

## Veränderungen an den C-Zellen der Rattenschilddrüse bei Hyper- und Hypocalciämie\*

Histochemische, elektronenoptische und autoradiographische Befunde

H. LIETZ, H.-U. SCHMÄHLING und H. ZIPPEL

Pathologisches Institut der Universität Hamburg  
(Direktor: Prof. Dr. med. G. Seifert)

Eingegangen am 12. September 1969

### *Changes in the C-Cells of the Rat Thyroid in Hyper- and Hypocalcemia Histochemical, Electron-microscopic and Radioautographic Results*

**Summary.** Morphologic changes of the C-cells of 148 Wistar-rats were investigated by histochemical, cytophotometric and autoradiographic methods, and by electron microscopy. We studied normal animals aged 8 weeks to 2 years, acute or chronic hyper/hypocalcemic animals and animals fed with high/low calcium diet.

Spectrophotometric measurements in vitro with purified porcine calcitonin favour the assumption that PFA-PIC-staining makes possible the quantitative demonstration of calcitonin in the C-cells. On comparing the different experimental groups of animals a reduction of calcitonin content in C-cells was found in hypercalcemic animals. Increasing degranulation, seen by electron microscopy, corresponded with this finding. The calcitonin content was augmented in chronic hypocalcemic animals (because of parathyroidectomy). Bigger granules and lysosomes (Autophagolysosomes) were found electron optically. The number of C-cells increased in aged Wistar-rats until the appearance of C-cell-adenomas. The mitotic activity of C-cells found by <sup>3</sup>H-thymidin-autoradiography did not correspond with the level of serum calcium. The mitotic activity was intensified in animals fed with a low calcium diet; it diminished in chronic hypercalcemia. These findings are discussed concerning the regulation of calcium homeostasis.

**Zusammenfassung.** Bei insgesamt 148 Wistar-Ratten wurden die morphologischen Veränderungen der C-Zellen mit histochemischen, cytophotometrischen, elektronenmikroskopischen und autoradiographischen Methoden beurteilt. Untersucht wurden normale Tiere im Alter von 8 Wochen bis 2 Jahren und Tiere mit akuter oder chronischer Hyper- und Hypocalciämie sowie nach calciumreicher und calciumarmer Diät.

Aufgrund spektrophotometrischer Messungen mit gereinigtem Schweinecalcitonin in vitro wurde die Perameisensäure-Pseudoisocyanin (PFA-PIC)-Färbung als histochemisch quantitativer Calcitoninnachweis in C-Zellen angesehen. Der Vergleich der Versuchsgruppen ergab bei hypercalciämischen Tieren eine zunehmende Verminderung des Calcitoningehaltes der C-Zellen. Dem entsprach elektronenmikroskopisch eine zunehmende Entgranulierung. Bei chronischer Hypocalciämie (nach Parathyreoidektomie) war der Calcitoningehalt erhöht. Elektronenmikroskopisch wurden größere Granula und außerdem lysosomale Körper (Autophagolysosomen) beobachtet. Die Anzahl der C-Zellen nimmt bei der Wistar-Ratte mit dem Lebensalter bis zum Auftreten von C-Zelladenomen zu. Der Markierungsindex von C-Zellen in Autoradiogrammen mit <sup>3</sup>H-Thymidin war der Höhe des Serum-Calcium-Spiegels nicht

\* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

korreliert. Die Teilungsaktivität war bei calciumarmer Diät stark erhöht und bei chronischer Hypercalciämie vermindert. Die Ergebnisse werden in Hinblick auf die Regulation der Calcium-Homöostase diskutiert.

Die calcitoninbildenden C-Zellen der Säugetierschilddrüse sind heute morphologisch sowie cytochemisch ausreichend definiert und gegen das thyroxinbildende Follikel-epithel abgrenzbar (Lit.: Pearse, 1968). Der hypocalciämische Effekt von Calcitonin konnte in zahlreichen Tierversuchen zuerst von Copp u. Mitarb. (1962) nachgewiesen werden. Ein Anstieg der Plasma-Calciumkonzentration führt zur Freisetzung von Calcitonin. Obwohl damit ein zweites Regulationsprinzip der Calciumhomöostase entdeckt worden war, ist die Bedeutung des Calcitonins insbesondere für den Menschen noch weitgehend ungeklärt.

In der menschlichen Pathologie gibt es bisher nur eine Erkrankung, bei der Störungen des Calciumstoffwechsels nachweislich durch eine pathologisch veränderte Calcitonin-Sekretion verursacht sind. Es handelt sich um seltene Fälle von medullären Schilddrüsenkarzinomen, die aus C-Zellen der Schilddrüse (Williams, 1966) aufgebaut sind und sowohl sporadisch als auch dominant erblich — u. U. zusammen mit Phäochromocytomen — vorkommen. Das klinische Bild kann durch ein Hypercalcitonin-Syndrom mit schweren hypocalciämiebedingten Tetanien gekennzeichnet sein.

Die Faktoren, die unter physiologischen Bedingungen die Hormonproduktion und das Wachstum der C-Zellen steuern, sind noch weitgehend unbekannt. Morphologische Untersuchungen hierzu sind erst möglich geworden, seitdem zuverlässige Darstellungsmethoden für die C-Zellen gefunden wurden (Solcia und Sampietro, 1968), die auch Rückschlüsse auf die Zellfunktion erlauben.

Im Anschluß an vorwiegend analytisch-cytochemische Untersuchungen von C-Zellen verschiedener Säugetiere (Lietz und Zippel, 1969) soll in dieser morphologischen Studie an der Ratte versucht werden, strukturelle und cytochemische Veränderungen der C-Zellen bei experimentellen Störungen des Calciumstoffwechsels zu erfassen. Dabei wird insbesondere auf die Problematik des cytochemisch-quantitativen Calcitoninnachweises eingegangen und erstmals der Versuch gemacht, auch Veränderungen des numerischen Zellwachstums autoradiographisch zu erfassen.

### Untersuchungsgut und Methodik

Die Untersuchungen wurden an 98 weiblichen Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht (KG) von 100—200 g, außerdem an 50 unbehandelten Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts im Alter von 8 Wochen bis 2 Jahren durchgeführt. Es wurden 6 Versuchsgruppen gebildet:

*Gruppe 1. (Akute Hypercalciämie.)* 17 Tiere (KG 150—200 g) erhielten 0,1 g  $\text{Ca}^{++}$ /kg KG als 10% Calciumgluconatlösung i.p. Tötung der Tiere in Chloroformnarkose nach 4 Std, sofern nicht früher der Tod eintrat.

*Gruppe 2. (Akute Hypocalciämie.)* 14 Tiere (KG 150—200 g) erhielten 1 g/kg Äthylendiamintetraessigsäure (Titriplex<sup>R</sup>) als 5% wäßrige Lösung i.p. Alle Tiere starben 15—45 min nach der Injektion.

*Gruppe 3. (Chronische Hypercalciämie.)* 17 Tiere (KG 100—200 g) erhielten 10 Tage lang täglich 0,1 mg Dihydrotestosteron (AT-10<sup>R</sup>) per Schlucksonde.

*Gruppe 4. (Parathyreoidektomie.)* 15 Tiere (KG 100—120 g) wurden in Äthernarkose mit einem erhitzten Draht parathyreoidectomiert. Nach 3 Wochen wurden mehr als zwei Serum-

Calciumanalysen durchgeführt. Tiere, bei denen kein Wert höher als 9,0 mg-% lag, wurden als erfolgreich operiert angesehen. Tötung der Tiere nach 4—6 Wochen.

