

lamina of the thyroid follicles they often lie singly, or in groups of up to 5 cells, between which there are many fine interdigitations. The parafollicular cell nuclei have irregular contours and 1 or 2 nucleoli. In the cytoplasm, the ergastoplasm has many flattened sacs and there are many free ribosomes. There are typically residual bodies, dense secretory granules and occasional cilia (Figure 3).

A further specific influence of calcium acetate and vitamin D₃ on the parafollicular cells was shown by determining with the electron microscope the percentage of parafollicular cells in every 500 cells of thyroid secretions selected at random. The results are presented in the Table.

The results show that with the longest experimental period the percentage of parafollicular cells was nearly 4

times that of the control. The application of calcium acetate to the solution, with a simultaneously increased absorption of calcium in the intestine due to the vitamin D₃, results in an augmented production of thyrocalcitonin. The increased number of parafollicular cells shows a close relationship between these cells on the one hand and the increased calcium concentration of the blood in the other. The observed variability of the electron density of the secretory granules of the parafollicular cells may be interpreted as different stages of maturation of these granules, whereas the presence of residual bodies suggests a lysosomal participation in the control of the synthesis and secretion of the hormone. The results show that thyrocalcitonin is probably synthesized in the parafollicular cells of the thyroid gland.

Zusammenfassung. Nach langdauernder Verabreichung von Calciumacetat und Vitamin D₃ kann eine Vermehrung der parafollikulären Zellen beobachtet werden. Die mögliche Bedeutung der parafollikulären Zellen bei der Bildung von Thyreocalcitonin wird diskutiert.

H. P. ROHR and K. HASLER

Institute of Pathology, Department of Electron-microscopy, Basel (Switzerland), 18 September 1967.

No. of rats	Duration of experiment	Total quantita of calcium acetate and vitamin D ₃	% of parafollicular cells
2	controls	—	2.1
2	9 days	350 ml	4.1
2	14 days	505 ml	6.5
4	28 days	1300 ml	7.1

Einfluss von Angiotensin auf das argentaffine System des Meerschweinchens

Im Rahmen einer Untersuchung über das Verhalten der argentaffinen Zellen (a.Z.) des Meerschweinchendarms in vitro unter dem Einfluss verschiedener Substanzen fiel auf, dass die Zahl der a.Z. nach Zugabe von Hypertensin (CIBA) zur Inkubationsflüssigkeit, entgegen unseren Erwartungen, zunahm. Systematische Untersuchungen an einer grösseren Reihe von Tieren bestätigten diesen Befund.

Material und Methode. Die Versuche wurden mit dem Duodenum des Meerschweinchens gemacht. Es handelte sich um Tiere beiderlei Geschlechts, 600–900 g schwer, aus dem Stall des Kantonsspitals Lausanne. Als Inkubationslösung diente ein Krebs-Ringer-Bikarbonat-Puffer (pH 7,4), der vor und während des Versuchs mit Oxy-carbon (95% O₂ und 5% CO₂) begast wurde. Die Inkubationsgefässe mit je 10 ml der Lösung wurden während des Versuchs in einem Wasserbad von 37°C mechanisch geschüttelt. Die Versuchsdauer betrug immer 10 min.

Die Meerschweinchen wurden mit Chloroform getötet. Die Entnahme des Duodenums erfolgte unmittelbar nach dem Tod. Das Darmstück wurde längs geöffnet und quer in ungefähr 5 mm breite Streifen geschnitten, die von proximal nach distal nummeriert wurden. Nach Abschluss der Versuche erfolgte die Fixation in einer 4%igen gepufferten Formollösung. Das Material wurde in Paraplast eingebettet und 10 µ dick geschnitten. Die alkalische Diazokupplungsreaktion mit Echtsalz B (Bayer) und die Methode nach MASSON-HAMPERL dienten zur Darstellung der a.Z. Ihre Anzahl wurde lichtmikroskopisch an 100 längsgetroffenen Krypten bestimmt¹.

Da die Zahl der a.Z. am unbehandelten, sofort nach der Tötung des Tieres entnommenen und fixierten Duodenum von proximal nach distal stark abnimmt, haben wir in

dieser Arbeit nur das orale Drittel des Duodenums berücksichtigt.

Das Untersuchungsgut umfasst insgesamt 26 Meerschweinchen. In einer ersten Serie von 10 Tieren wurde der erste Darmstreifen sofort nach dem Tode des Tieres in der Formollösung fixiert (Gruppe A). Die Gewebstücke Nr. 2 und 3 wurden inkubiert. Hypertensin (CIBA) wurde wechselweise in einer Dosis von 2 µg/ml den Streifen 2 oder 3 zugesetzt. Das andere Darmstück blieb während des Versuchs in der reinen Inkubationslösung liegen. Die mit Hypertensin behandelten Streifen wurden in der Gruppe B zusammengefasst, diejenigen, die während der gleichen Zeit in der reinen Inkubationslösung lagen, in der Gruppe C.

