

Differentialfärbung zur Darstellung von Wachstumshormon und Prolaktin produzierenden Zellen des Hypophysenvorderlappens

M. F. El Etreby und U. Tüshaus

Forschungslaboratorium der Schering AG, Berlin/Bergkamen

Eingegangen am 6. Juli 1972

A Stain for Differentiating Growth Hormone and Prolactin Producing Cells in the Adenohypophysis

Summary. A differential staining method is described for demonstration of growth hormone- and prolactin-producing cells of the anterior pituitary lobe in mouse, rat, hamster, guinea pig, rabbit, dog and monkey under physiological and pathological conditions. Unlike the Herlant tetrachrome technique, the method proved well reproducible and thus suitable for routine histological tests. It enables us to make a qualitative and semiquantitative statement on the hormone content and functional state of prolactin and somatotrophin cells.

Zusammenfassung. Es wird eine Differentialfärbung zur Darstellung von Wachstumshormon und Prolaktin produzierenden Zellen des Hypophysenvorderlappens bei Maus, Ratte, Hamster, Meerschweinchen, Kaninchen, Hund und Affen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen beschrieben. Die Methode erwies sich, im Gegensatz zur Herlant-Tetrachrom-Technik, als gut reproduzierbar und damit für histologische Routineuntersuchungen geeignet. Sie erlaubt eine qualitative und semiquantitative Aussage über den Hormongehalt und den Funktionszustand der Prolaktin- und Somatotropin-Zellen.

Einleitung

Ein aktuelles Thema der morphologischen Endokrinologie stellt die zelluläre Lokalisation der Hormonbildung im Hypophysenvorderlappen (HVL) unter physiologischen und pathologischen Bedingungen dar. Die Ergebnisse der Immunhistochemie, Autoradiographie und Elektronenmikroskopie sowie neue Erkenntnisse der Biochemie der Vorderlappenhormone haben die funktionelle Bedeutung der einzelnen Drüsenzelltypen im HVL gesichert. Durch die obengenannten Untersuchungsmethoden und mit Hilfe klassischer Versuchsanordnungen, wie etwa der Entfernung oder Blockade eines peripheren endokrinen Organs, ist nachgewiesen worden, daß eine Drüsenzelle im HVL nur ein bestimmtes Hormon produziert. Damit kann die Annahme einer generellen funktionellen Pluripotenz der Einzelzelle des HVL als widerlegt gelten. Aufgrund dieser Erkenntnisse ist auch durch die Anwendung einfacher histologischer und histochemischer Methoden die funktionelle Differenzierung bestimmter Drüsenzelltypen möglich (vgl. Dohm, 1963; Herlant, 1964; Purves, 1966; Herlant und Pasteels, 1967; Kracht und Hachmeister, 1969; Pasteels, 1971; Wittkowski, 1971).

Die Zellen, die Somatotropin und Prolaktin produzieren, gehören histologisch zur Klasse der acidophilen Zellen. Die Affinität ihrer Granula für saure Farbstoffe erklärt sich aus der Tatsache, daß diese einfachen Proteohormone freie endständige Aminogruppen aufweisen. Trotz dieser allgemeinen Eigenschaften gelingt es heute im wesentlichen mit Kombinationen saurer Farbstoffe, die Prolaktin- und Somatotropin-Zellen voneinander zu unterscheiden (vgl. Herlant, 1964; Purves, 1966; Herlant und Pasteels, 1967; Pasteels, 1971).

Durch die Anwendung verschiedener Modifikationen der klassischen Trichrom-Färbung, wie z.B. die Heidenhainsche Azokarmin-Orange-G-Methode ist es Dawson und Friedgood (1938) und Romeis (1940) gelungen, im HVL innerhalb der acidophilen Zellgruppe orangeophile und carminophile Zellen zu unterscheiden. Die Ergebnisse der obengenannten Methoden sind im wesentlichen von dem Differenzierungsvorgang abhängig (vgl. Herlant und Pasteels, 1967).

Einfachere histologische Verfahren zum Nachweis dieser beiden Zelltypen wurden in neuerer Zeit entwickelt. Herlant (1960) konnte, wie früher Cleveland und Wolfe (1932), durch die Anwendung einer Kombination von Erythrosin und Orange G orangeophile (somatotrope) und erythrosinophile (laktotrope) Zellen unterscheiden. In dieser Methode verwendete Herlant ursprünglich zusätzlich Anilinblau und saures Alizarinblau für die Differenzierung der basophilen Zellgruppen (Herlant-Tetrachrom-Technik).

