

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Münster i. Westf.
(Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. H. SIEGMUND).

**Cytologische Veränderungen
im Vorderlappen der Meerschweinchenhypophyse
nach Belastungen durch Diphtherietoxin oder Pyrifer.**

Von
H. KIEF.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 18. Dezember 1952.)

Am Hypophysenvorderlappen (HVL) des *Meerschweinchens* sind morphologisch verschiedene Zelltypen differenziert worden. Man unterscheidet an ihm, wie an der menschlichen Hypophyse, chromophile und chromophobe Zellen. Die chromophilen eosinophilen Zellen stehen zahlenmäßig an erster Stelle (ABRAMOW, CHADWICK, FRANCK, KRIK-MANN, RODRIGUEZ und VANDERBURGH). Zwischen ihnen soll nur eine geringe Anzahl von chromophoben Zellen (Hauptzellen) eingestreut sein. Über das Vorkommen basophiler Zellen in der Meerschweinchenhypophyse (MH) liegen unterschiedliche Angaben vor. Von manchen werden solche Zellen negiert (ABRAMOW, RODRIGUEZ), andere wiederum haben echte basophil granulierte Vorderlappenzellen beschrieben (CHADWICK, FRANCK, KIRKMAN und VANDERBURGH). Nach ROMEIS sind typische, sich mit Kresofuchsin färbende β -Zellen beim Meerschweinchen ziemlich selten. Die chromophoben Zellen hat CHADWICK hauptsächlich nach der verschiedenen Größe ihres Zellkernes in 3 Typen unterteilt.

An formolfixierten Schnitten der MH, die nach der von BERBLINGER und BURGDORF angegebenen Methode gefärbt wurden, lassen sich im Vorderlappen praktisch keine Zellen auffinden, deren Protoplasma sich mit Anilinblau anfärbt. Das Zellplasma nimmt bei dieser Färbemethode, abgesehen von den chromophoben Zellen, einen in der Stärke wechselnden Orangefarbtönen an. Erst bei verlängerter Färbedauer sieht man einzelne Zellen, die diesen Farbstoff aufnehmen. Die Abhängigkeit des Färbefeffektes von der Einwirkungsdauer des Farbgemisches ist in der von FARKAS modifizierten Mallory-Färbung noch deutlicher ausgeprägt. Führt man dagegen die Färbung nach BERBLINGER-BURGDORF am alkoholfixierten Material durch, so kommt eine Plasmafärbung aller chromophilen Zellen mit Anilinblau zustande. Dieser wechselnde Ausfall der Färbung läßt bereits erkennen, daß die Unterscheidung in eosinophile und basophile Zellen in der MH, die vorwiegend auf Färbungen beruht, die Anilinblau als Farbkomponente enthalten, sehr stark von

der angewandten Technik abhängig ist. Auf Grund solcher Färbeverfahren lassen sich deshalb kaum derartige Schlüsse ziehen, wie sie mit der Bezeichnung „eosinophil“ und „basophil“ zum Ausdruck gebracht werden. Aus diesen Gründen und wegen der Tatsache (auf die wir später noch eingehen werden), daß in allen chromophilen Zellen echte basophile Substanzen enthalten sind, möchten wir einer strengen Trennung von eosinophilen und basophilen Zellen in der MH keine besondere Bedeutung beimessen (Abb. 1). Um jedoch verständlich zu