*Gruppe 5. (Calciumreiche Diät.)* 15 Tiere (KG 100—120 g) erhielten 6—8 Wochen lang eine Spezialdiät (Altromin) mit einem Calciumgehalt von 4,9% und demineralisiertes Wasser ad libitum.

*Gruppe 6. (Calciumarme Diät.)* 20 Tiere (KG 100—120 g) erhielten 6—8 Wochen lang eine Spezialdiät (Altromin C1710) mit einem Calciumgehalt von 0,08% und demineralisiertes Wasser ad libitum.

Jede Gruppe schließt 5 unbehandelte bzw. scheinoperierte Kontrolltiere ein.

Die Tiere der Gruppen 1—4 und alle Kontrolltiere erhielten eine Standarddiät (Altromin-R, Ca-Gehalt 1,4%) und Leitungswasser ad libitum. Bei allen Tieren wurde zum Versuchsende der Serum-Calciumwert bestimmt (flammenphotometrische Bestimmung aus dem Venenblut des Orbitalplexus). Nach Tötung der Tiere in Chloroformnarkose wurden die Schilddrüsen entnommen und histologisch aufgearbeitet. Folgende Färbungen und histochemische Verfahren wurden in dieser Untersuchung angewandt: Toluidinblau pH 5,0 nach HCl-Hydrolyse; Alcianblau, Aldehydfuchsin, Hämatoxylin-Chromalaun-Phloxin und Pseudoisocyanin (PIC) nach Oxydation mit Perameisensäure (PFA); Carbodiimid-Reaktion. Alle methodischen Angaben finden sich in unserer vorausgegangenen Arbeit (Lietz und Zippel, 1969).

*Farbstoffreaktionen mit gereinigtem Schweinecalcitonin (TCT) in vitro.* 8 MRC Einheiten TCT<sup>1</sup> wurden mit 1 ml Perameisensäure (PFA) 10 min versetzt, danach das Gemisch mit 2 n NaOH unter Kühlung neutralisiert. Verschiedene Konzentrationen dieser Lösung wurden mit konstantem Volumen einer 10<sup>-4</sup> m Di-Chlor-Di-Äthyl-Pseudo-isocyaninchlorid-(PIC)<sup>2</sup>-Lösung in Wasser versetzt. Das Absorptionsspektrum wurde im Leitz-Unicam-Spektralphotometer gemessen, die Lichtabsorption bei 578 m $\mu$  im Eppendorf-Photometer.

Als Modell histologischer Präparate dienten Ausstriche einer Calcitoninlösung, welche wie histologische Präparate fixiert, dehydriert und mit der HCl-Toluidinblau-Methode nach Hydrolyse sowie mit der Perameisensäure-Pseudoisocyanin-Methode (= PFA-PIC-Methode) gefärbt wurden.

*Cytophotometrische Auswertung der PFA-PIC-Methode.* Schilddrüsen aus den Gruppen 1, 4 und 6 wurden mit je einem Schilddrüsenlappen entsprechender Kontrolltiere in denselben Paraffinblock gebracht und im gleichen Schnitt gefärbt. Die Lichtabsorption wurde mit dem Leitz MPV bei 800facher Vergrößerung in einem konstanten Cytoplasmaausschnitt bei 570 m $\mu$  (Interferenzverlaufsfilter der Fa. Schott u. Gen., Mainz) gemessen. Je Tier wurden in mehreren Schnitten 60 C-Zellen ausgemessen. Die Standardabweichungen der Mittelwerte wurden berechnet und der Rangtest nach Wilcoxon (Wissenschaftliche Tabellen Documenta Geigy, 6. Auflage) auf Signifikanz durchgeführt.

*Bestimmung der Teilungsaktivität in C-Zellen mit <sup>3</sup>H-Thymin-Autoradiographie.* Je 5 Tiere der Gruppen 3, 4, 5 und 6 — davon je 2 Kontrollen — erhielten 12 Std vor Injektion des Isotops 1 mg/kg KG L-Trijodthyronin zur Ruhigstellung des Follikelepithels. Alle Tiere wurden zwischen 8 und 9 Uhr morgens 40 min nach i.p. Injektion von 3  $\mu$ C/g KG <sup>3</sup>H-Thymin getötet. Die Schilddrüsen wurden wie üblich in Paraffin eingebettet und in Serie aufgeschnitten. Nach Ausführung der Carbodiimid-Reaktion wurden die Schnitte mit Kodak AR 10 Stripping Film belegt und 14 Tage lang exponiert. Je Tier wurden 5000 C-Zellen gezählt und die Zahl der markierten C-Zellen relativ zur Gesamtzahl bestimmt.

*Elektronenmikroskopische Untersuchungen.* Schilddrüsen von Tieren der Gruppen 1, 3, 4 und 6 wurden in Glutaraldehyd-Phosphatpuffer-Lösung 2 Std fixiert, dann mit Osmiumtetroxyd nachfixiert und in Epon eingebettet.

<sup>1</sup> TCT wurde freundlicherweise von der Ciba AG, Basel, zur Verfügung gestellt.

<sup>2</sup> PIC der Fa. Dr. Harms, Leverkusen.

Die Ultradünnschnitte wurden mit Bleicitrat und Uranylacetat nachkontrastiert. Die Untersuchung erfolgte mit dem Zeiß EM 9 A.

## Befunde

### *1. Vergleichende Auswertung der histochemischen Reaktionen*

Die angewandten Verfahren waren zur vergleichenden Beurteilung des Granulagehaltes der C-Zellen unterschiedlich geeignet. Die PFA-Aldehydfuchsin und die PFA-Hämatoxylin-Chromalaun-Phloxin-Färbungen ergaben keine ausreichend konstanten Anfärbungen der Granula in den C-Zellen. Der Ausfall der PFA-Alcianblau-Färbung war von der verwendeten Farbstoff-Charge abhängig. Als reproduzierbare histochemische Reaktionen erwiesen sich bei der Ratte die HCl-Toluidinblau- und die PFA-PIC-Methoden, die stets ein paralleles Verhalten zeigten. Ein Nachteil der Toluidinblau-Färbung ist das rasche Abblassen der Färbung. Wegen ihrer Haltbarkeit und der leichten Sichtbarkeit der Granula in monochromatischem Licht von 578 m $\mu$  war die PFA-PIC-Färbung für unsere Zwecke am besten geeignet.

Hinsichtlich Cytoplasmaanfärbung, Anzahl der Granula und Anzahl der C-Zellen ergaben sich bei den Gruppen 2, 4, 5 und 6 keine eindeutigen Unterschiede zu den jeweiligen Kontrolltieren. Bei akuter Hypercalciämie (Gruppe 1) trat eine deutliche Verminderung der Cytoplasmagranula der C-Zellen in Bezug auf die Zahl und Farbtintensität der Granula auf. Zahlreiche C-Zellen waren lichtoptisch vollständig entgranuliert und fast ungefärbt. Aus den Untersuchungen von Matsuzawa und Kurosumi (1967) und aus eigenen Vorversuchen ergibt sich, daß vier Stunden nach Injektion des Calciums eine maximale Entgranulierung vorliegt. Zu diesem Zeitpunkt ist der Gipfel des Serum-Calciumspiegels überschritten. Das Ausmaß der Entgranulierung geht mit dem der Calcitoninfreisetzung aus der Schilddrüse parallel. Tiere mit länger andauernder Hypercalciämie (Gruppe 3) hatten auch stärkere Veränderungen an den C-Zellen. Bei diesen Tieren bestand eine vollständige Entgranulierung fast aller C-Zellen, so daß diese nur noch aus ihrer Lage und dem lichtoptisch fast leeren Cytoplasma erkannt werden konnten. Der Serum-Calciumspiegel aller Tiere der Gruppe 3 war über die Versuchszeit von 10 Tagen vom 3. Tag an dauernd auf mehr als 15 mg-% erhöht. Alle Tiere wiesen Verkalkungen der Nieren auf.