Die Darstellung von Wachstumshormon und Prolaktin-produzierenden Zellen des HVL ist auch mit der Methasolblau-PAS-Orange-G-Methode möglich. Die Somatotropin-Zellen zeigen eine spezifische Affinität zu Methasolblau. Dagegen färben sich die Prolaktin-Zellen intensiv mit Orange G und schwach mit PAS (vgl. Herlant und Pasteels, 1967; Dubois und Herlant, 1968; Pasteels, 1971).

Brookes (1968) hat Carmoisin L und Orange G für die Differenzierung zweier acidophiler Zellen angewandt. Hierbei erscheinen die Prolaktin-Zellen Carmoisin L- und die Somatotropin-Zellen Orange G-positiv. Als Gegenfärbung verwendete Brookes für die Darstellung der basophilen Zellen Wool Green S.

Die obengenannte cytologisch-funktionelle Differenzierung der Somatotropin- und Prolaktin-Zellen gilt für den Menschen und alle bisher untersuchten Säugetiere unter physiologischen und experimentellen Bedingungen (vgl. Herlant, 1964; Purves, 1966; Herlant und Pasteels, 1967; Pasteels, 1971; Wittkowski, 1971).

Die Validität dieser histologischen Verfahren wurde durch den Vergleich mit einer immunhistologischen Hormondarstellung und durch elektronenmikroskopische Untersuchungen im allgemeinen bestätigt (vgl. Herlant, 1964; Herlant und Pasteels, 1967; 1971; Weidner, Gropp und Hachmeister, 1970; Pasteels, 1971; Wittkowski, 1971).

In einer Übersichtsarbeit hat Pasteels (1971) die gesamte Problematik der morphologischen Differenzierung der Prolaktin- und Somatotropin-Zellen im HVL ausführlich erläutert.

Wir haben die verschiedenen obengenannten Färbemethoden zur Darstellung von Wachstumshormon und Prolaktin produzierenden Zellen des HVL bei verschiedenen Versuchstieren unter physiologischen und pathologischen Bedingungen geprüft. Außerdem verwendeten wir für diesen Zweck, ähnlich wie Brookes (1968), Carmoisin L und Orange G, jedoch in Kombination mit Anilinblau und saurem Alizarinblau. Diese Methode erwies sich vor allem im Gegensatz zur Herlant-Tetrachrom-Technik als gut reproduzierbar und lieferte optimale Farbkontraste.

Es erschien uns deshalb von besonderem Interesse, auf diese Methode und ihre Resultate bei einigen Versuchstieren einzugehen.

Material und Methode

Die Hypophysen wurden 24 Std in Formol-Sublimat (1 Teil Formalin + 9 Teile einer gesättigten wäßrigen Sublimat-Lösung) oder 2–4 Std in einem Gemisch nach Helly fixiert,

dann mindestens 24 Std in fließendem Wasser gewaschen. Nach Einbettung in Paraffin wurden 2—4 μ dicke Sagittalschnitte angefertigt.

Reagentien¹: A. 10%ige wäßrige Kupfersulfat-Lösung; B. 1,0 g Carmoisin L (Michrome Nr. 102) lösen in 100,0 cm³ Aqua dest. und 1,0 cm³ konzentrierter Essigsäure hinzugeben; C. 0,5 g Orange G (Michrome Nr. 411) und 2,0 g Phosphorwolframsäure lösen in 100,0 cm³ 95%igem Äthanol; D. 0,5 g Anilinblau (Michrome Nr. 167) lösen in 100,0 cm³ Aqua dest. und 1,0 cm³ konzentrierter Essigsäure hinzugeben; E. 0,5 g saures Alizarinblau BB (Michrome Nr. 9) und 10,0 g Aluminiumsulphat in 100,0 cm³ Aqua dest. unter Erhitzen lösen. Die Lösung wird ca. 5 min gekocht (bis eine Purpurviolett-Färbung auftritt). Nach dem Erkalten wird mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt und filtriert; F. 5%ige Phosphormolybdänsäure.