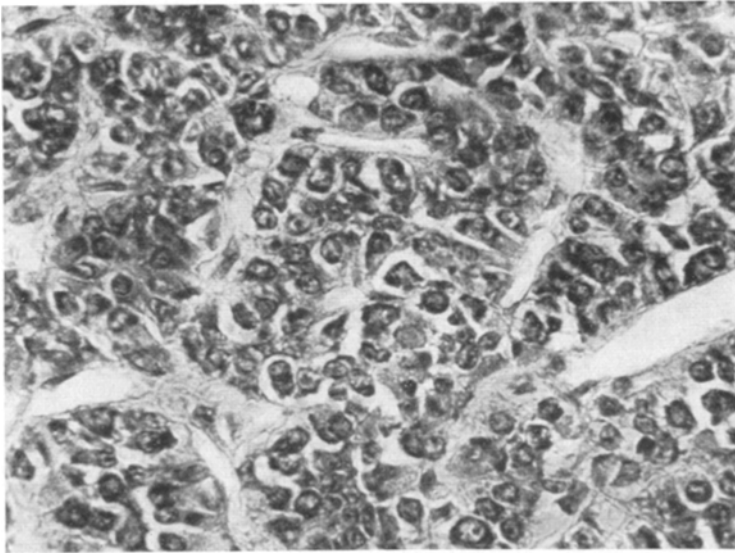


Abb. 1. Hypophysenvorderlappen eines unbehandelten Meerschweinchens.
(Methylgrün-Pyronin.)

sein, ist es erforderlich, unseren Ausführungen ein bestimmtes Einteilungsprinzip zugrunde zu legen. Wir wollen die Zellen nach *gestaltlichen* Gesichtspunkten auseinanderhalten, den färberischen Eigentümlichkeiten aber keine wesentliche Beachtung schenken. Als Hauptkriterien der Einteilung haben sich nach unseren Untersuchungen die mikro-morphologischen Strukturen des Zellkernes und die Anfärbbarkeit bzw. die Nichtanfärbbarkeit des Cytoplasmas erwiesen. Nach diesen Gesichtspunkten lassen sich im HVL des Meerschweinchens 3 verschiedene Zellarten auffinden, und zwar chromophile Zellen, die einen relativ locker strukturierten Zellkern haben, in dem sich 3—4 Nucleolen befinden. Diese Zellen machen das Hauptkontingent sämtlicher Vorderlappenzellen aus. Weiter ein Zelltyp, der neben einem gleichmäßig stark chromophilen Zellplasma einen kompakten, chromatinreichen Zellkern aufweist. Diese Zellen liegen vorwiegend in den seitlichen Randpartien des HVL. Im Zentrum des Vorderlappens sind sie bei den

meisten Tieren nicht vorhanden. Den dritten morphologisch charakterisierten Zelltyp bilden die in ihrer Kerngröße variierenden chromophoben Zellen.

Setzt man Meerschweinchen Belastungen (sog. „Stress“) aus und untersucht die Hypophysen dieser Tiere in bestimmten zeitlichen Abständen nach der Reizeinwirkung, so lassen sich auffällige Veränderungen an vielen derjenigen Zellen nachweisen, die wir als ersten Zelltyp bezeichnet haben. Beim unbehandelten Tier sind diese Zellen im mittleren Anteil des Vorderlappens mit wenigen Chromophoben untermengt; nur in den peripher gelegenen Regionen wird die an zweiter Stelle genannte Zellart reichlicher zwischen ihnen beobachtet. Zur Anregung der adrenocorticotropes Hormon (ACTH) produzierenden Vorderlappenzellen haben wir Diphtherietoxin und Pyrifer benutzt. Vom Diphtherietoxin ist diese Wirkungsweise hinreichend bekannt. Hinsichtlich des Pyrifers haben PFEFFER und STAUDINGER nach Injektionen dieses Mittels beim Menschen eine vermehrte Ausscheidung von 11-Oxycorticoiden im Urin nachweisen können. PFEFFER und STAUDINGER glauben daher, daß die Wirkungsweise des Pyrifers wenigstens im Anfangsstadium der Wirkung von ACTH entspricht. Die erhöhte Ausscheidung der 11-Oxycorticoide wird von ihnen als Zeichen der Aktivierung des Hypophysenvorderlappen-Nebennierenrinden-Systems (HVL-NNR-Systems) angesehen.