### *2. Zahl und Granulagehalt der C-Zellen in Abhängigkeit vom Lebensalter der Ratten*

Die C-Zellen in der Schilddrüse der Wistar-Ratte werden mit zunehmendem Lebensalter besser sichtbar. 8 Wochen alte Tiere lassen meist nur in den zentralen Anteilen beider Schilddrüsenlappen einzelne Gruppen schwach granulierter C-Zellen erkennen (Abb. 1). Bei mehr als 6 Monate alten Tieren (Abb. 2) durchsetzten die dichtgelagerten und deutlich granulierten C-Zellen bereits große Anteile der Schilddrüse in unregelmäßiger Verteilung. Mitunter kann man kleine solide Zellballen aus unterschiedlich granulierten C-Zellen sehen; die individuellen Unterschiede sind jedoch beträchtlich. In vielen C-Zellen ist der der Basalmembran zugekehrte Cytoplasmateil stärker granuliert, so daß ein halbmondförmiger Zelleib vorgetäuscht wird, der den Zellkern umgibt. Bei 1—2 Jahre alten Wistar-Ratten (Abb. 3) fanden wir stets eine teils diffuse, teils knotige Durchsetzung beider Schilddrüsenlappen mit C-Zellen. Von 10 zwei Jahre alten Tieren hatten vier ein oder mehrere unterschiedlich große Adenome aus C-Zellen (Abb. 4). In einem Fall war der gesamte Lappen durchsetzt, und auch

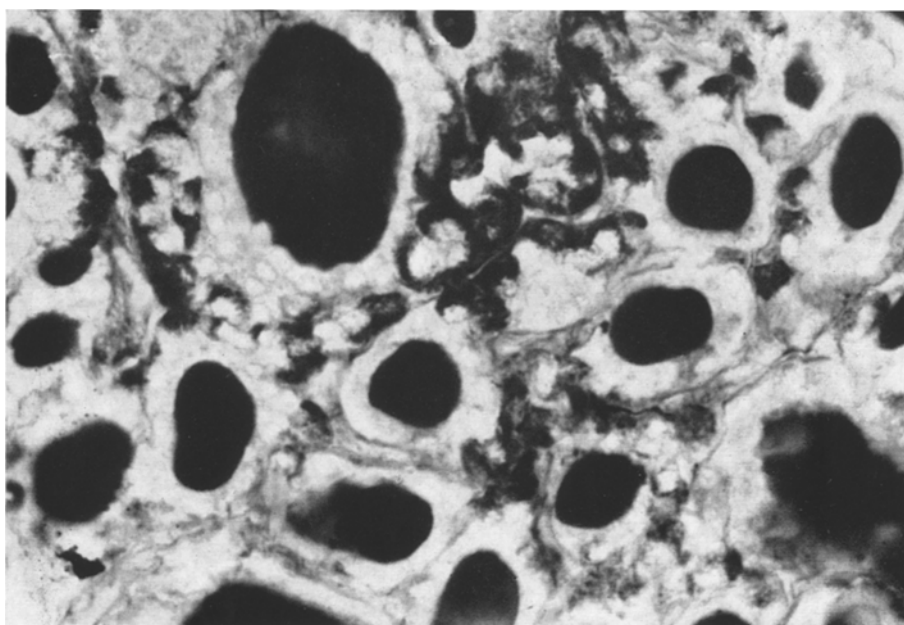


Abb. 1. 3 Monate alte unbehandelte Ratte: zahlreiche C-Zellen mit intensiv granuliertem Cytoplasma — besonders obere Bildhälfte — zwischen den Schilddrüsenfollikeln. Zellkerne hell ausgespart, Follikelkolloid dunkel angefärbt. PFA-PIC-Methode. Vergr. 500 ×

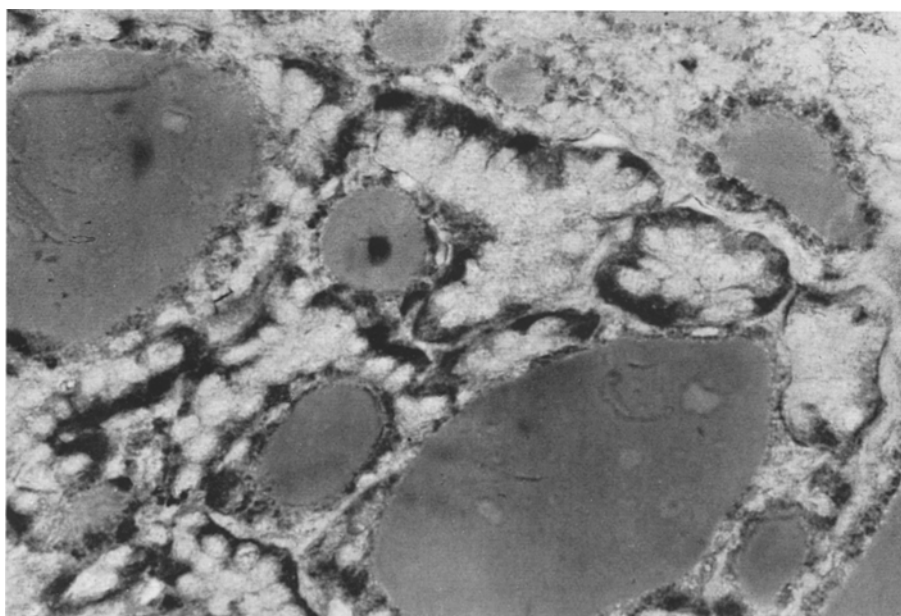


Abb. 2. 6 Monate alte unbehandelte Ratte: diffuse Durchsetzung der zentralen Schilddrüsenanteile mit C-Zellen. HCl-Toluidinblau, pH 5,2. Vergr. 500 ×

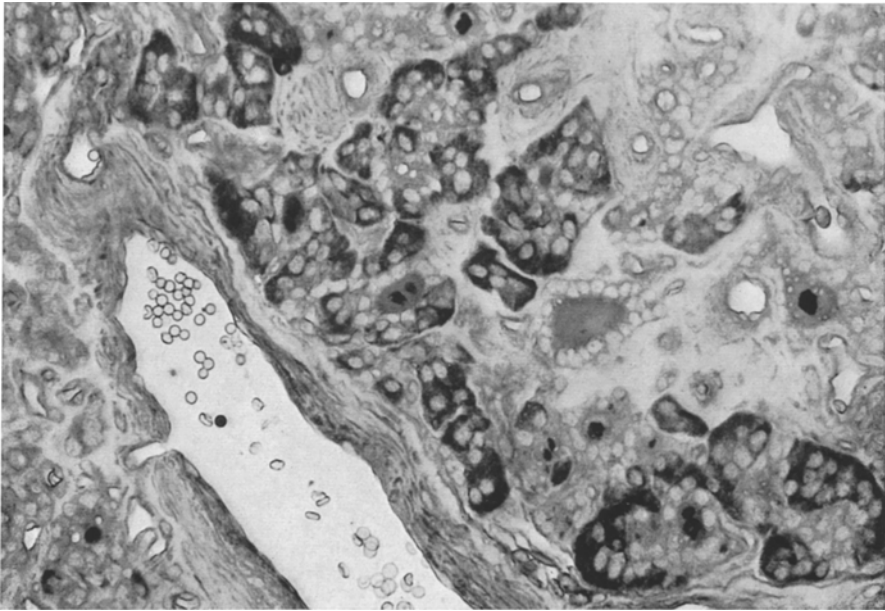


Abb. 3. 12 Monate alte unbehandelte Ratte: knotige Vermehrung von C-Zellen auch in den randlichen Anteilen der Schilddrüse. HCl-Toluidinblau, pH 5,2. Vergr. 500  $\times$

außerhalb der Drüse fanden sich C-Zellhaufen im Fettbindegewebe. Innerhalb der Adenome ist der Granulagehalt der Zellen sehr unterschiedlich. Diese Adenome entsprechen den schon länger bekannten sog. Gammaknoten der Rattenschilddrüse (Axelrad und Leblon, 1955). Bei keinem Tier hatte das Adenom zu einer erkennbaren Veränderung an den C-Zellen außerhalb des Adenoms geführt.