In der zweiten Serie wurde die Hypertensinkonzentration auf 1 ng/ml reduziert. Bei den ersten 8 Tieren wurde sonst gleich vorgegangen wie bei der ersten Serie, bei den 2 letzten Tieren wurden dagegen die Streifen Nr. 3 sofort fixiert, die Stückchen 1 und 2 inkubiert und den Streifen 2 das Hypertensin zugesetzt. Wiederum wurden die entsprechenden Gewebstücke in Gruppen A, B und C zusammengefasst.

Da dem im Handel befindlichen Hypertensin noch Mannit beigefügt wird, untersuchten wir schliesslich das Verhalten der a.Z. des Duodenums von 6 weiteren Meerschweinchen unter dem Einfluss von 1 ng/ml Mannit.

Für die einzelnen Gruppen wurde das arithmetische Mittel (M) und die Standardabweichung (σ) berechnet.

¹ T. HARDMEIER und CHR. HEDINGER, Virchows Arch. path. Anat. Physiol. 338, 332 (1965).

Zur Ermittlung der Signifikanz von unterschiedlichen Mittelwerten wurde der *t*-Test von FISHER verwendet.

Resultate. Die Einzelergebnisse der Zählungen der mittels der Diazokupplungsreaktion dargestellten argentaffinen Zellen sind aus Tabelle I ersichtlich. Die Werte der mit Hypertensin behandelten Streifen liegen in beiden Serien mit einer Ausnahme (Serie I, Tier 8) höher als die entsprechenden Kontrollwerte. Bei den nach der Methode von MASSON-HAMPERL gefärbten Schnitten erhielten wir im wesentlichen die gleichen Resultate. Die Streuung war aber grösser, der Unterschied der Mittelwerte daher mit je 10 Versuchen noch nicht signifikant.

Die entsprechenden Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle II zusammengefasst. In der Serie I liegt der Mittelwert der Gruppe B um 96 Zellen höher als der entsprechende Wert der Gruppe A. Gegenüber der Gruppe C beträgt der Unterschied 135. Die Verhältnisse liegen ähnlich in der zweiten Serie. Die Berechnungen nach dem *t*-Test ergeben, dass diese Differenzen signifikant sind. Hingegen unterscheiden sich die Mittelwerte der Gruppe Ib und IIb nicht signifikant voneinander (*P* über 0,2). In den mit Mannit behandelten Darmstücken konnte keine Zunahme der a.Z. beobachtet werden.

In der Figur sind schliesslich die Mittelwerte der einzelnen Gruppen mit der mittleren Streuung der Mittelwerte ($\sigma/\sqrt{n}$; *n* = Anzahl der Fälle) dargestellt.

Diskussion. Wie die vorliegenden Untersuchungen zeigen, nimmt die Zahl der mit der Diazokupplungsreaktion färbbaren Zellen im Duodenalepithel des Meerschweinchens unter Hypertensin auch in kleinen Dosen zu. Da

die Diazokupplungsreaktion wahrscheinlich durch das 5-Hydroxytryptamin in den argentaffinen Zellen ausgelöst wird²⁻⁶, muss man vermuten, dass der Serotoningehalt der argentaffinen Zellen unter Hypertensin derart

Tabelle II. Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanz der Differenzen, der Anzahl der argentaffinen Zellen

Serie I		A	B	C
		Kontrolle	Hypertensin 2 µg/ml	Kontrolle
Anzahl argentaffiner Zellen pro 100 Krypten	(M)	281	377	242
Standardabweichung	(σ)	± 51	± 92	± 64
Signifikanz der Differenzen	(P)	< 0,01		< 0,005

Serie II		Kontrolle	Hypertensin 1 ng/ml	Kontrolle
Anzahl argentaffiner Zellen pro 100 Krypten	(M)	294	430	210
Standardabweichung	(σ)	± 76	± 107	± 53
Signifikanz der Differenzen	(P)	< 0,005		< 0,001

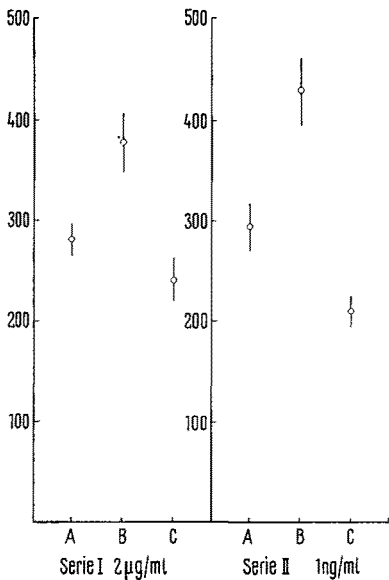
A, Formolkontrolle; B, nach Behandlung mit Hypertensin; C, Kontrolle in reiner Inkubationslösung.