Technik. Entparaffinieren, absteigende Alkoholreihe, Entsublimieren, Entjoden, Aqua dest., anschließend:

1. Lösung A bei 44° C	90 min
2. Auswaschen in Leitungswasser	20 min
3. Abspülen in Aqua dest.	
4. Lösung B	30 min
5. Abspülen in Aqua dest.	
6. Abspülen in 95%igem Äthanol	
7. Lösung C (mikroskopische Kontrolle erforderlich)	ca. 30 min
8. Abspülen in 95%igem Äthanol	
9. Abspülen in Aqua dest.	
10. Lösung D	3 min
11. Abspülen in Aqua dest.	
12. Lösung E	10 min
13. Abspülen in Aqua dest.	
14. Lösung F (schnell aufsteigende Alkoholreihe, Xylol, Eindecken)	60 min

Ergebnis und Diskussion

Farbaffinitäten: Somatotropin-Zellen = gelb-orange, Prolaktin-Zellen = rot, Gonadotropin-Zellen = hellblau, Thyreotropin-Zellen = mittelblau, Kerne = violett, Erythrozyten = leuchtendrot, Bindegewebe = hellblau.

Die oben beschriebene Differentialfärbung erlaubt es, im HVL männlicher und nichtgravider weiblicher Hunde, Kaninchen, Meerschweinchen und Affen unter physiologischen Bedingungen Somatotropin- und Prolaktin-Zellen nachzuweisen. Bei diesen 4 Spezies waren die Prolaktin-Zellen immer in reichlicher Anzahl vorhanden (Abb. 1—4). Dagegen konnten wir in Hypophysen männlicher und nichtgravider weiblicher Ratten, Mäuse und Hamster nur vereinzelt schwach granulierten Prolaktin-Zellen darstellen. Während verschiedener Reproduktionsphasen (Schwangerschaft, Laktation) und unter pathologischen Bedingungen (oestrogeninduzierte Hypophysentumoren) lassen sich jedoch auch bei der Ratte Prolaktin-Zellen in größerer Menge nachweisen (Abb. 5—8).

In den oestrogeninduzierten Hypophysentumoren der Ratte befinden sich die Prolaktin-Zellen in verschiedenen Funktionszuständen und besitzen einen unterschiedlichen Granulagehalt (Abb. 8).

Da die Menge der morphologisch erfaßbaren Granula mit dem Hormongehalt der Hypophyse im allgemeinen gut übereinstimmt, erlaubt dieses einfache histologische Nachweisverfahren eine semiquantitative Aussage über den Prolaktin- bzw. Somatotropingehalt des HVL. Diese Erfahrung wurde z.B. an der Ratte

¹ Die Farbstoffe stammen von der Fa. Edward Gurr, Ltd., London.