### 3. Photometrische Auswertung der PFA-PIC-Methode

Durch spektrophotometrische Untersuchungen mit oxydiertem Calcitonin in vitro sollte untersucht werden, ob die PFA-PIC-Färbung einen quantitativen cytochemischen Nachweis von Calcitonin ermöglicht.

Gereinigtes Schweinecalcitonin zeigte in Ausstrichpräparaten nach Fixierung, Dehydrierung, PFA-Oxydation und PIC-Färbung die gleiche Metachromasie wie die C-Zellgranula histologischer Präparate. Nach HCl-Hydrolyse wurde keine Metachromasie mit Toluidinblau beobachtet. Gleiche Ergebnisse hatten Untersuchungen mit gelöstem Calcitonin. Abb. 5 zeigt das Absorptionsspektrum eines PIC-TCT-Gemisches mit nur einem angedeuteten Gipfel bei 590 m $\mu$ , der der metachromatischen Färbung entspricht. Diese Kurve ist identisch mit dem Absorptionsspektrum des Farbstoffs allein. Oxydiertes Calcitonin (PFA-TCT-PIC) führt dagegen zu einem hohem Gipfel bei 590 m $\mu$ . Diese Veränderungen des Absorptionsspektrums von PIC gleichen denen, die Schiebeler und Schiessler (1959) beim histochemischen Nachweis von Insulin mit dieser Methode fanden. Wie Insulin ist Calcitonin ein Polypeptid mit cyclischer Disulfid-Brücke (Sieber u. Mitarb., 1968; Riniker u. Mitarb., 1968). Oxydation mit Perameisensäure führt zum Dicysteinsäure-Peptid, dessen stark saure  $-\text{SO}_3^-$ -Gruppen räumlich so benachbart sind, daß die an sie gebundenen Farbstoffmoleküle metachromatische Polymere bilden können. Diese Anordnung ist weitgehend spezifisch, so daß andere Cystin- oder  $-\text{SO}_3^-$ -reiche Gewebsbestandteile wie Follikelkolloid oder Mastzellgranula orthochromatisch rot dargestellt werden (s.o. Abb. 1). Bei metachromatischen Farbstoffreaktionen gilt im allgemeinen die lineare Beziehung zwischen Extinction und Konzentration

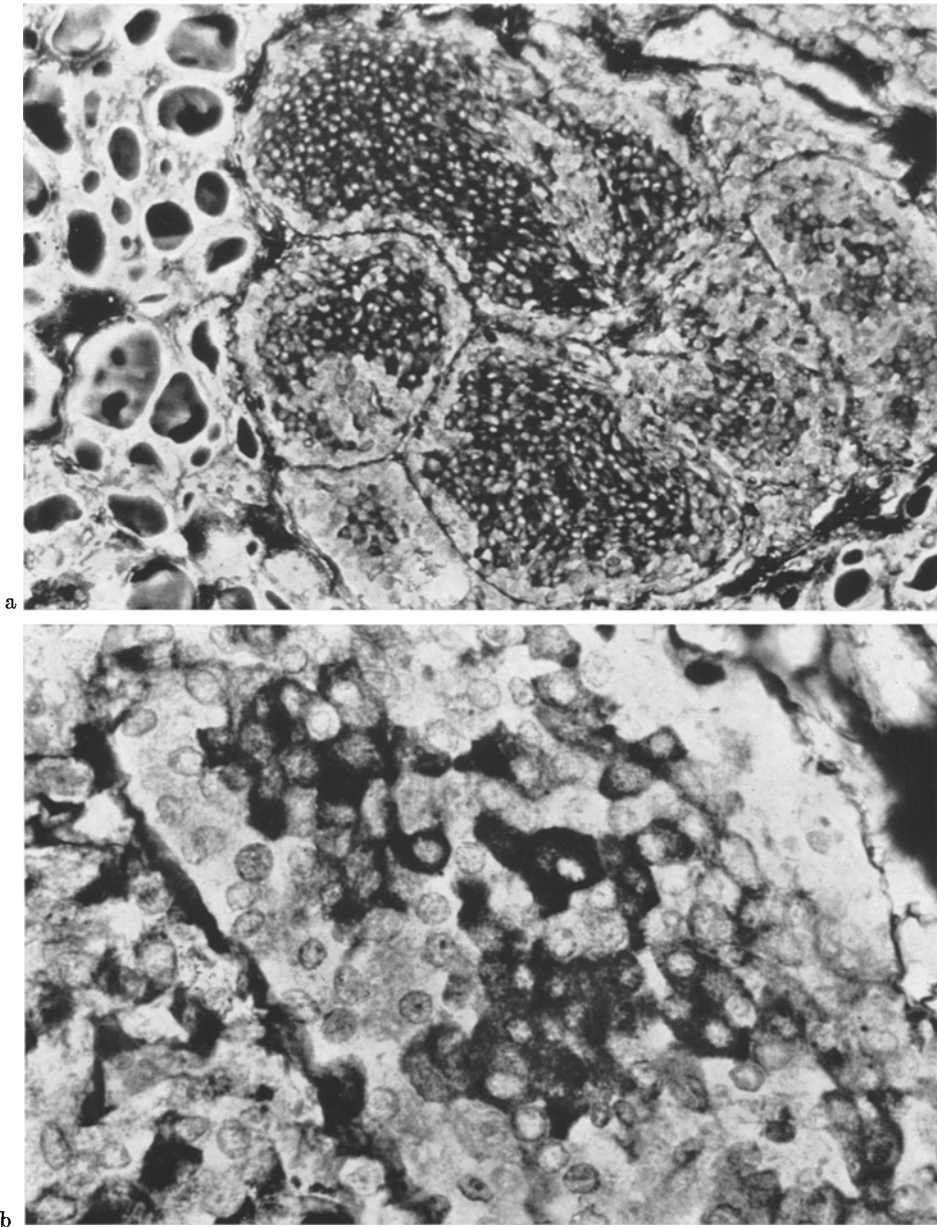


Abb. 4. 2 Jahre alte unbehandelte Ratte: C-Zellenadenom mit deutlicher Läppchengliederung. PFA-PIC-Methode. Vergr. 120- bzw. 500  $\times$

(Lambertsches Gesetz) nicht. Abb. 6 stellt diese Beziehung für das von uns verwendete System *in vitro* dar. Bei der histochemischen Reaktion gelten jedoch andere Verhältnisse, da das metachromatische Produkt PFA-TCT-PIC schwer löslich ist. Der quantitative Vergleich der Lichtabsorption bei 570—580 m $\mu$  von histochemischen Präparaten ist mit dieser Methode jedoch gerechtfertigt, da keine absoluten Werte erwartet werden.