In den Hypophysen von Meerschweinchen, die 4 Std nach 500 subcutan injizierten Einheiten Pyrifer getötet worden sind, lassen sich charakteristische und in Kontrollversuchen reproduzierbare Zellveränderungen auffinden. Diese Veränderungen betreffen sowohl den Zellkern wie auch das Cytoplasma der genannten Zellen (Abb. 2). Die Zellkerne der reagierenden Zellen werden gegenüber denen unbehandelter Tiere größer. Ihre Nucleolen vergrößern sich ebenfalls, sie werden plumper und bekommen eine stärkere Affinität zum Hämatoxylin. In einem noch weiter fortgeschrittenen Stadium sind sie aus dem Kerninnenraum verschwunden und haben sich der Kernmembran angelagert. Der Zellkern erscheint dann bläschenförmig aufgetrieben mit einer stellenweise hyperchromatischen Kernmembran. Die umschriebene Hyperchromasie ist durch die anscheinende Verschmelzung von Nucleolarsubstanz mit der Kernmembran bedingt. Zwischen den hyperchromatischen Kernwandbezirken ist die Kernmembran in kleineren Abschnitten färberisch manchmal nur undeutlich darstellbar. Eine völlige Auflösung der Kernmembran und eine Ausstoßung von Nucleolarsubstanz in das Cytoplasma, wie dies von ALTMANN und MENY an exokrinen Pankreaszellen beschrieben worden ist, haben wir an unseren Präparaten nicht finden können. Gleichlaufend mit der Strukturänderung des Zellkernes verliert das Protoplasma mehr und mehr die Fähigkeit, Farbstoffe aufzunehmen. Wenn die Nucleolen der Kernmembran anliegen, ist der Zelleib

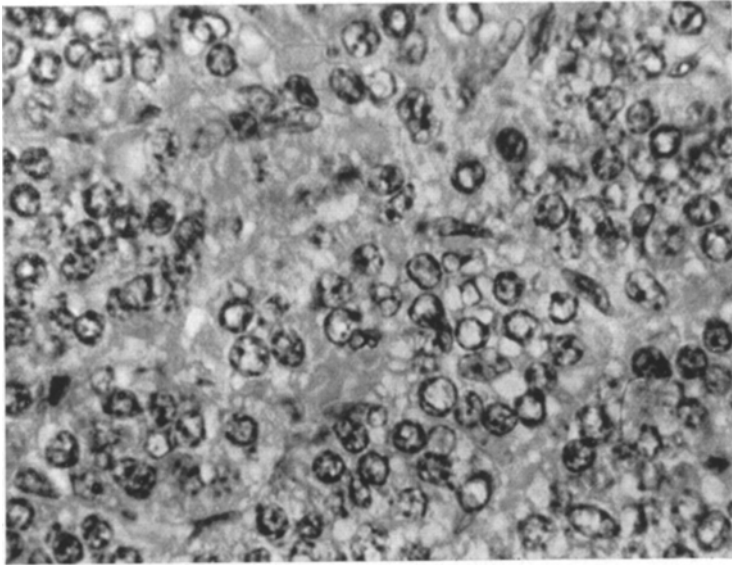


Abb. 2. Zentrum des Hypophysenvorderlappens 4 Std nach 500 E Pyrufer.
(Hämatoxylin-Eosin.)

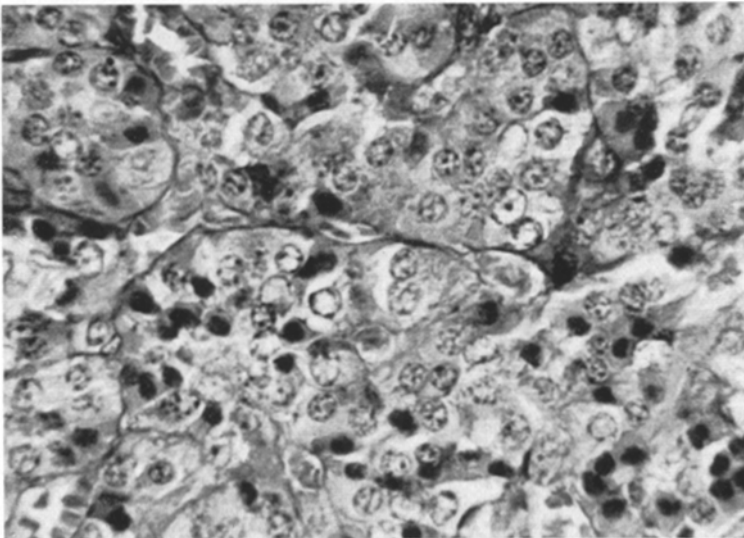


Abb. 3. Peripher gelegener Vorderlappenbezirk 4 Std nach 500 E Pyrufer.
(BERBLINGER-BURGDORF.)