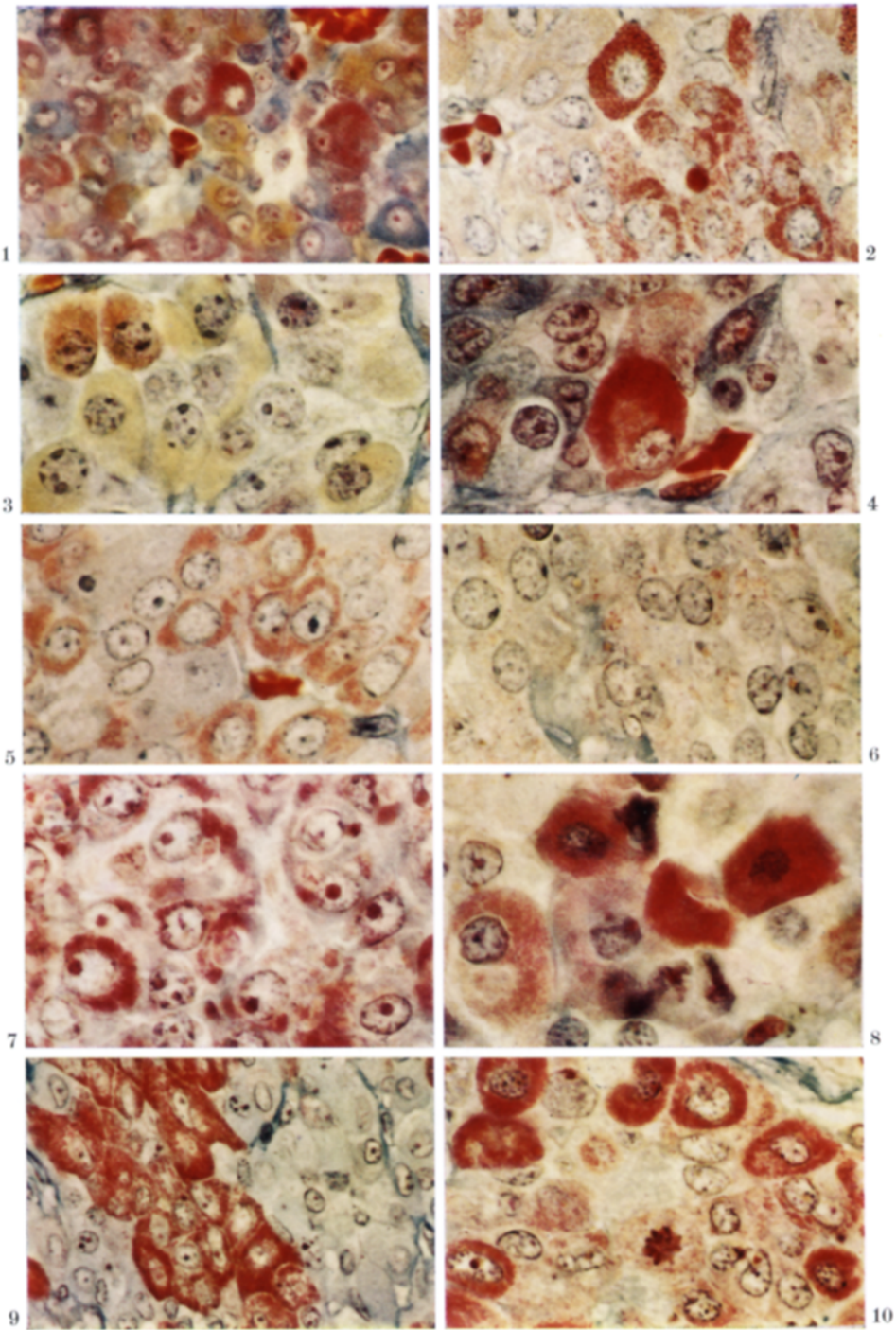


Abb. 1—10

während der Laktation bestätigt (Abb. 5 und 6) (vgl. Dohm, 1963; Purves, 1966; Herlant und Pasteels, 1967; Pasteels, 1971).

Beim Hund konnten wir im Oestrus und während der Schwangerschaft eine starke Vermehrung der Prolaktin-Zellen im HVL feststellen. Die Somatotropin-Zellen nahmen dabei zahlenmäßig ab (Abb. 9 und 10). Ähnliche Befunde sind vom Menschen und den anderen bisher während der Schwangerschaft untersuchten Säugetierspezies (z.B. Ratte, Fledermaus, Maulwurf, Katze, Dachs) bekannt. Dadurch erfährt auch die Spezifität der angewendeten Technik ihre Bestätigung (vgl. Herlant, 1964; Purves, 1966; Herlant und Pasteels, 1967; 1971).

Abb. 1. HVL eines weiblichen geschlechtsreifen Hundes. Neben Prolaktin-Zellen (rot) und Somatotropin-Zellen (gelb-orange) sind die Gonadotropin-Zellen (hellblau) dargestellt. Färbung: Carmoisin L, Orange G, Anilinblau, saures Alizarinblau. Vergr. etwa 500fach

Abb. 2. HVL eines weiblichen geschlechtsreifen Kaninchens. Die Prolaktin-Zellen (rot) sind groß und zeichnen sich besonders durch die Größe der Granula aus. Färbung: Carmoisin L, Orange G, Anilinblau, saures Alizarinblau. Vergr. etwa 800fach

Abb. 3. HVL eines weiblichen geschlechtsreifen Meerschweinchens. Die Prolaktin-Zellen sind Carmoisin L-positiv (rot) und die Somatotropin-Zellen Orange G-positiv (gelb). Beide Zelltypen sind nebeneinander deutlich dargestellt. Färbung: Carmoisin L, Orange G, Anilinblau, saures Alizarinblau. Vergr. etwa 800fach

Abb. 4. HVL eines weiblichen geschlechtsreifen Affens. Ein auffälliges Charakteristikum der Prolaktin-Zellen (rot) ist die Zellgröße und das Auftreten eines ringförmigen hellen Plasma-bezirkes, der dem Golgfeld entspricht. Färbung: Carmoisin L, Orange G, Anilinblau, saures Alizarinblau. Vergr. etwa 800fach