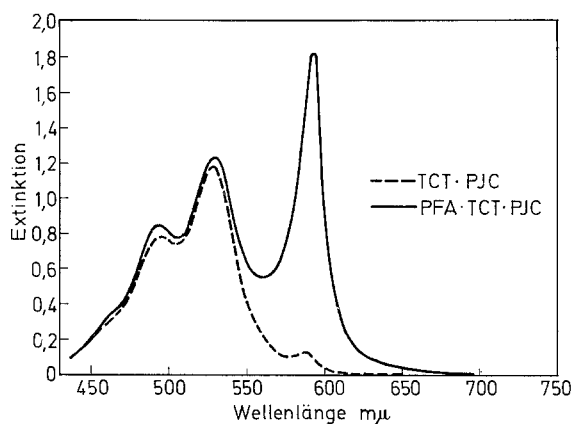


Abb. 5. Absorptionsspektrum einer PIC-TCT-Lösung. (Erklärung im Text)

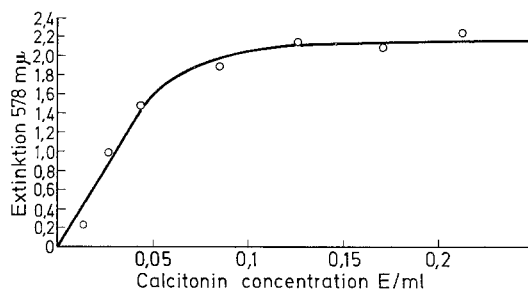


Abb. 6. Lichtabsorption als Funktion der Calcitoninkonzentration im PFA-TCT-PIC-Gemisch. Farbstoffkonzentration: 0,0086%. Der Sättigungswert ist von der PIC-Konzentration abhängig

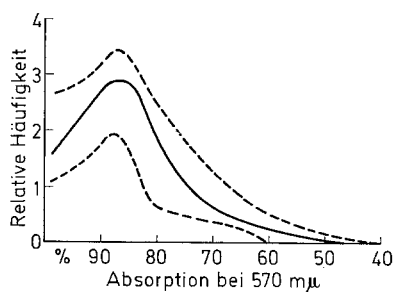


Abb. 7. Verteilung von 660 cytophotometrischen Werten bei 11 Kontrolltieren. PFA-PIC-Methode

Die Ergebnisse cytophotometrischer Messungen an ausgewählten Tieren einiger Gruppen sind in Abb. 7 und 8 dargestellt. Sie stehen in Übereinstimmung mit der lichtoptischen Auswertung dieser Präparate. Die große Streuung der Werte ist auf die biologischen Gegebenheiten und zusätzlich auf methodische Fehler



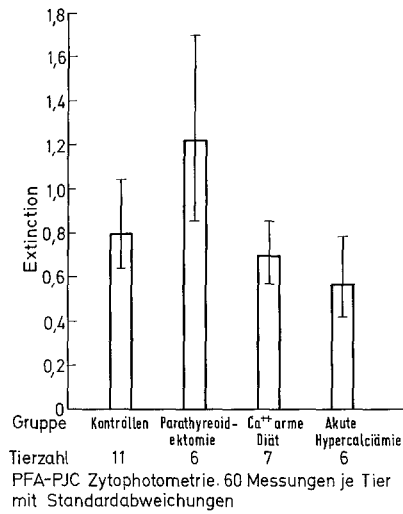


Abb. 8. Darstellung der cytophotometrischen Werte von C-Zellen mit Standardabweichungen. 60 Einzelmessungen je Tier. PFA-PJC-Methode

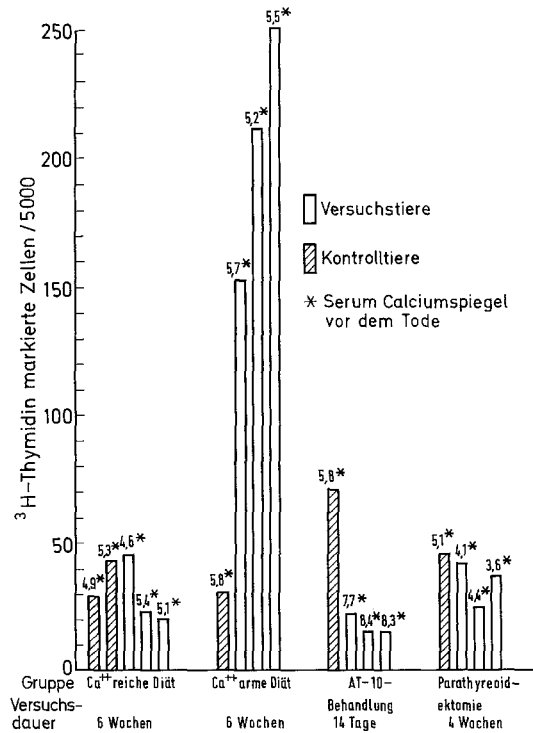


Abb. 9. <sup>3</sup>H-Thymidin-Autoradiographie. Darstellung der Markierungsindices von C-Zellen

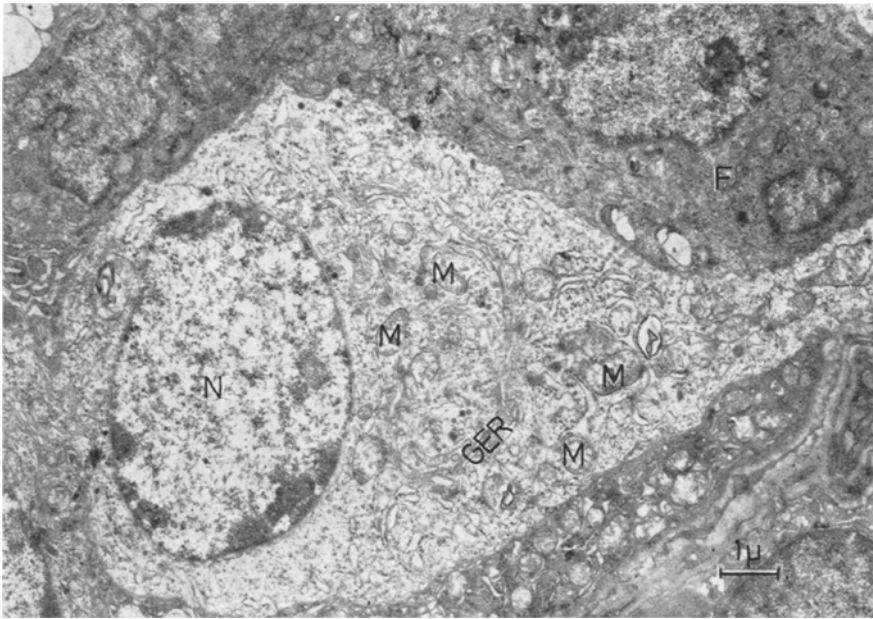


Abb. 10. Chronische Hypercalciämie (Gruppe 3, 10. Versuchstag): vollständige Entgranulierung einer C-Zelle. *N* Zellkern; *M* Mitochondrium; *GER* glattes endoplasmatisches Reticulum; *F* Follikelepithelzelle. Vergr. 6800  $\times$

zurückzuführen. Jeder Meßpunkt entspricht nur einem Cytoplasmaausschnitt einer einzelnen Zelle (methodische Problematik s. bei Sandritter, 1958). Entgranulierte Zellen entgehen der Messung überhaupt. Deshalb ist der verminderte Calcitoniningehalt der C-Zellen bei der Gruppe 1 (akute Hypercalciämie; Signifikanzwahrscheinlichkeit  $2\alpha = 0,05$ ) durch die cytophotometrische Messung nicht voll erfaßt, und die Meßwerte sind relativ zu hoch. Aus den gleichen Überlegungen ist die cytophotometrische Auswertung der Gruppe 3 (chronische Hypercalciämie) wegen der fast vollständigen Entgranulierung aller Zellen ohne Wert. Nach unseren Erfahrungen ist eine Vermehrung des Granulagehalts subjektiv nicht sicher erkennbar, cytophotometrisch dagegen gut zu erfassen. Dies zeigt sich deutlich bei der Gruppe 4 (Parathyreoidektomie;  $2\alpha = 0,01$ ). Tiere der Gruppe 6 (calciumarme Diät) hatten nach unseren Untersuchungen keinen vermehrten Granulagehalt der C-Zellen.