vollkommen chromophob. Dieser Vorgang läßt sich besonders eindrucksvoll an Färbungen zeigen, bei denen neben der Anfärbung des Kernes eine

gute Plasmafärbung erzielt wird (Abb. 3). Hierfür ist nach unserer Erfahrung die Methode von BERBLINGER-BURGDORF sehr geeignet. In der beigefügten Abbildung, die aus einem peripheren Bezirk des Vorderlappens der MH aufgenommen ist, sind die beschriebenen Umgestaltungen der gesamten Zelle erkennbar. Es läßt sich hieran gleichzeitig sichtbar machen, daß die Zellen mit dem kompakten chromatinreichen Zellkern (Typ 2 unserer Einteilung) auf Pyrifer- oder Diphtherietoxinjektionen niemals verändert werden.

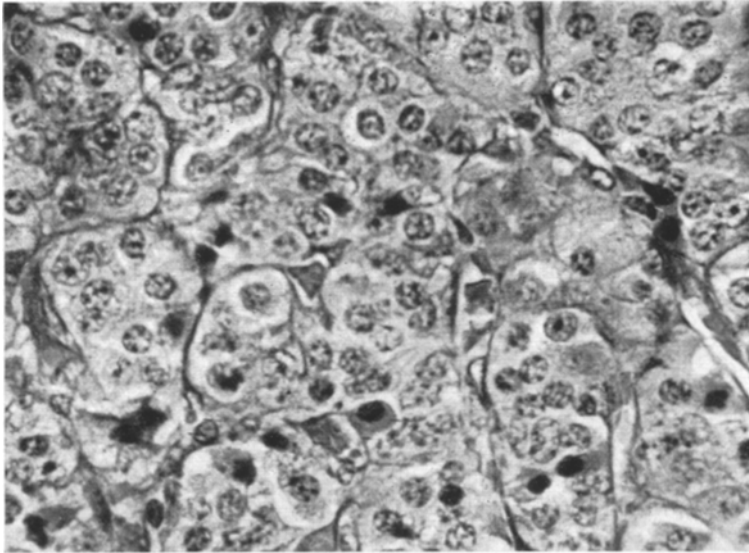


Abb. 4. Hypophysenvorderlappen des Meerschweinchens 24 Std nach Pyrifer.
(BERBLINGER-BURGDORF.)

In Präparaten von Tieren, die 24 Std nach der Verabfolgung der gleichen Menge Pyrifer getötet wurden, sind diese Zellkernveränderungen nicht mehr auffindbar. Die Kerne sind zu diesem Zeitpunkt im allgemeinen noch etwas größer als die der gleichen Zellart unbehandelter Tiere. An der Kernstruktur selbst sind jedoch keine Abweichungen von der Norm festzustellen. Im Gegensatz zu unbehandelten Tieren findet man in solchen Schnitten sehr reichlich Zellen mit einem chromophoben Plasma. Diese Zellen mit meistens etwas vergrößerten Zellkernen, einer Chromophobie des Zellplasmas und einer gut erkennbaren Zellgrenze werden dann auch häufig in den Randpartien des HVL gefunden, in einer Gegend, in der sich beim nichtbehandelten Tier nur ganz selten chromophobe Zellen nachweisen lassen (Abb. 4). Gewisse Vorderlappenzellen machen demnach in einer Stress-Phase einen Formwandel durch, der in der aufgezeigten Weise am Zellkern und am Cytoplasma zum

Ausdruck kommt. Aus ursprünglich chromophilen Zellen werden chromophobe Zellen, die sich wiederum in chromophile Zellen umwandeln.