Abb. 5. HVL einer laktierenden Ratte. Nach 16stündiger Entfernung der Jungtiere sind die Prolaktin-Zellen stark vermehrt und mit entsprechend hohem Granulagehalt. Färbung: Carmoisin L, Orange G, Anilinblau, saures Alizarinblau. Vergr. etwa 800fach

Abb. 6. HVL einer laktierenden Ratte. Nach vorhergehender 16stündiger Entfernung läßt das Zusetzen der Jungtiere zum Muttertier für 30 min (Saugreiz) die Prolaktin-Zellen zwar noch (wie in Abb. 5) zahlreich erkennen, hat jedoch eine Reduzierung des Granulagehaltes zur Folge. Färbung: Carmoisin L, Orange G, Anilinblau, saures Alizarinblau. Vergr. etwa 800fach

Abb. 7. Hypophysenadenom einer weiblichen Ratte nach 78wöchiger Behandlung mit 2,0 mg/kg (während der ersten 30 Wochen); 0,5 mg/kg (während der weiteren 9 Wochen); 0,25 mg/kg (während der letzten 39 Wochen) Oestradiolvalerianat i.m. jede 3. Woche. Das Adenom besteht fast ausschließlich aus Carmoisin L-positiven Prolaktin-Zellen. Färbung: Carmoisin L, Orange G, Anilinblau, saures Alizarinblau. Vergr. etwa 800fach

Abb. 8. Hypophysenadenom einer männlichen Ratte nach 78wöchiger Behandlung mit Oestradiolvalerianat i.m. jede 3. Woche (Dosis wie in Abb. 7 angegeben). Die Prolaktin-Zellen befinden sich in verschiedenen Funktionszuständen, die man anhand des Granulagehaltes, der Zellgröße, der Kerngröße und der Größe des Golgisystems beurteilen kann. Färbung: Carmoisin L, Orange G, Anilinblau, saures Alizarinblau. Vergr. etwa 800fach

Abb. 9. HVL eines weiblichen geschlechtsreifen Hundes am 2. Tag des Duldungsstadiums. Chromophob erscheinende und gut identifizierte Prolaktin-Zellen sind stark vermehrt. Färbung: Carmoisin L, Orange G, Anilinblau, saures Alizarinblau. Vergr. etwa 400fach

Abb. 10. HVL eines schwangeren Hundes am ca. 20. Tag der Schwangerschaft. Die Prolaktin-Zellvermehrung ist auffallend und wird durch Mitose-Figuren im Bild verdeutlicht. Färbung: Carmoisin L, Orange G, Anilinblau, saures Alizarinblau. Vergr. etwa 800fach

Bei der Anwendung des von uns beschriebenen histologischen Verfahrens zur Lokalisation von Wachstumshormon und Prolaktin produzierenden Zellen des HVL sind die nachfolgend aufgeführten Punkte zu berücksichtigen:

Die Identifizierung der verschiedenen Zelltypen ist nicht möglich, wenn nur stark aktive Zellen ohne gespeicherte Granula vorhanden sind, da hier das färberisch darzustellende Substrat fehlt (vgl. Herlant und Pasteels, 1967; Pasteels, 1971).

Die Tötung der Versuchstiere mit Chloroform oder Äther ist ungeeignet, da im Verlauf des Narkose-Stress eine Freisetzung von Prolaktin erfolgt (vgl. Herlant und Pasteels, 1967). Wegen der dadurch bedingten Degranulierung lassen sich die Prolaktinzellen schlecht nachweisen. Wir empfehlen deshalb, die Tiere entweder durch Genickschlag, Dekapitation oder durch Entbluten im Evipanrausch zu töten.

Wesentlich für die Erzielung guter Ergebnisse ist ferner die Auswahl geeigneter Fixierungsmittel: Bouinsche Flüssigkeit, Stievsches Gemisch, Formol u. a. sind für die Anwendung dieser Technik unbrauchbar. Die angegebenen Fixierungszeiten müssen eingehalten werden (vgl. Pasteels, 1971).

Wichtig ist weiter die Schnittführung im HVL, da die verschiedenen Zelltypen bei den einzelnen Spezies ein bestimmtes topographisches Verteilungsmuster zeigen (vgl. Dohm, 1963; Herlant, 1964, Purves, 1966).

