

Aus der Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie der Freien Universität Berlin
und aus dem Hauptlaboratorium der Schering-A.G. Berlin

Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Wirkungen von ACTH und Stress auf die Nebennierenrinde der Ratte*

Von

W. SCHWARZ, H.-J. MERKER und G. SUCHOWSKY

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 31. Oktober 1961)

Die verschiedenen Funktionszustände der Nebennierenrinde, die durch ACTH reguliert werden, können lichtmikroskopisch an einer Veränderung der Rinden dicke, der Kernvolumina und der Fettverteilung beurteilt werden (Literatur s. BACHMANN 1954). Die Veränderungen an den Zellorganellen sind wegen ihrer Größenordnung dabei nicht darzustellen. Deshalb können die Zellbestandteile, die bei der Synthese von Corticosteroiden eine Rolle spielen, nur durch biochemische Untersuchungen von Zellfraktionen und elektronenmikroskopische Untersuchungen von Dünnschnittschnitten erfaßt werden. Hier liegen nur wenige elektronenmikroskopische Untersuchungen vor.

LEVER (1955, 1956) verlegte die Synthese der Corticosteroide in die Mitochondrien, die in der Zona fasciculata keine Cristae, sondern Tubuli besitzen. In der Mitochondrienmatrix fand er Anhäufungen einer osmiophilen Substanz, die er mit der Produktion von Corticosteroiden in Zusammenhang brachte. Nach Hypophysektomie nahm die Zahl der Mitochondrien und die Menge der osmiophilen Substanz ab. Die Substitution mit ACTH hob diese Wirkungen wieder auf. BELT und PLEASE (1956) konnten einen tubulären Innenaufbau der Mitochondrien noch in anderen steroidproduzierenden Organen nachweisen. Auch SABATINI und DE ROBERTIS (1961) nahmen die Entstehung der Corticosteroide in den Mitochondrien an, die aber einen vesikulären Aufbau haben sollen. Gleichzeitig fanden sie im Cytoplasma kleine Bläschen und vermuteten deshalb eine Ausstoßung der Vesiculae aus den Mitochondrien in das Cytoplasma. Auch experimentell konnte ein Zusammenhang zwischen Mitochondrien und Corticostroidproduktion elektronenmikroskopisch gefunden werden. LUFT und HECHTER (1957) fanden an isolierten Nebennieren nur bei intakten Mitochondrien eine Hormonausschüttung. Nach Formalinstress sahen MÖLBERT et al. (1960) hauptsächlich Veränderungen an den Mitochondrien. Eine Vermehrung und Vergrößerung der Mitochondrien stellten ASHWORTH et al. (1959) nach Stress und Gaben von ACTH fest. Außerdem beobachteten sie im Cytoplasma noch ein Auftreten von Vesiculae, die sie für eine besondere Form des endoplasmatischen Reticulums hielten. CARR (1961) fand nach ACTH-Gaben in der menschlichen Nebennierenrinde ebenfalls eine Vermehrung der Mitochondrien und der Strukturen des endoplasmatischen Reticulums. ÜBERBERG (1960) sah nach Cortisongaben ein Auftreten von großen Vacuolen im Cytoplasma. Er hielt sie für aufgeblähte Teile des endoplasmatischen Reticulums, das er für eine Stapelung der Corticosteroide verantwortlich machte.

Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß die Mitochondrien an der Produktion der Corticosteroide wesentlich beteiligt sind. Die morphologischen Veränderungen, die dabei auftreten, wurden jedoch verschieden beschrieben und gedeutet. Unklar bleibt auch der Aufbau und die Bedeutung des endoplasmatischen Reticulums in der Nebennierenrinde.

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Die biochemischen Befunde an Mikrosomenfraktionen sprechen für eine Beteiligung des endoplasmatischen Reticulums an der Corticosteroidsynthese (BUCHER et al. 1956, HAYANO et al. 1956 und LYNN et al. 1958). FAWCETT et al. (1961) haben auch in den interstitiellen Hodenzellen des Opossums die Bedeutung des endoplasmatischen Reticulums (ohne RNS-Granulabesatz) für die Steroidsynthese elektronenmikroskopisch nachweisen können. Darüber hinaus ist die Natur und Funktion der Vacuolen, die von einigen Untersuchern in den Fasciculatazellen beschrieben wurden, unklar geblieben. Die morphologischen Veränderungen an den Zellorganellen bei der Corticosteroidproduktion lassen sich in einer normal arbeitenden Nebennierenrinde nur schlecht erfassen.

Erst ein Vergleich von Nebennierenrinden, die äußerst unterschiedliche Hormonmengen produzieren, ermöglicht eine sichere Erkennung und Deutung der Strukturveränderungen. Solche extremen Bedingungen können durch Hypophysektomie und ACTH-Gaben geschaffen werden.