Untersucht man den HVL von Tieren, die 24 Std nach einer 25fachen d. l. m. Diphtherietoxin für Meerschweinchen getötet worden sind, so findet man im Prinzip die gleichen Veränderungen. Im Zentrum des Vorderlappens liegen auffallend große, bläschenförmige Zellkerne, deren Nucleolen ebenfalls der Kernmembran angelagert sind (Abb. 5). Die Kerne sind zum Teil wesentlich größer, als sie 4 Std nach Pyrifer ge-

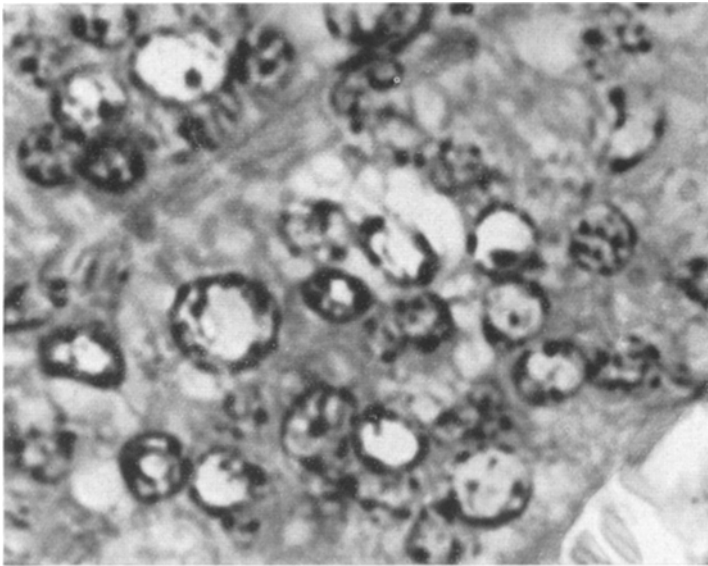


Abb. 5. Zentrum des Vorderlappens der Meerschweinchenhypophyse 24 Std nach Diphtherietoxin. (Hämatoxylin-Eosin.)

funden werden. Neben diesen grotesk aussehenden Zellkernen erkennt man viele andere mit vergrößerten und distinkt gefärbten Nucleolen, und wenige, die auf den Reiz reaktionslos geblieben sind. Im ganzen sind die morphologischen Zustandsbilder der Zellkerne 24 Std nach Diphtherietoxin unterschiedlicher als 4 Std nach Pyrifer. Hierfür scheint die Art des Reizes ein wichtiges mitwirkendes Moment zu sein. Die verabreichte Menge Diphtherietoxin bewirkt eine Dauerbelastung des HVL-NNR-Systems, dagegen kommt die Pyriferwirkung beim Meerschweinchen relativ rasch zum Abklingen.

Sowohl die Pyriferversuche wie die Versuche mit Diphtherietoxin haben ergeben, daß nicht alle Zellen des morphologisch gleichen Zelltyps auf den gesetzten Reiz reagieren. Dabei haben sich noch regionäre Unterschiede feststellen lassen. Während man im Zentrum des Vorderlappens ganze Alveolen findet, deren Zellen den aufgezeigten Form-

wandel durchmachen, lassen sich daneben und in den Randpartien zahlreiche Zellen der gleichen Zellart nachweisen, die nach Pyrifor oder Diphtherietoxin nicht verändert werden. Diese Unterschiedlichkeit der Reaktion kann durch verschiedene Umstände bedingt sein. Einmal wäre herauszufinden, ob tatsächlich alle diese Zellen dem corticotropen System angehören. Nach unseren Ergebnissen muß man die Zellen des 1. Zelltyps als Analogon der basophilen Zellen der menschlichen Hypophyse auffassen. In diese wird nach der heutigen Anschauung die Bildung des corticotropen wie auch des gonadotropen Hormons verlegt. Entsprechend der Reaktionsfähigkeit wäre es daher möglich, daß die unverändert gebliebenen Zellen dieses Zelltyps zum Teil einem anderen Funktionskreis zugeordnet sind. Andererseits ist es sicher, daß der Arbeitsrhythmus der Vorderlappenzellen asynchron verläuft. Die asynchrone Arbeitsweise sekretorischer Zellen kann durch starke Reize allein nicht durchbrochen werden. Es läßt sich deshalb auf Grund unserer Untersuchungen nichts darüber aussagen, ob bestimmte nichtreagierende Zellen Gonadotropinbildner sind, oder Zellen, die infolge ihrer für den Organismus zweckmäßig eingerichteten zeitlich differierenden Sekretionsleistung areaktiv bleiben.

