⁴ hingegen erscheint das Glykogen nicht elektronendicht, das heisst weite Zellareale erscheinen elektronenoptisch leer beziehungsweise lediglich von geringer Dichte. Eine subjektive Beurteilung lässt einen höheren

² A. V. LOUD, J. Cell Biol. 37, 27 (1968).

³ E. R. WEIBEL, G. S. KISTLER und W. F. SCHERLE, J. Cell Biol. 30, 23 (1966).

⁴ R. L. WOOD und J. H. LUFT, J. ultrastruct. Res. 12, 22 (1965).

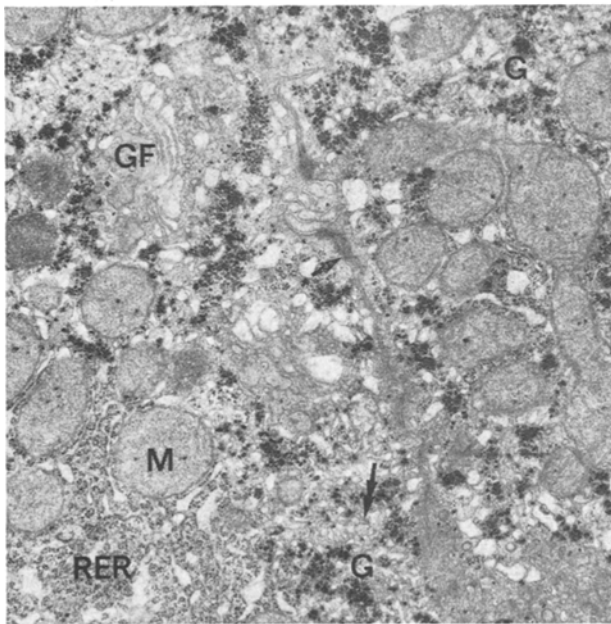


Fig. 1. Rattenleberparenchymzelle nach Fixation mit Phosphat gepuffertem OsO_4 . Die Glykogenpartikel zeigen den für diese Fixation typischen elektronendichten Aspekt. M, Mitochondrium; RER, rauhes endoplasmatisches Retikulum und freie Ribosomen; G, Glykogen; GF, Golgifeld; Pfeil, Zellgrenze mit Desmosomen; Doppel-pfeil, glattes endoplasmatisches Retikulum. $\times 18000$.

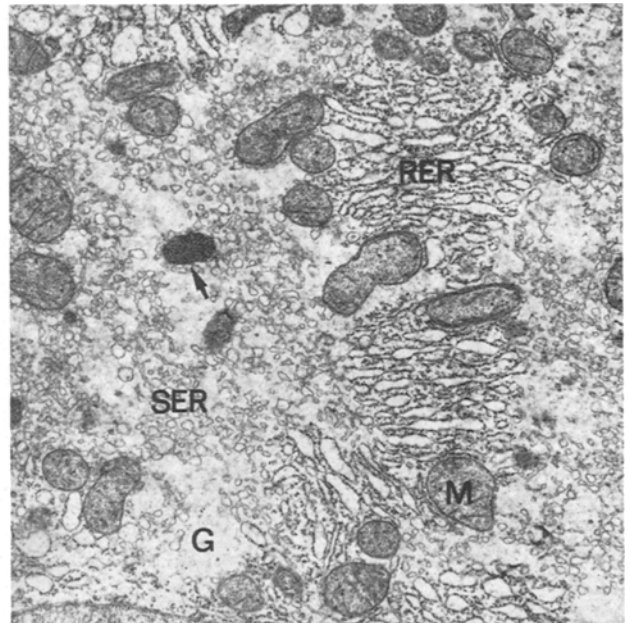


Fig. 2. Rattenleberparenchymzelle nach Fixation mit s-Collidin gepuffertem OsO_4 . Das Glykogen wird dabei herausgelöst; die Glykogenareale erscheinen deshalb nicht elektronendicht. M, Mitochondrium; RER, rauhes endoplasmatisches Retikulum; G, Glykogen; SER, glattes endoplasmatisches Retikulum; Pfeil, «Microbody». $\times 11500$.

Ergebnisse der morphometrischen Auswertung (alle Werte $\leq \pm 5\%$)

Kompartiment	rER	gER	Glyk	gER + Glyk	GF	Mit	MB	Fixationslösung
Volumenanteil in %	28.6	8.2	25.8	34.0	1.4	16.7	0.8	Phosphatpuffer
Volumenanteil in %	30.2	18.2	13.7	31.9	1.6	16.3	0.2	s-Collidinpuffer

rER, rauhes endoplasmatisches Retikulum; gER, glattes endoplasmatisches Retikulum; Glyk, Glykogen; GF, Golgifeld; Mit, Mitochondrien; MB, «Microbodies».

Anteil des glatten endoplasmatischen Retikulum vermuten. Die übrigen Zellorganellen zeigen bei Anwendung der beiden verschiedenen Fixationspuffersysteme keine wesentlichen ultrastrukturellen Abweichungen.