Material und Methoden

Die Untersuchungen wurden an 80—100 g schweren Rattenböcken eines Sprague-Dawley-Stammes vorgenommen. 25 Tiere wurden hypophysektomiert, davon wurden 12 Tieren am 4. Tag danach die Nebennierenrinden zur elektronenmikroskopischen Untersuchung herausgenommen. Die restlichen 13 Ratten erhielten am 1., 2. und 3. Tag nach der Hypophysektomie eine Injektion eines ACTH-Depots in Gelatine mit Phenol von 0,5 cm³ (0,25 IE) und wurden am 4. Tag zur Entnahme der Nebennierenrinde getötet. Sieben normale Ratten ohne jegliche Behandlung bzw. Stress dienten als Kontrollen. Bei sieben anderen Ratten wurde die linke Nebenniere entfernt, ihre rechte bei zwei Tieren nach 2 Std und bei fünf Tieren nach 4 Tagen zur Untersuchung entnommen. Zwei normale Tiere erhielten eine Injektion von 0,2 ml Cortisol-21-Acetat, was einer Dosis von 10 mg/100 g Körpergewicht entspricht. Ihre Nebennieren wurden für die elektronenmikroskopische Untersuchung nach 2 Std fixiert. Bei neun normalen Tieren wurde die linke Nebenniere entfernt und gleichzeitig Cortisol-21-Acetat in verschiedenen Dosen gespritzt (drei Tiere 10 mg/100 g Körpergewicht, drei Tiere 3 mg/100 g Körpergewicht, drei Tiere 1 mg/100 g Körpergewicht). Ihre rechten Nebennieren wurden dann 2 Std später zur Untersuchung entnommen.

Fixierung der Nebennieren: 1% OsO₄-Lösung in Veronalacetatpuffer (pH 7,4) mit Saccharosezusatz. Einbettung: Butyl-Methylmethacrylat 30:70. Mikrotom: Porter-Blum. Kontrastierung: Uranylacetat, PWS, Bleihydroxyd. Manche Schnitte wurden mit Kohle nachbedampft. Aufnahmen: Zeiss-Elektronenmikroskop EM 8/II (Strahlspannung 40 KV) und Siemens Elmiskop I (Strahlspannung 60 KV).

Befunde

In dieser Arbeit sollen nur die Zellorganellen und ihre Veränderungen bei den verschiedenen Funktionszuständen in der Zona fasciculata berücksichtigt werden. Auf die Morphologie der Zelloberfläche, des subendothelialen Raumes und der Capillaren kann hier nicht eingegangen werden.

Die Fasciculatazellen von normalen und unbeeinflußten Ratten haben einen großen ovalen oder runden *Kern*, der gleichmäßig mit Granula angefüllt ist (Abb. 1). Ein zentral gelegener Nucleolus zeigt die übliche Form und Größe. Die doppelte Kernmembran ist reichlich mit Poren von 400—500 Å Weite besetzt. Das *endoplasmatische Reticulum* ist im Zelleib gleichmäßig verteilt und besteht aus Vesiculae und Tubuli, deren Durchmesser zwischen 200 und 600 Å schwankt. Ihren Membranen sitzen keine RNS-Granula auf. Sie haben oft enge Beziehungen zu den Fetteinschlüssen und den Mitochondrien. Freie RNS-Granula liegen in Gruppen im Cytoplasma verstreut. Alle Fasciculatazellen enthalten zahlreiche stark osmiophile und homogene *Fetteinschlüsse* mit einer Größe von 2000 Å bis 2 μ, die mitunter kleine Vacuolen besitzen. Die Form der