#### 4. Autoradiographische Befunde zum numerischen Zellwachstum

Als Voraussetzung zur Auswertung von  $^3\text{H}$ -Thymidin-Autoradiogrammen ist eine Färbung anzusehen, die eine Differenzierung von C-Zellen und Follikelepithelzellen in der Rattenschilddrüse zuläßt. Am ehesten war dazu die Carbo-diimidreaktion geeignet, bei der sich C-Zellen durch ein helles, blaues Cytoplasma von dunklen, rötlich gefärbten Follikelepithelzellen unterscheiden. Das Reaktionsprodukt der Carbo-diimidreaktion ist unempfindlich gegen die bei der Entwick-

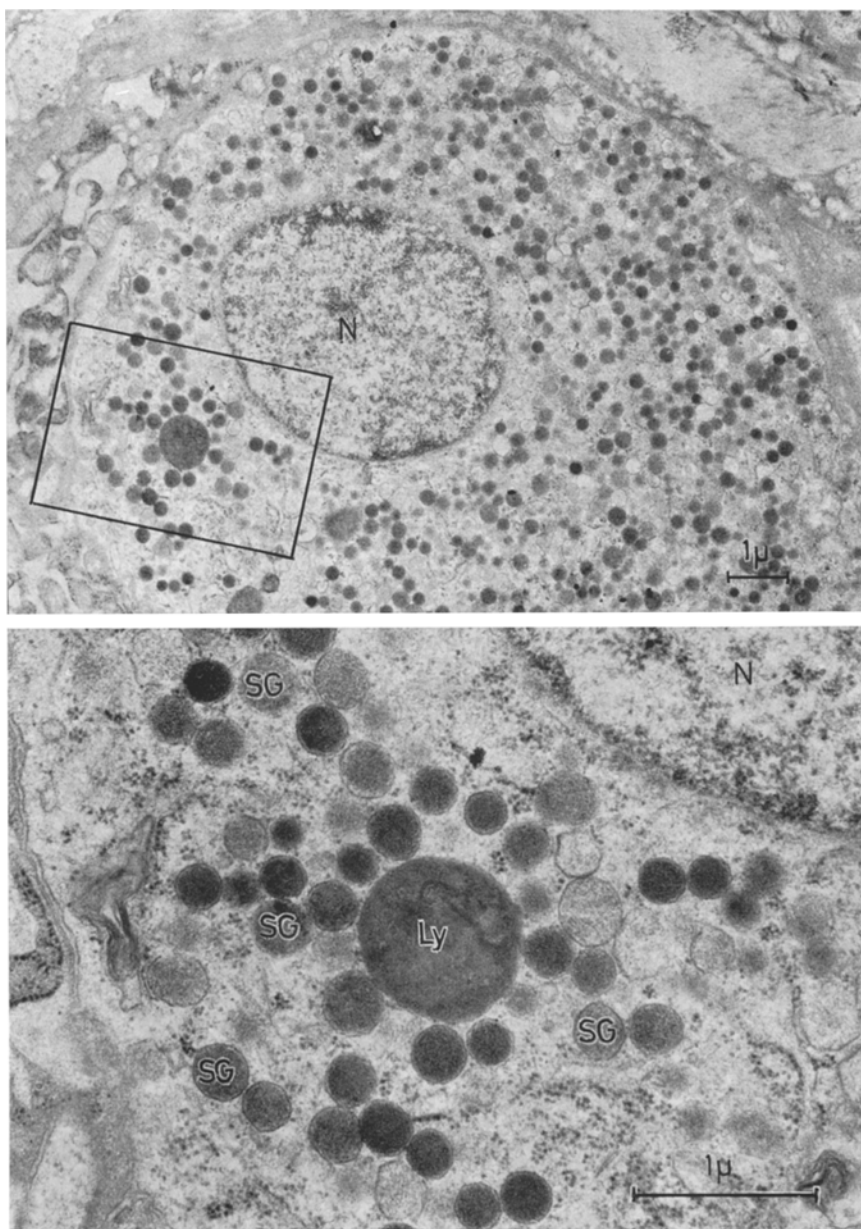


Abb. 11. Chronische Hypocalcämie (Gruppe 4, 4 Wochen nach Parathyreoidektomie): vermehrter Granulagehalt und Auftreten großer lysosomaler Körper (Ausschnitt). *N* Zellkern; *Ly* lysosomaler Körper; *SG* sekretorische Granula. Vergr. 8000- bzw. 24400  $\times$

lung und Fixierung des Films verwendeten Chemikalien. Bei der Auswertung muß jedoch die Tatsache berücksichtigt werden, daß in der Rattenschilddrüse häufig Plattenepithelinseln vorkommen, die eine lebhafte Teilungsaktivität be-

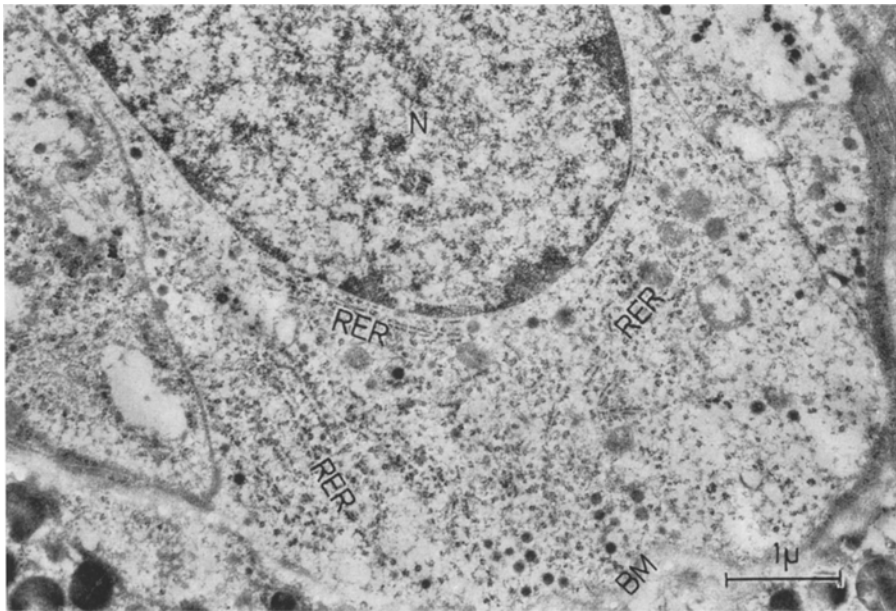


Abb. 12. Calciumarme Ernährung (Gruppe 6, 6. Versuchswoche): C-Zelle mit verringertem Granulagehalt und vermehrtem rauhem endoplasmatischem Reticulum. *N* Zellkern; *BM* Basalmembran; *RER* rauhes endoplasmatisches Reticulum. Vergr. 14400 ×

sitzen und daher mit proliferierten C-Zellen verwechselt werden können. Die Auszählung der Autoradiogramme von 17 Tieren hatte das in Abb. 9 dargestellte Ergebnis. Unter Berücksichtigung des geringeren Lebensalters der AT-10-behandelten Gruppe fällt auf, daß der Markierungsindex bei allen Kontrolltieren recht einheitlich bei durchschnittlich  $8,7\text{‰}$  liegt. Der Markierungsindex von calciumreich ernährten und von parathyreoidektomierten Ratten wurde als unverändert beurteilt. AT-10-behandelte Tiere hatten einen erniedrigten und calciumarm ernährte Tiere einen sehr stark erhöhten Markierungsindex.