Tabelle I. Anzahl der argentaffinen Zellen pro 100 längsgetroffene Krypten im oberen Drittel des Duodenums. Darstellung der Zellen mit der Diazokupplungsreaktion

Serie I	A	B	C
Nr.	Kontrolle	Hypertensin 2 µg/ml	Kontrolle
1	238	428	247
2	214	354	100
3	317	364	312
4	308	334	262
5	273	380	285
6	278	338	258
7	320	609	257
8	375	337	216
9	275	362	307
10	213	260	181

Serie II	A	B	C
Nr.	Kontrolle	Hypertensin 1 ng/ml	Kontrolle
1	321	350	300
2	220	243	223
3	350	375	160
4	428	650	223
5	316	450	183
6	377	490	142
7	260	387	202
8	207	450	220
9	208	420	158
10	254	490	288

A, Formolkontrolle; B, nach Behandlung mit Hypertensin; C, Kontrolle in reiner Inkubationslösung.



Anzahl der argentaffinen Zellen: A, Formolkontrolle; B, nach Behandlung mit Hypertensin (CIBA); C, Kontrolle in reiner Inkubationslösung. Dargestellt sind die Mittelwerte und die mittlere Streuung der Mittelwerte

² V. ERSFAMER und B. ASERO, *Nature* 169, 800 (1952).
³ V. ERSFAMER, *Arzneimittel-Forsch.* 3, 151 (1961).
⁴ G. ZBINDEN, A. PLETSCHER und A. STUDER, *Klin. Wschr.* 35, 565 (1957).
⁵ A. STUDER und G. ZBINDEN, *Psychiatria Neurol.* 140, 237 (1960).
⁶ E. P. BENDITT und R. L. WONG, *J. exp. Med.* 105, 509 (1957).

steigt, dass vorher nicht nachweisbare Zellen färbbar werden⁶. Dieses Verhalten ist eher erstaunlich, löst doch das Hypertensin im Nebennierenmark eine Steigerung der Sekretion der Katecholamine aus^{7,8} wie Reserpin⁹, das im Darm aber eine Verminderung des Serotoningehaltes^{10,11} und der Argentaaffinität und damit eine Reduktion der Zahl färbbarer argentaaffiner Zellen bewirkt¹². Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind für die menschliche Pathologie von einer gewissen Bedeutung, da bei verschiedenen Nierenkrankheiten eine Vermehrung der argentaaffinen Zellen des Verdauungstraktes nachgewiesen werden konnte^{13,14}.

Summary. The duodenum of guinea-pigs were dissected immediately after death and incubated for 10 min at 37°C in a solution of Krebs-Ringer-Bicarbonate buffer, in which Hypertensin (CIBA) was added. The result was that the argentaaffine cells were more numerous after the incubation period, as compared with the controls. The 2

controls were pieces placed into the solutions of Formalin and blank Krebs-Ringer-Bicarbonate buffer.

R. HUBER, E. WEBER und CHR. HEDINGER

*Institut d'anatomie pathologique de l'Université,
1000 Lausanne (Schweiz), 25. Oktober 1967.*

⁷ Y. KANEKO, J. W. McCUBBIN und I. H. PAGE, *Circulation Res.* 9, 1247 (1961).

⁸ W. FELDBERG und G. P. LEWIS, *J. Physiol.* 171, 98 (1964).

⁹ G. ZBINDEN und A. STUDER, *Experientia* 14, 201 (1958).

¹⁰ A. PLETSCHER, P. A. SHORE und B. B. BRODIE, *Science* 122, 374 (1955).

¹¹ V. ERSPAMER, *Experientia* 12, 63 (1956).

¹² E. P. BENDITT und R. L. WONG, *Am. J. Path.* 32, 638 (1956).

¹³ H. U. FUNK, E. WEBER und C. HEDINGER, *Virchows Arch. path. Anat. Physiol.* 340, 312 (1966).

¹⁴ Untersuchung mit Unterstützung des Schweizerischen Nationalfonds, Kredit Nr. 3625.