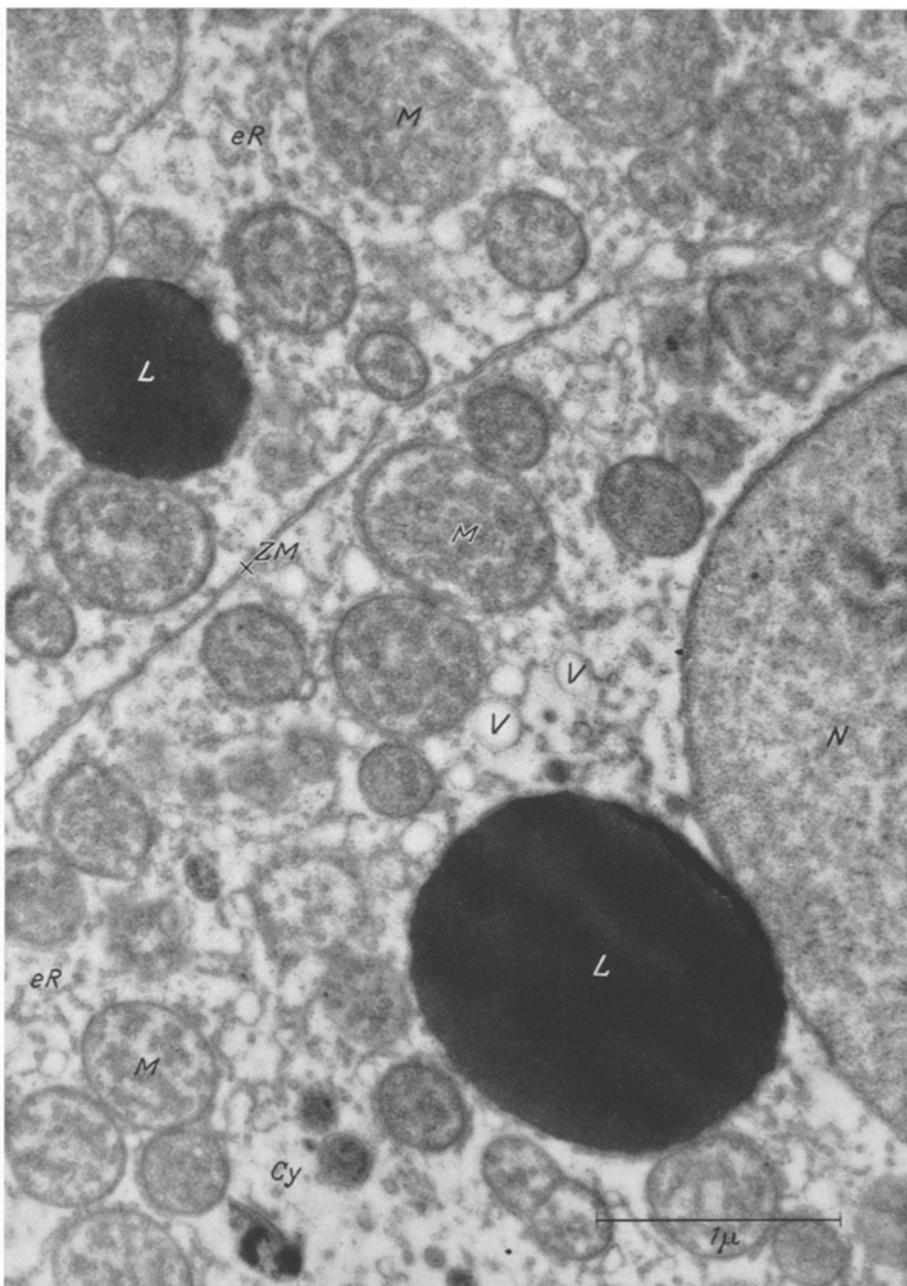


Abb. 1. Fasciculatazellen aus der Nebennierenrinde einer normalen unbehandelten Ratte. *Cy* Cytosom, *eR* endoplasmatisches Reticulum, *L* Lipoidtropfen, *M* Mitochondrium, *N* Nucleus, *V* Vacuole, *ZM* Zellmembran. 1:31 500

Fetttropfen ist meistens rund. Daneben kommen aber noch andere Fetteinschlüsse mit gezackten Rändern vor. In ihrer unmittelbaren Nachbarschaft liegen Vesiculae, Tubuli oder schalenartig geformte Teile des endoplasmatischen Retikulums (Abb. 3). Im Cytoplasma kommen Vacuolen mit einer Größe von 800 bis

3000 Å vor, die häufig in der Nähe der Mitochondrien liegen. Sie werden durch eine einfache glatte Membran begrenzt und haben keinen elektronendichten Inhalt. Die *Golgi-Zone* besteht aus 3—5 Doppelmembranen, an deren Enden Vesiculae liegen, die von denen des endoplasmatischen Reticulums nicht zu unterscheiden sind.

Die *Mitochondrien* sind in den Fasciculatazellen so zahlreich, daß sie das Bild beherrschen. Ihre Form ist rund bis oval und ihre Länge beträgt etwa 5800 Å. Die äußere Begrenzung wird von einer Doppelmembran gebildet. Im Innern enthalten sie meistens Vesiculae mit einem Durchmesser von 300—600 Å. Mitunter lassen sich aber auch wenige Schräg- oder Längsschnitte von Tubuli darstellen, die dann im Zentrum des Mitochondriums liegen. An manchen Stellen sieht man die Membranen einiger Vesiculae bzw. Tubuli in das innere Blatt der Mitochondrienumhüllung übergehen. Zusammenhänge zwischen den zentral gelegenen Vesiculae und Tubuli und der inneren Mitochondrienumhüllung lassen sich jedoch nicht nachweisen. Seltener sind die äußeren Mitochondrienumhüllungen etwas abgehoben und bilden an diesen Stellen 500—1550 Å große blasige Vorwölbungen. Häufig grenzen Mitochondrien so dicht an Fetttropfen an, daß die äußeren Mitochondrienumhüllungen nicht mehr sicher darzustellen sind (Abb. 2). Von den Mitochondrien lassen sich gut kleinere Zelleinschlüsse abgrenzen, die als *Cytosomen* bezeichnet werden. Sie haben eine runde bis ovale Form und sind 0,2—1 μ groß. Ihr Inhalt ist granulär und sehr elektronendicht.