Der Formwandel dieser HVL-Zellen steht den bisherigen Versuchsergebnissen zufolge zweifellos im Zusammenhang mit der Hormonproduktion. Es fragt sich nur, welche cellulären Umsetzungen diesen Funktionsformwechsel hervorrufen. Da das ACTH seiner chemischen Konstitution nach ein Eiweißhormon ist, läßt sich vermuten, daß die Ribosenucleinsäure (RNS) als sehr wichtige Substanz bei der Sekretbereitung beteiligt ist.

Nach CASPERSSON sind die Vorgänge, die sich am Zellkern abspielen an hochorganisierte Strukturen von Eiweißkörpern verschiedenen Charakters und an Nucleinsäuren gebunden. Die beiden Strukturelemente des Zellkernes, das Euchromatin und das Heterochromatin sind nach ihm von zentraler Bedeutung für jegliche biologische Eiweißsynthese in der Zelle. Dabei steht die Nucleinsäurekomponente der Kernstrukturen im Mittelpunkt der Eiweißproduktion. Die Nucleinsäuren des Kernes weisen überwiegend den Ribosotyp auf, außer im Spezialfall der Gene, die Desoxyribosenucleinsäure (DNS) oder Thymonucleinsäure enthalten. Der Zellkern stellt demnach das wichtigste Zentrum für den Eiweißumsatz der Zelle dar. Der Eiweißstoffwechsel selbst ist an die Gegenwart von Nucleinsäuren gebunden. Die Beziehungen zwischen Heterochromatin und Cytoplasm nucleinsäuren hat CASPERSSON bei der *Drosophila* nachgewiesen. Hierbei erwies sich die Menge der Nucleinsäuren im Cytoplasma des Eies von der Heterochromatinmenge beeinflusst. In enger Nachbarschaft des heterochromatischen Chromozentrums fand CASPERSSON den Nucleolus gelegen, der vorwiegend aus Histoneiweiß und RNS aufgebaut ist, und dessen wechselnder Gehalt an diesen Substanzen in verschiedenen Funktionsphasen der Zelle einen Einfluß auf die ribonucleinsäurehaltigen Cytoplasm eiweißkörper ausübt. Ein großer Nucleolus bei hoher Nucleinsäurekonzentration des Cytoplasmas weist darauf hin, daß sich die Zelle im Stadium einer starken Eiweißproduktion befindet.

Zur Unterscheidung der beiden Nucleinsäuretypen wurde von BRACHET die Methylgrün-Pyroninfärbung benutzt. Die Spezifität dieser Färbung konnte BRACHET an Hand eines Fermenttestes zeigen. Mit dem UNNASchen Farbgemisch färbt sich die RNS rot, während die DNS grün angefärbt wird. Führt man an alkoholfixierten Hypophysenschnitten unbehandelter Meerschweinchen eine Färbung mit Methylgrün-Pyronin durch, so stellt man fest, daß im Protoplasma aller chromophilen Vorderlappenzellen reichlich RNS enthalten ist (vgl. Abb. 1). Das Cytoplasma dieser Zellen ist mit Pyronin durchweg kräftig rot gefärbt. Es finden sich also in allen diesen Zellen echte basophile Substanzen. Daß es sich hierbei wirklich um RNS handelt, läßt sich nachweisen. Bringt man die Schnitte vor der Färbung in eine verdünnte Ribonucleaselösung, so kommt hinterher eine Rotfärbung des Cytoplasmas mit Pyronin nicht mehr zustande. In solchen Präparaten sind dann lediglich die nackten Zellkerne sichtbar. In Kontrollversuchen, bei denen die Schnitte anstatt in Ribonuclease unter gleichen Bedingungen in destilliertes Wasser oder in Desoxyribonuclease eingebracht wurden, tritt die Farbreaktion der RNS mit Pyronin praktisch unverändert auf. Werden alkoholfixierte Schnitte, in denen die RNS zuvor mit Ribonuclease depolymerisiert worden ist und danach färberisch mit Pyronin nicht mehr nachgewiesen werden kann, nach BERBLINGER-BURGDOFF gefärbt, so tönen sich die chromophilen Vorderlappenzellen trotzdem mit Anilinblau. Diese Feststellung entspricht den Angaben KURNICKS, daß Triphenylmethanfarbstoffe mit 3 Aminogruppen mit den höher polymerisierten Nucleinsäuren nicht spezifisch reagieren. Für die spezifische Anfärbbarkeit werden von VERCAUTEREN stereochemische Faktoren in der Molekularstruktur der Nucleinsäuren, wie in der Struktur der basischen Farbstoffe in Betracht gezogen. Nach der Ansicht von VERCAUTEREN ist z. B. der für die hohe Affinität der DNS zu Methylgrün verantwortliche stereochemische Faktor in dem Vorhandensein zweier negativ geladener Phosphorsäurereste gelegen, deren Abstand mit dem zwischen zwei positiven Ladungen am Methylgrünmolekül übereinstimmt. Nach unseren Ergebnissen gestattet die wechselnde Färbbarkeit des Plasmas mit Fuchsin oder mit Anilinblau keine Angaben über dessen Gehalt an RNS. Sie scheint von anderen Faktoren abhängig zu sein, deren Grundlagen bis jetzt nicht geklärt sind.