An Electron Microscopic Study of Selective, Acute Degeneration of Sympathetic Nerve Terminals after Administration of 6-Hydroxydopamine

2,4,5-Trihydroxyphenylethylamine or 6-hydroxydopamine (6-HO-DA) has been reported to provoke efficient and extremely long-lasting noradrenaline (NA) depletion in various sympathetically innervated organs of different species¹⁻³. The mechanism of this depletion, however, is not clear. Irreversible damage of NA storage sites^{1,2} as well as stoichiometrical replacement of NA by 6-HO-DA, and/or its metabolites³ have been postulated.

The successful electron microscopic localization of 5-hydroxydopamine (5-HO-DA)⁴ which acts as a false sympathetic transmitter⁵ encouraged the study of possible ultrastructural changes induced by its isomer 6-HO-DA.

Cats were given 4 injections of 20 mg/kg 6-HO-DA i.p. over a period of 48 h at 12 h intervals. Three days, 15 days, 3 and 4 months after the first injection small pieces of iris, vas deferens, spleen capsule and right heart auricle were removed, fixed in glutaraldehyde, post-fixed in osmium tetroxide and embedded for electron microscopy. The residual parts of the organs were homogenized and their NA content was determined according to the method described by BERTLER et al.⁶.

The animals tolerated the serial injections and after-effects without serious complications. After the first injection of 6-HO-DA they showed signs of more or less intensive peripheral sympathomimetic stimulation such as pupillary dilatation and hair erection on the back and tail.

In animals sacrificed 3 days after the first injection of 6-HO-DA the NA content of all organs studied was decreased to less than 10% of that of controls. At this time ultrathin sections of the spleen capsule, a tissue which contains only adrenergic nerves⁷, revealed that virtually all autonomic nerve endings were in various stages of degeneration whereas the surrounding Schwann cells and smooth muscle cells appeared intact (Figure 1). Some of the nerve terminals occasionally contained still recognizable ultrastructural components such as dense core vesicles and mitochondria. In others the alterations had already attained such a degree that it was possible to recognize them only by their typical topographical localization between smooth muscle cells and/or the surrounding Schwann cells.

In the iris and vas deferens where adrenergic and cholinergic nerves often lie side by side^{7,8}, the changes were even more impressive since only the adrenergic terminals were degenerated, whereas the cholinergic ones, i.e. terminals with empty vesicles, appeared completely normal (Figures 2 and 3). Two weeks after the treatment the images of degenerated nerves had all disappeared. The tissue sections resembled the normal ones with the exception that virtually no adrenergic nerve terminals, i.e. terminals containing dense core vesicles, were present.

Thus it can be concluded that the noradrenaline depletion by 6-HO-DA results from an acute degeneration of the adrenergic nerve terminals. It is notable that all other structures including the cholinergic nerve terminals remained intact. It seems most plausible that 6-HO-DA is taken up selectively by the sympathetic nerves in a manner similar to NA, the physiological transmitter. It remains to be elucidated if 6-HO-DA is also stored in the vesicles. Once concentrated in the nerve terminals 6-HO-DA and/or its metabolites, which might possibly be formed, provoke their degeneration by a mechanism which remains obscure. 6-HO-DA is a strong reducing agent and in neutral aqueous solution it undergoes rapid oxidation. This property might partially be responsible for the degenerations observed in the nerve terminals.

The selective degeneration of the adrenergic nerves occurs only in the distal part of the neuron, and not in the perikaryon. Indeed, 3-4 months after treatment nerve terminals with dense core vesicles had regenerated in all

¹ C. C. PORTER, J. A. TOTARO and C. A. STONE, *J. Pharmac. exp. Ther.* 140, 308 (1963).

² R. LAVERTY, D. F. SHARMAN and M. VOGT, *Br. J. Pharmac. Chemother.* 25, 549 (1965).

³ C. C. PORTER, J. A. TOTARO and A. BURCIN, *J. Pharmac. exp. Ther.* 150, 17 (1965).

⁴ J. P. TRANZER and H. THOENEN, *Experientia* 23, 743 (1967).

⁵ H. THOENEN, W. HAEFELY, K. F. GEY and A. HÜRLIMANN, *Arch. exp. Path. Pharmac.* 257, 342 (1967).

⁶ A. BERTLER, A. CARLSSON and E. ROSENGREN, *Acta physiol. scand.* 44, 273 (1958).

⁷ H. THOENEN, J. P. TRANZER, A. HÜRLIMANN and W. HAEFELY, *Helv. physiol. pharmac. Acta* 24, 229 (1966).

⁸ J. P. TRANZER and H. THOENEN, *Experientia* 23, 123 (1967).