Neben den typischen Fasciculatazellen kommen noch vereinzelt sehr dichte Zellen vor, in denen die Zellorganellen so eng gepackt sind, daß dadurch der Eindruck einer dunklen Zelle entsteht. In sehr dünnen Schnitten und bei guter Auflösung lassen sich aber auch hier die typischen Zellorganellen darstellen.

Hypophysektomie

Die Fasciculatazellen nach Hypophysektomie zeigen eine besonders starke Einlagerung von Fetttropfen (Abb. 2). Diese Einschlüsse haben entweder sehr bizarre Formen oder sie sind rund und haben dann meistens eine zentrale Vacuole. Die engen räumlichen Beziehungen zum endoplasmatischen Reticulum sind nicht mehr vorhanden. Die Form des endoplasmatischen Reticulums entspricht jedoch dem normalen Bild. Die Menge dieser Strukturen hat aber deutlich abgenommen. Auch kommen weniger freie RNS-Granula und Cytosomen vor. Die Vacuolen im Cytoplasma sind nur noch selten nachzuweisen, dadurch sehen die Zellen heller aus. Die sehr dunklen Zellen, die im normalen Bild vorkommen können, sind nicht mehr vorhanden. Die Mitochondrien haben ihre Form und ihren Aufbau behalten. Ihre Größe ist etwa gleich geblieben (0,58 μ). Blasige Aufreibungen der Mitochondrienumhüllungen sind nirgends zu erkennen.

Hypophysektomie und ACTH

Das endoplasmatische Reticulum hat unter ACTH wieder stark zugenommen (Abb. 3). Die Form und der Durchmesser der Vesiculae und Tubuli haben sich jedoch nicht verändert. Einzelne Teile des endoplasmatischen Reticulums liegen dicht an den Mitochondrien und Fetttropfen. Auch die freien RNS-Granula sind deutlich vermehrt. Die Cytosomen, die nach Hypophysektomie fast völlig ver-