Färbt man Hypophysenschnitte pyrufer- oder diphtherietoxinbehandelter Meerschweinchen unter Einhaltung der gleichen Gegebenheiten mit Pyronin, wie sie zuvor bei der Herstellung der Präparate unbehandelter Tiere zur Anwendung kamen, so findet man, daß die Chromophilie des Cytoplasmas der Vorderlappenzellen ganz allgemein Parallelen zur Intensität seiner Pyroninfärbbarkeit aufweist. Im Ablauf des cyclischen Funktionsformwechsels der Zellen, wenn die Affinität des Zell-

plasmas zu sonstigen Farbstoffen geringer wird, nimmt auch die färbereich nachweisbare Menge an RNS ab (Abb. 6). In den Zellen, die diese auffälligen Kernveränderungen erkennen lassen, läßt sich histochemisch keine RNS mehr nachweisen. In der Restitutionsphase sind die Verhältnisse umgekehrt. Bei allmählich wieder zunehmender Färbbarkeit des Zelleibes wird die mit Pyronin nachweisbare RNS-Menge langsam ansteigend gefunden.

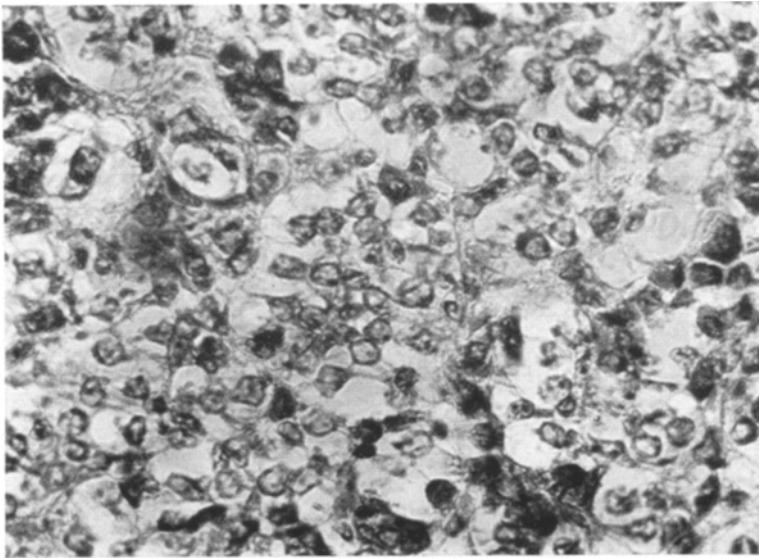


Abb. 6. Hypophysenvorderlappen 24 Std nach Diphtherietoxin. (Methylgrün-Pyronin.)