Die Färbevorschrift (Reagentien, Färbezeiten usw.) muß genau eingehalten werden.

Trotz Berücksichtigung der obengenannten Bedingungen können bei der Verwendung neuer Reagentien Schwierigkeiten bei der Differenzierung auftreten, die aber durch abwägendes Erproben der entsprechenden Arbeitsgänge zu beheben sind. Unterschiedliche Farbstoffqualitäten lassen eine absolute Vereinheitlichung des Differenzierungsvorganges nicht zu. Dennoch wird ein erfahrener Zytologe in der Lage sein, eine Verwechslung der beiden Zelltypen weitgehend zu vermeiden, da er eine nicht stattgefundene oder unvollständige Differenzierung leicht erkennen kann. Dabei wird ihm die Berücksichtigung der unterschiedlichen Morphologie und das Verteilungsmuster beider Zelltypen behilflich sein (vgl. Pasteels, 1971).

Acknowledgment. Für die Hilfe bei der Zusammenstellung der Arbeit möchten wir Frau R. Biermann herzlich danken.

Literatur

- Brookes, L. D.: A stain for differentiating two types of acidophil cells in the rat pituitary. *Stain Technol.* **43**, 41—42 (1968).
- Cleveland, R., Wolfe, J. M.: A differential stain for the anterior lobe of the hypophysis. *Anat. Rec.* **51**, 409—413 (1932).
- Dawson, A. B., Friedgood, H. B.: Differentiation of two classes of acidophiles in the anterior pituitary of the female rabbit and cat. *Stain Technol.* **13**, 17—21 (1938).
- Dohm, G.: Fortschritte der Histophysiologie des Hypophysenvorderlappens. *Klin. Wschr.* **41**, 1117—1125 (1963).
- Dubois, M. P., Herlant, M.: Caractères cytologiques des cellules gonadotropes, thyroïdiques, corticotropes, somatotropes et des cellules à prolactine présentes dans le lobe antérieur de l'hypophyse des bovins. *Ann. Biol. anim.* **8**, 5—26 (1968).
- Herlant, M.: Étude critique de deux techniques nouvelles destinées à mettre en évidence les différentes catégories cellulaires présentes dans la glande pituitaire. *Bull. Micr. appl.* **10**, 37—44 (1960).

- Herlant, M.: The cells of the adenohypophysis and their significance. *Int. Rev. Cytol.* **17**, 299—382 (1964).
- Herlant, M., Pasteels, J. L.: Histophysiology of human anterior pituitary. *Meth. Achiev. exp. Path.* **3**, 250—305 (1967).
- Herlant, M., Pasteels, J. L.: Les cellules productrices de prolactine, la régulation de leur sécrétion et leur rôle dans les adénomes sécrétant la prolactine. In: Les adénomes hypophysaires sécrétants, Endocrinopathies et immunologie, p. 21—41. Paris: Masson & Cie 1971.
- Kracht, J., Hachmeister, U.: Hormonbildungsstätten im Hypophysenvorderlappen des Menschen. In: Oestrogene, Hypophysentumoren, Ed.: Kracht, J., S. 200—205. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1969.
- Pasteels, J. L.: Morphology of prolactin secretion. In: Ciba Foundation Symposium on lactogenic Hormones. Ed.: Wolstenholme, G. E. W., Knight, I., p. 241—255. London: Livingstone 1971.
- Purves, H. D.: Cytology of the adenohypophysis. In: The pituitary gland. Ed.: Harris, G. W., Donovan, B. T., Vol. 1, p. 147—232. London: Butterworths 1966.
- Romeis, B.: Die Hypophyse. In: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. Ed.: von Möllendorf, W., Bd. 6, 3. Teil. Berlin-Heidelberg: Springer 1940.
- Weidner, W., Gropp, C., Hachmeister, U.: Lokalisation von Wachstumshormon und Prolaktin in differenten acidophilen Zellen des Hypophysenvorderlappens. *Symp. Dtsch. Ges. Endokrin.* **16**, 315—316 (1970).
- Wittkowski, W.: Drüsenzelltypen und Hormonlokalisation im Hypophysenvorderlappen. *Dtsch. med. Wschr.* **96**, 1225—1228 (1971).

Dr. med. vet. M. F. El Etreby
Dept. f. exp. Toxikologie
Schering AG.
D-4619 Bergkamen
Waldstr. 14
Bundesrepublik Deutschland