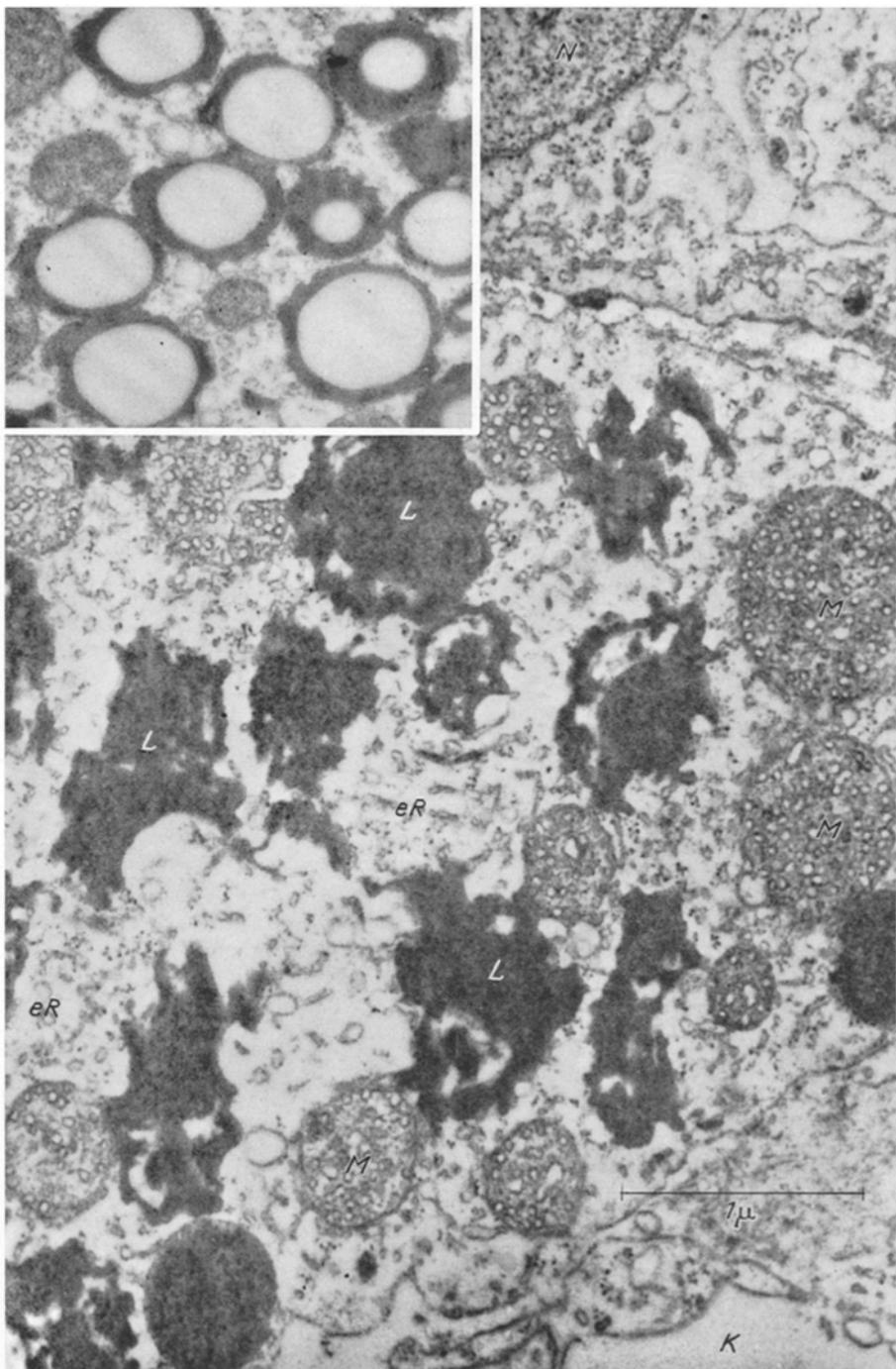


Abb. 2. Fasciculatazelle einer hypophysektomierten Ratte. K Capillare. 1:31 500. Einschub: Lipoidtropfen in einer Fasciculatazelle einer hypophysektomierten Ratte. 1:27 000

schwunden waren, treten jetzt wieder auf. Dagegen hat unter ACTH die Menge der Fetteinschlüsse abgenommen. Die meisten Fetttropfen enthalten eine Vacuole.