##### 5. Elektronenoptische Befunde

4 Std nach Injektion der Calciumgluconatlösung (Gruppe 1) hatte die Mehrzahl der C-Zellen einen deutlich erniedrigten Granulagehalt. Neben vollständig entgranulierten C-Zellen wurden aber auch solche mit reichlichem Granulagehalt beobachtet. C-Zellen ohne sekretorische Granula fielen durch ihr elektronenoptisch helles Cytoplasma auf. Das glatte endoplasmatische Reticulum war gut erkennbar. Rauhes endoplasmatisches Reticulum war spärlich vorhanden.

Chronisch hypercalciämische Tiere (Gruppe 3) hatten alle fast vollständig entgranulierte C-Zellen. Das glatte endoplasmatische Retikulum war vermehrt (Abb. 10).

Bei parathyreoidektomierten Tieren (Gruppe 4) hatten Anzahl und Größe der sekretorischen Granula im Vergleich zu den Kontrollen deutlich zugenommen.

Der Granuladurchmesser betrug durchschnittlich  $0,3\ \mu$ . Zusätzlich fielen ca.  $0,5$ — $0,8\ \mu$  im Durchmesser große membranbegrenzte Körper mit unterschiedlich elektronendichtem Inhalt auf. Sie ließen eine multivesiculäre Innenstruktur oder Membranfragmente erkennen (Abb. 11). Sie wurden als Lysosomen angesprochen und fanden sich weder bei den Kontrolltieren noch bei den anderen Versuchsgruppen.

Calciumarm ernährte Tiere (Gruppe 6) hatten elektronenoptisch helle C-Zellen mit zumeist nur mäßigem Granulagehalt. Uns fiel bei dieser Gruppe ein gut entwickeltes rauhes endoplasmatisches Reticulum auf, welches in C-Zellen sonst gewöhnlich nur spärlich sichtbar ist (Abb. 12).

### Diskussion

Die Kenntnisse über die Sekretion und biologische Wirkung des Calcitonins sind bisher vorwiegend aus biochemischen Bestimmungen des Calcitonin gehalts der Schilddrüse und des Blutes sowie aus Veränderungen der Serumelektrolyte und des Knochenstoffwechsels abgeleitet worden. Die plasma-calciumsenkende Wirkung des Hormons beruht danach zum wesentlichen Teil auf einer Verminderung des Calciumrückstromes aus dem Knochen in den extracellulären Raum (Johnston jr. u. Deiss jr., 1966; Hirsch u. Mitarb., 1964). Da dieser Effekt sehr rasch eintritt, kann neben einer Hemmung der Osteoklasten eine allgemeine Wirkung auf die Calciumpermeabilität der Zellmembranen angenommen werden. Ein Anstieg des Serum-Calciumspiegels scheint der physiologische Sekretionsreiz für die C-Zellen zu sein.

Für die Beurteilung morphologischer Befunde sollte die Spezifität der Aussage cytochemischer Färbemethoden möglichst gut getestet sein. Aufgrund unserer Untersuchungen mit oxydiertem Calcitonin *in vitro* und analog zu den Untersuchungen von Schiebler und Schiessler (1959) sowie Coalson (1966) am Insulin mit der gleichen Methodik sehen wir die PFA-PIC-Färbung als am besten geeigneten cytochemischen Nachweis des Calcitonins in den C-Zellen an. Daß diese Methode nicht generell für Calcitonin spezifisch ist, ergibt sich aus der positiven Reaktion mit anderen cystin-disulfidbrückenhaltigen Peptidhormonen, aus der unspezifischen metachromatischen Färbung von Basalmembranen und Knorpelgrundsubstanzen sowie aus der von Solcia und Sampietro (1968b) beobachteten metachromatischen Färbung nach HCl-Hydrolyse. Bei der Rattenschilddrüse können diese Einschränkungen jedoch vernachlässigt werden, sofern die Schnitte mit Perameisensäure oxydiert und nicht hydrolysiert wurden.

Die chemische Zusammensetzung der Strukturen, die nach HCl-Hydrolyse mit verschiedenen basischen Farbstoffen in C-Zellen dargestellt werden, ist bisher nicht genau bekannt. Es handelt sich um Eiweißkörper, die reich an Carboxylseitenketten der Aminosäuren Asparagin- und Glutaminsäure sind (Solcia und Sampietro, 1968b; Pearse, 1969a und b). Sie sind in den sekretorischen Granula verschiedener endokriner Zellen enthalten und stehen in enger funktioneller Beziehung zum jeweiligen Hormon. In den C-Zellen kann der Nachweis dieser schwach sauren Gruppen mit basischen Farbstoffen nicht als calcitoninspezifisch angesehen werden. Die Disulfidbrücke des Hormons läßt sich nach unseren Erfahrungen nach HCl-Hydrolyse nicht mehr nachweisen, jedenfalls nicht mit der PFA-

Alcianblaufärbung. Die Tabelle zeigt, daß je nach Vorbehandlung der Schnitte mit Toluidinblau nur die schwach sauren Carboxylgruppen, mit Alcianblau (stark sauer) nur die  $-\text{SO}_3^-$ -Gruppen und mit Pseudoisocyanin jedoch beide Gruppen reagieren. Bei der PFA-PIC-Färbung werden die schwach sauren (carboxylseitenkettenhaltigen) Cytoplasmabestandteile der C-Zellen offenbar nicht frei und damit nicht dargestellt.

Tabelle. Färberische Eigenschaften der Granula in C-Zellen

| Schnittbehandlung | Metachromasie mit |        |                            | Färbung mit stark saurem Alcianblau<br>pH < 1,0 |
|-------------------|-------------------|--------|----------------------------|---|
|                   | Toluidinblau      |        | Pseudo-isocyanin<br>pH 5,2 |   |
|                   | pH 5,2            | pH 2,5 |                            |   |
| Ø                 | (+)               | Ø      | (+)                        | Ø   |
| Hydrolyse         | +++               | Ø      | ++++                       | Ø   |
| PFA-Oxydation     | (+)               | Ø      | +++                        | +++   |
| Hydrolyse + PFA   | +                 | Ø      | +++                        | Ø   |

In Übereinstimmung mit biochemischen (Gittes u. Mitarb., 1967) und elektronenoptischen (Matsuzawa und Kurosumi, 1967) Befunden an Rattenschilddrüsen fanden wir den Calcitonin- bzw. Granulagehalt der C-Zellen bei experimenteller akuter und chronischer Hypercalciämie erniedrigt. In weiteren elektronenmikroskopischen Untersuchungen (Lietz und Donath, 1969) ergab sich, daß ein Teil der C-Zellen seine Granula bei einmaliger Calciumgluconatinjektion nicht abgibt. Nur bei langanhaltender Hypercalciämie fanden sich alle C-Zellen entgranuliert, was als Zeichen einer völligen Entspeicherung gedeutet werden kann. Bei fehlendem Sekretionsreiz — z.B. bei parathyreoidektomierten und damit dauernd hypocalciämischen Tieren — ist der Calcitoniningehalt der Schilddrüse erhöht, die C-Zellen besitzen mehr und elektronenoptisch größere Granula (Abb. 11). Außerdem fanden wir unter diesen Bedingungen große elektronendichte Körper mit Membraneinschlüssen, die wir als Lysosomen deuten (Abb. 11). Diese Veränderungen der Zelle sind Ausdruck der funktionellen Umdifferenzierung bei veränderter physiologischer Leistung und mit den Veränderungen der C-Zellen vergleichbar, die bei winterschlafenden Tieren jahreszeitlich bedingt auftreten (Nunez u. Mitarb., 1967).