Nach diesen Versuchen glauben wir sagen zu können, daß die Sekretion von corticotropem Hormon mit morphologischen Umgestaltungen bestimmt charakterisierter Vorderlappenzellen einhergeht. Während der sekretorischen Tätigkeit treten Veränderungen der Struktur der Zellkerne auf, die synchron mit einer Abnahme bzw. im Erholungsstadium mit einer Zunahme der histochemisch nachweisbaren RNS des Cytoplasmas verlaufen. Der Aufbrauch der Vorderlappenzellen an RNS bei ihrer Sekretionsleistung ist dabei mitverantwortlich für die in diesem Cyclus entstehende und wieder verschwindende Chromophobie der Zellen. Die chromophobe Zelle des HVL ist demnach wohl ein morphologischer, aber kein eigener funktioneller Zelltyp. Sie ist ein Übergangsstadium, das die Restitution einleitet. Nach erfolgter Abgabe ihres spezifischen Sekretionsproduktes sind die Zellen voll restitutionsfähig. Auch die durch Diphtherietoxin oder Pyrifor provozierte, stark gesteigerte sekretorische Leistung ACTH-produzierender Zellen hat keinen Zelluntergang zur Folge.

Zusammenfassung.

Experimentelle Untersuchungen haben ergeben, daß die übliche Einteilung der HVL-Zellen des Meerschweinchens in eosinophile, basophile und chromophobe Zellen einer kritischen Betrachtungsweise in methodischer und funktioneller Hinsicht nicht ganz gerecht wird. Darum ist zunächst ein Einteilungsprinzip gegeben worden, das die verfänglichen und in ihren Grundlagen ungeklärten färberischen Eigentümlichkeiten der Vorderlappenzellen weitgehend außer acht läßt. Durch Diphtherietoxin oder Pyrifer kommt es zu Veränderungen an vielen HVL-Zellen, die einer gestaltlich gut charakterisierbaren Zellart angehören. Diese sind so beschaffen, daß eine Vergrößerung und ein Strukturwandel des Zellkernes mit einer Herabsetzung der Färbbarkeit des Cytoplasmas bis zur völligen Chromophobie verbunden ist. Von diesem Zustand aus erfährt die Zelle rückläufige Umgestaltungen, die wieder bei der intakten chromophilen Zelle endigen. Diese cyclisch ablaufenden Gestaltsänderungen von Vorderlappenzellen sind nach den Versuchsergebnissen als morphologisches Äquivalent cellulärer Leistungen aufzufassen. Eine wesentliche Teilursache für das Zustandekommen bestimmter cytologischer Zustandsbilder ist der histochemisch faßbare Gehalt an Cytoplasmamucleinsäuren, der sich je nach dem Funktionszustand der einzelnen Zelle unterschiedlich verhält.

Literatur.

ABRAMOW, S.: Virchows Arch. **214**, 408 (1937). — ALTMANN, H. W., u. R. MENY: Naturwiss. **39**, 138 (1952). — BRACHET: Arch. de Biol. **53**, 207 (1942). — CASPERSSON, T.: Z. wiss. Mikrosk. **53**, 403 (1936). — Naturwiss. **28**, 514 (1940); **29**, 33 (1941). — Skand. Arch. Physiol. (Berl. u. Lpz.) **73**, Suppl. 8 (1936). — Chromosoma (Heidelberg) **1**, 562 (1940); **2**, 111, 132 (1941). — Cell Growth and Cell Function. New York: W. W. Norton 1950 (Zusammenfassende Darstellung). — CHADWICK, C. S.: Amer. J. Anat. **60**, 129 (1936). — FARKAS, K.: Virchows Arch. **305**, 609 (1940). — FRANCK, S.: C. r. Soc. Biol. Paris **119**, 411 (1935); **125**, 569 (1937). — KIRKMANN, H.: Amer. J. Anat. **61**, 233 (1937). — KURNICK: Zit. nach W. SANDRITTER, Frankf. Z. Path. **63**, 423 (1952). — PFEFFER, K. H., u. HJ. STAUDINGER: Klin. Wschr. **1951**, 325; **1952**, 257. — RODRIGUEZ, H.: Endokrinol. **19**, 151 (1937). — ROMEIS, B.: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Bd. 6/3. Berlin: Springer 1940. — VANDERBURGH, C. M.: Anat. Rec. **12**, 95 (1917). — VERCAUTEREN, R.: Enzymologia **14**, 134 (1950).

Dr. H. KIEF, Münster i. Westfalen,
Pathologisches Institut der Universität, Westring 17.