2) *Morphometrische Ergebnisse.* (Tabelle I, Figuren 3 und 4). Die relativen Volumenanteile der Mitochondrien, des rauhen endoplasmatischen Retikulum, des Golgifeldes und der «microbodies» lassen bei Anwendung der verschiedenen Fixationspuffer keine signifikanten Unterschiede erkennen. Besonders auffallend erscheint die Tatsache, dass die relativen Volumenanteile nur um wenige Prozente differieren. Nach Fixation in Phosphat gepuffertem OsO_4 dagegen findet sich ein deutlich vermehrter relativer Volumenanteil der Glykogenareale, während bei Anwendung von s-Collidin gepuffertem OsO_4 der relative Volumenanteil des glatten endoplasmatischen Retikulum mehr als verdoppelt ist (Vertrauensgrenze: $p < 0,01$). Die Summe der relativen Volumenanteile der Glykogenfelder und des glatten endoplasmatischen Retikulum hingegen lässt nach Anwendung beider Fixationspuffer eine auffallende Konstanz erkennen.

Diskussion. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen deutliche Unterschiede in der relativen Volumenzusammensetzung der Glykogenareale und des glatten endoplasmatischen Retikulum nach Fixation in s-Collidin be-

ziehungsweise Phosphat gepuffertem OsO_4 . Bei Anwendung von s-Collidinpuffer findet sich ein mehr als doppelt so grosser relativer Volumenanteil des glatten endoplasmatischen Retikulum, während der relative Volumenanteil der Glykogenbezirke herabgesetzt ist. Reziprok dagegen verhalten sich die entsprechenden Werte nach Phosphat- OsO_4 -Fixation. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Summe der relativen Volumenanteile des glatten endoplasmatischen Retikulum und des Glykogen nach Fixation mit den beiden OsO_4 -Puffergemischen keine signifikanten Unterschiede erkennen lassen, zeigen die Ergebnisse deutlich, dass bei OsO_4 -Phosphat-Fixation wesentliche Anteile des glatten endoplasmatischen Retikulum durch elektronendichte Glykogenfelder maskiert werden.

Von zahlreichen Autoren wird immer wieder auf das umgekehrt proportionale Verhalten der Glykogenareale und des glatten endoplasmatischen Retikulum hingewiesen⁵⁻⁷. Die vorliegenden Befunde zeigen, dass bei Anwendung eines Phosphatpuffers dieser «Maskierung» des glatten endoplasmatischen Retikulum durch das elektronendichte Glykogen Rechnung getragen werden muss. Unter diesen Fixationsbedingungen kann eine Abnahme des Glykogengehaltes, das heisst eine Verminderung der Glykogenbezirke, unter Umständen eine scheinbare Vermehrung des glatten endoplasmatischen Retikulum, und somit ein umgekehrt proportionales Verhalten dieser beiden Zellkompartimente vortäuschen. Jedenfalls erscheinen bei experimentellen Analysen über Veränderungen des glatten endoplasmatischen Retikulum in jedem Falle vergleichende Untersuchungen mit verschiedenen Fixationspuffersystemen angezeigt.

Summary. The effect of 2 fixatives, (1) s-Collidin buffered OsO_4 , (2) phosphate buffered OsO_4 , on the liver cell was studied by morphometric analysis. After fixation with solution 2, large areas of smooth endoplasmic reticulum were covered by electron-opaque deposits of glycogen. No such masking was noticed by using solution 1. Other cell organelles showed no significant differences in their relative volumes. By using fixative solution 2, decrease in glycogen can simulate relative volume increase of the smooth endoplasmic reticulum.

F. STOCKMANN⁸, L. BIANCHI,
H. P. ROHR und H. ECKERT

Pathologisches Institut der Universität Basel
und Biochemische Laboratorien der Sandoz AG,
CH-4000 Basel (Schweiz), 15. Oktober 1969.

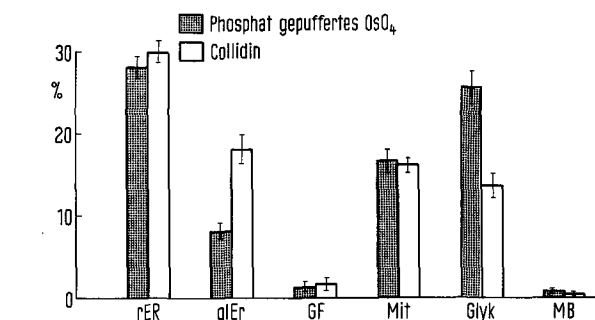


Fig. 3. Graphische Darstellung der relativen Volumenanteile der einzelnen Zellorganellen nach Anwendung der beiden Fixationsmedien.

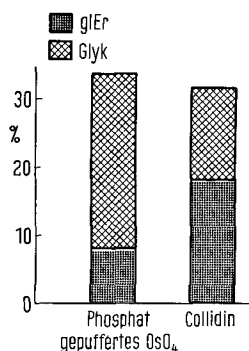


Fig. 4. Die relativen Volumenanteile von Glykogen und glatten endoplasmatischem Retikulum ergeben zusammen nach Anwendung beider Fixationsmedien die gleichen Werte.

⁵ A.-M. JEZEQUEL, K. ARAKAWA und J. W. STEINER, Lab. Invest. 14, 1894 (1965).

⁶ U. B. PETERS, H. M. DEMBITZER, G. W. KELLY und E. BARUCH, in Fifth Int. Congr. for Electron Microscopy (Ed. S. S. BRESE JR.; Academic Press Inc., New York 1962), Vol. 2, p. TT-7.

⁷ K. R. PORTER und C. BRUNI, Cancer Res. 19, 997 (1959).

⁸ Wesentliche Teile der vorliegenden Arbeit wurden von Frl. F. STOCKMANN der Medizinischen Fakultät der Universität Basel als Inaugural-Dissertation vorgelegt.