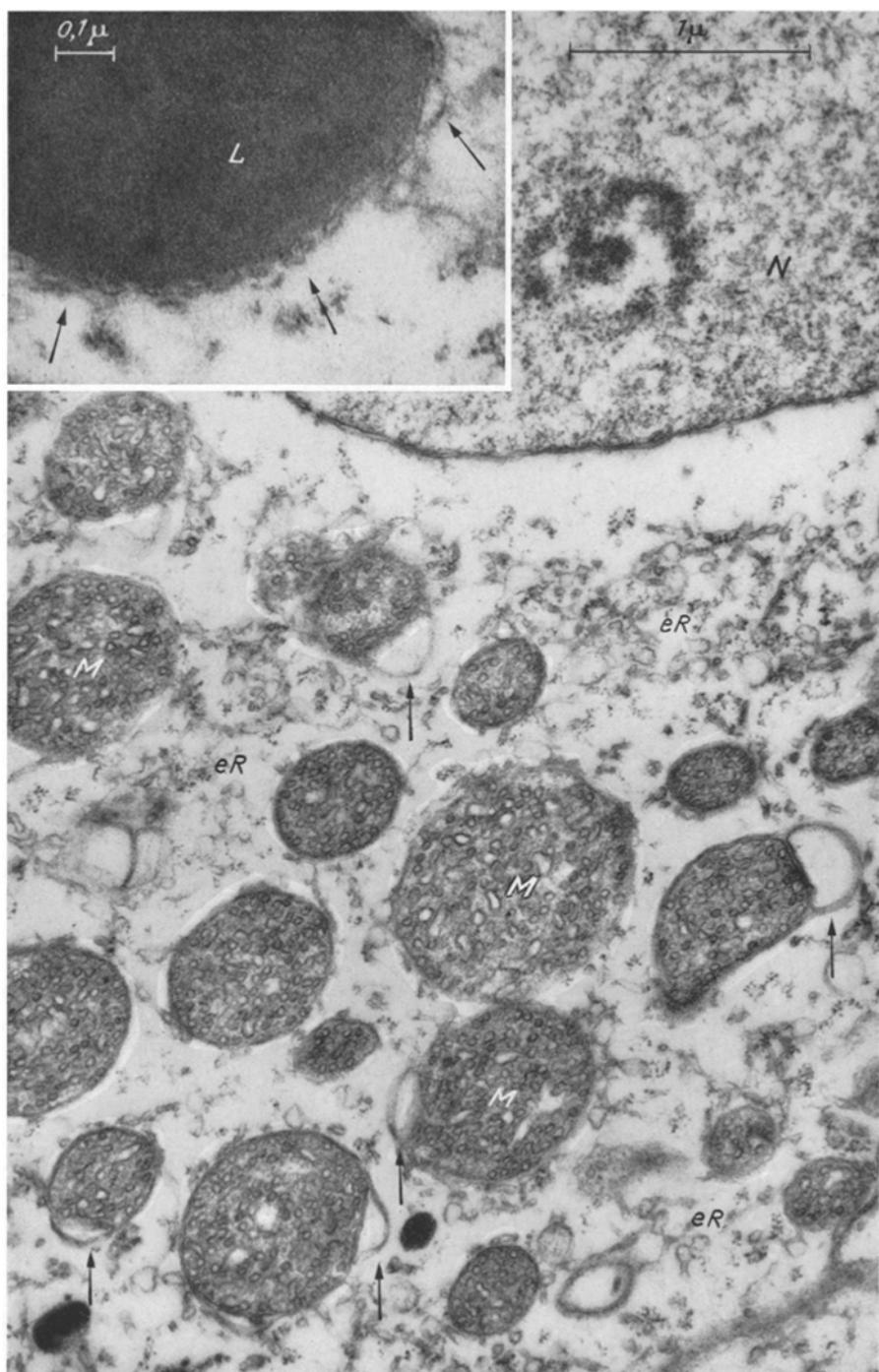


Abb. 3. Fasciculatazelle einer hypophysektomierten, mit ACTH substituierten Ratte. Blasige Vorwölbungen der äußeren Mitochondrienmembran (↓). Einschub: Vesiculäre und tubuläre Strukturen des endoplasmatischen Reticulums um einen Lipoidtropfen (↓). 1:81000

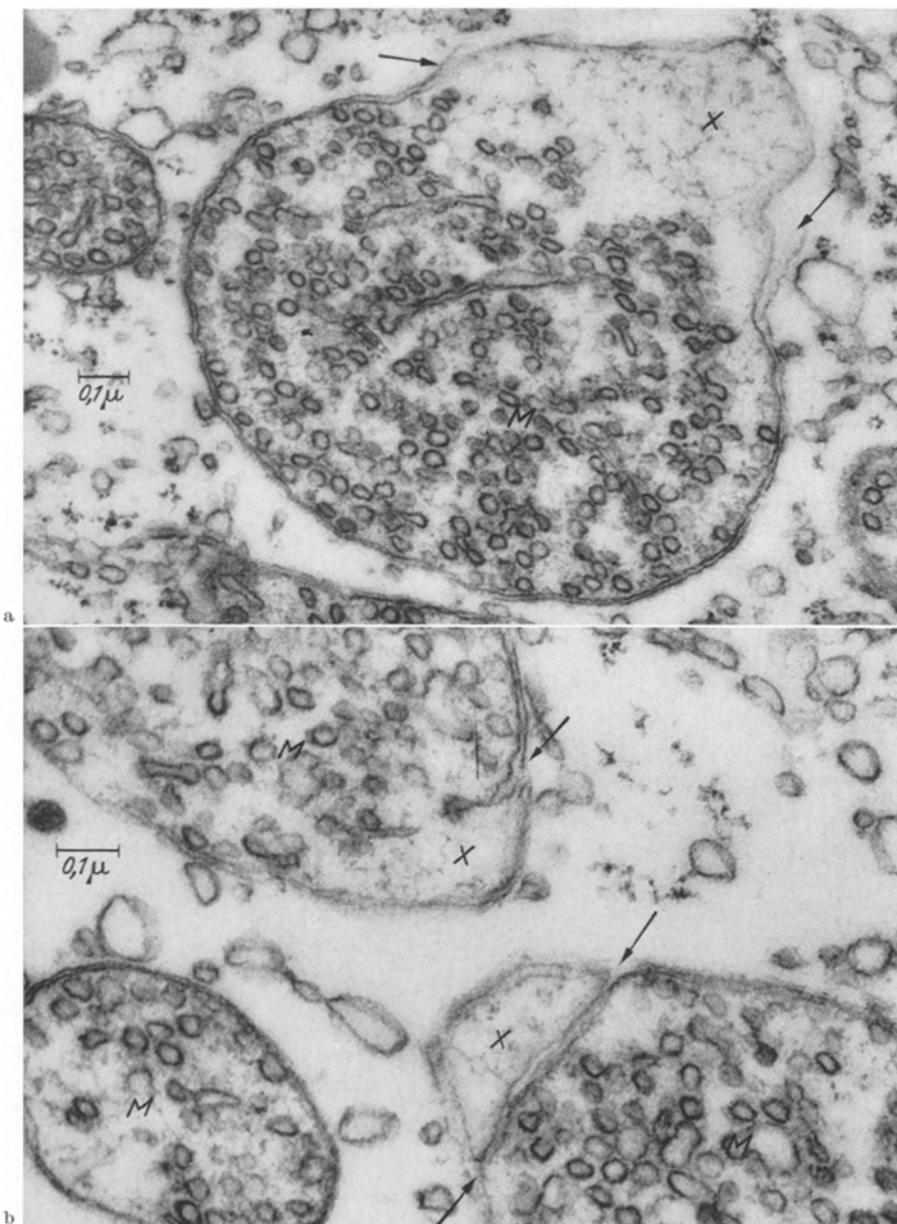


Abb. 4a u. b. Blasige Vorwölbungen der äußeren Mitochondrienmembran (X) nach Hypophysektomie und ACTH-Substitution. Beginn der Abschnürung durch Vorwachsen der inneren Mitochondrienmembran (↓). a 1:72000, b 1:63000