Aufgrund der Kenntnisse über die Sekretion des Calcitonins hatten wir bei calciumarm ernährten Ratten einen vermehrten Calcitoniningehalt der C-Zellen erwartet. Diese Tiere hatten jedoch einen normalen Serum-Calciumspiegel und zeigten cytophotometrisch eher einen erniedrigten Calcitoniningehalt der C-Zellen. Auch elektronenoptisch fanden sich nur mäßig viel sekretorische Granula, dagegen ein gut entwickeltes endoplasmatisches Reticulum und zahlreiche freie Ribosomen (Abb. 12). Dieser Befund ist als Ausdruck einer gesteigerten Zellfunktion anzusehen und spricht gegen die Annahme, daß die C-Zellen sich unter diesen Bedingungen in einer inaktiven Speicherphase befinden. Gittes u. Mitarb. (1968) fanden bei calciumarm ernährten Ratten biochemisch einen erhöhten Calcitoniningehalt der Schilddrüse und erwähnen, daß bei diesen Tieren eine Hyperplasie der C-Zellen

vorlag. Dies stimmt überein mit unseren autoradiographischen Befunden, wo wir unter calciumarmer Ernährung eine Steigerung der Teilungsaktivität fanden. Die Hyperplasie eines endokrinen Organs ist Ausdruck einer gesteigerten funktionellen Belastung und nur schwer bei einem ruhiggestellten, sich ausschließlich in der Speicherphase befindlichen C-Zellensystem erklärbar. Die beobachtete Teilungsaktivität der C-Zellen bei calciumarmer Diät wäre in diesem Sinne Ausdruck einer gesteigerten Zellfunktion, die durch ein übergeordnetes Regulationsprinzip bedingt ist. Die Glieder dieses Regulationskreises sind jedoch noch weitgehend unbekannt. Die bisherigen autoradiographischen Befunde deuten darauf hin, daß die funktionelle Steuerung der C-Zellen u. U. unabhängig von der Höhe des Serum-Calciumspiegels und damit von dem eigentlichen Sekretionsreiz trennbar ist. Da bei calciumarmer Ernährung Bedingungen wie beim sekundären Hyperparathyreoidismus auftreten, könnte ein Einfluß des Parathormons auf die C-Zellen diskutiert werden. Die bisherigen Befunde reichen aber für solche Schlüsse nicht aus und sollen durch weitere experimentelle Modelle ergänzt werden.

Wir danken Herrn Prof. Dr. Kuhlencordt, I. Medizinische Klinik der Universität Hamburg für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Serum-Calciumanalysen.

### Literatur

- Axelrad, A. A., Leblond, C. P.: Induction of thyroid tumors in rats by a low iodine diet. *Cancer (Philad.)* **8**, 339—367 (1955).
- Coalson, R. E.: Pseudoisocyanin staining of insulin and specificity of empirical islet stains. *Stain Technol.* **41**, 121—129 (1966).
- Copp, D. H., Cameron, E. C., Cheney, B. A., Davidson, A. G. F., Henze, K. G.: Evidence for calcitonin — an new hormone from the parathyroid, that lowers blood calcium. *Endocrinology* **70**, 638—649 (1962).
- Gittes, R. F., Toverud, S. U., Cooper, C. W.: Effects of hypercalcemia and hypocalcemia on the thyrocalcitonin content of rat thyroid glands. *Endocrinology* **82**, 83—90 (1968).
- Hirsch, P. F., Voelkel, E. F., Munson, P. L.: Thyrocalcitonin: hypocalcemic and hypophosphatemic principle of the thyroid gland. *Science* **146**, 412—413 (1964).
- Johnston, C. C., Jr., Deiss, W. P., Jr.: An inhibitory effect of thyrocalcitonin on calcium release in vivo and bone metabolism in vitro. *Endocrinology* **78**, 1139—1143 (1966).
- Lietz, H., Donath, K.: Cytochemical evidence for the presence of hormonal peptides in thyroid C-cells. In: Calcitonin. Proceedings of the Symposium on Thyrocalcitonin and the C Cells. London 1969. London: William Heinemann Medical Books Ltd. (im Druck).
- Zippel, H.: Cytochemische Untersuchungen zur vergleichenden Morphologie der C-Zellen in der Schilddrüse. *Z. Zellforsch.* (im Druck).
- Matsuzawa, T., Kurosumi, K.: Morphological changes in the parafollicular cells of the rat thyroid glands after administration of calcium shown by electron microscopy. *Nature (Lond.)* **213**, 927—928 (1967).
- Nunez, D. A., Gould, R. P., Hamilton, D. W., Hayward, J. S., Holt, S. J.: Seasonal changes in the fine structure of the basal granular cells of the bat thyroid. *J. Cell Sci.* **2**, 410 (1967).
- Pearse, A. G. E.: The thyroid parenchymatous cells of baber, and the nature and function of their C Cell successors in thyroid, parathyroid, and ultimobranchial bodies. In: Calcitonin. Proceedings of the Symposium on Thyrocalcitonin and the C Cells. London 1967. London: William Heinemann Medical Books Ltd. 1968.
- The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone producing cells of the APUD series and the embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept. *J. Histochem. Cytochem.* **17**, 303—313 (1969a).
- Random coil conformation of polypeptide hormone precursor protein in endocrine cells. *Nature (Lond.)* **221**, 1210—1211 (1969b).

- Riniker, B., Neher, R., Maier, R., Kahnt, F. W., Byfield, P. G. H., Gudmundsson, T. V., Galante, L., Macintyre, I.: Menschliches Calcitonin. I. Isolierung und Charakterisierung. *Helv. chim. Acta* **51**, 1738—1742 (1968).
- Sandritter, W.: Ultraviolettmikrospektrophotometrie. In: *Handbuch der Histochemie*, herausgeg. von W. Graumann und K. H. Neumann, Bd. I/1, S. 220—338. Stuttgart: Fischer 1958.
- Schiebler, T. H., Schiessler, S.: Über den Nachweis von Insulin mit den metachromatisch reagierenden Pseudoisocyaninen. *Histochemie* **1**, 445—465 (1959).
- Sieber, P., Brugger, M., Kamber, B., Riniker, B., Rittel, W.: Menschliches Calcitonin. IV. Die Synthese von Calcitonin M. *Helv. chim. Acta* **51**, 2057—2061 (1968).
- Solcia, E., Sampietro, R.: New method for staining secretory granules and 5-hydroxytryptamine in the thyroid C cells. In: *Calcitonin. Proceedings of the Symposium on Thyrocalcitonin and the C-Cells*. London 1967. London: William Heinemann Medical Books Ltd. 1968.
- Vassallo, G., Capella, C.: Selective staining of endocrine cells by basic dyes after acid hydrolysis. *Stain Technol.* **43**, 257—263 (1968).
- Williams, D. D.: Histogenesis of medullary carcinoma of the thyroid. *J. clin. Path.* **19**, 114—118 (1966).

Dr. H. Lietz  
Pathologisches Institut  
der Universität  
2 Hamburg 20, Martinistr. 52