Die auffälligsten Veränderungen spielen sich aber an den Mitochondrien ab. Die Verteilungskurve ihrer Längen hat zwei Maxima (0,58 und 0,76 μ). Damit ist die Schwankungsbreite der Mitochondrienlänge sehr viel größer als in der normalen Fasciculatazelle. Der Durchmesser der Vesiculae und Tubuli in den Mitochondrien ist abhängig von der Mitochondriengröße. Man findet in den kleineren

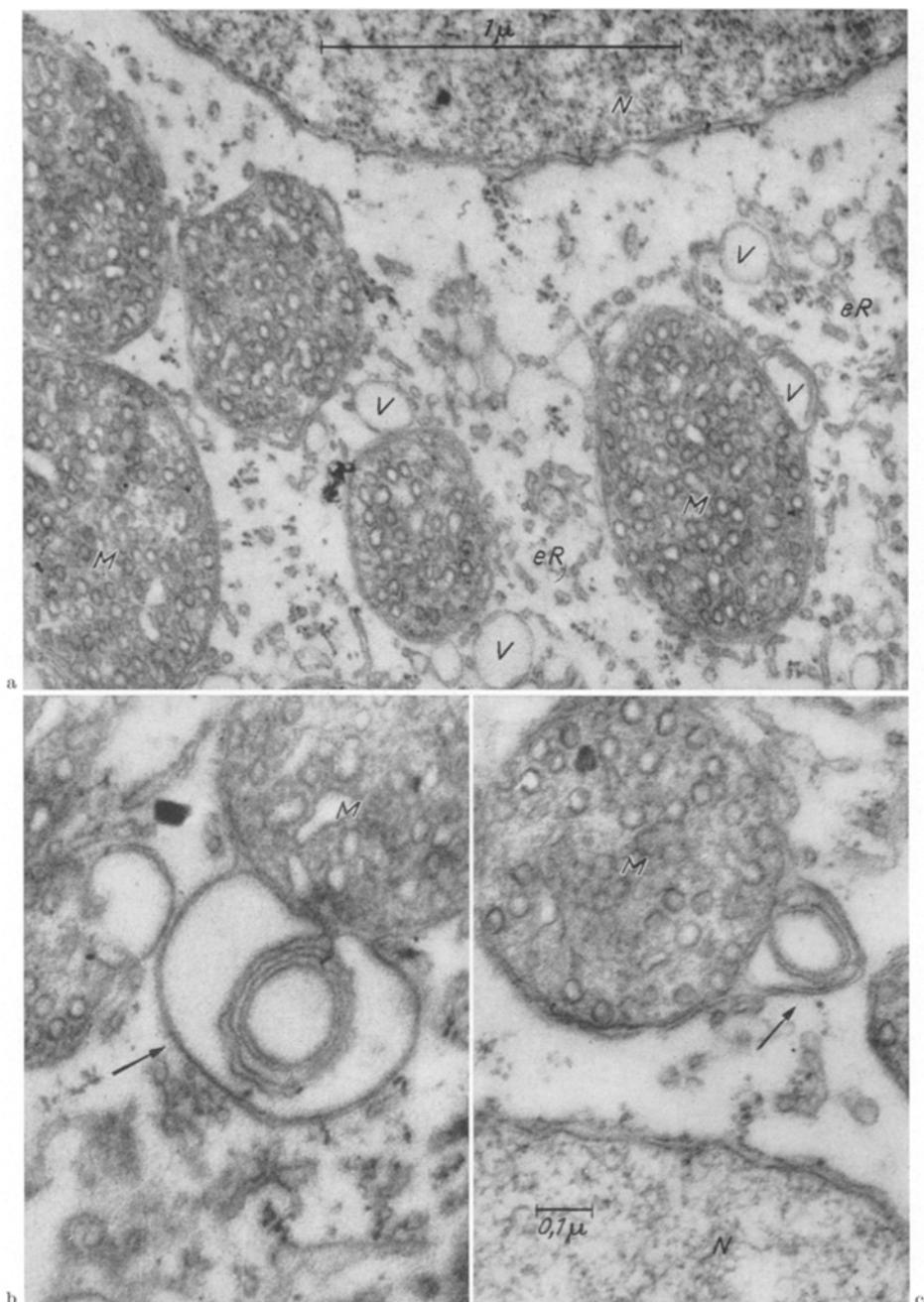


Abb. 5a—c. a Fasciculatazelle der rechten Nebenniere einer Ratte, 2 Std nach Entfernung der linken Nebenniere. 1:47 000. b und c: mehrfaches Ausstülpen der Mitochondrienmembran am gleichen Ort (↓). 1:72 000

Mitochondrien Vesiculae mit einem Durchmesser von 250—350 Å und in den größeren Vesiculae von 300—600 Å.

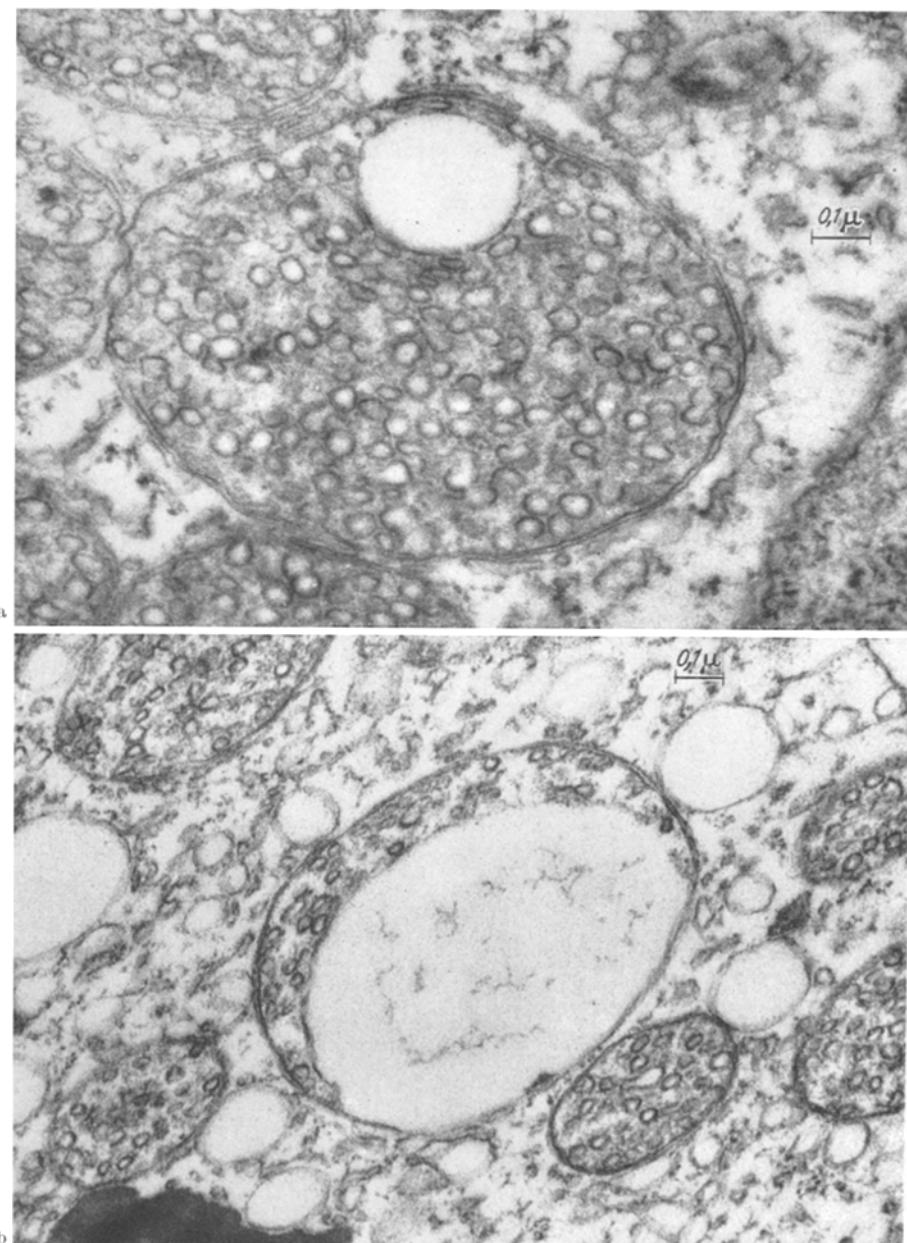


Abb. 6a u. b. Vacuolen in den Mitochondrien. a 1:72000, b 1:59000

Die blasigen Vorwölbungen an den Mitochondrien, die im normalen Bild nur selten beobachtet werden, sind unter ACTH so stark vermehrt, daß man sie in jedem Schnitt an mehreren Mitochondrien feststellen kann (Abb. 4 u. 5). Ihre Form und Größe wechseln. Man kann eine Reihe aufstellen, die von der Entstehung solcher Vorwölbungen bis zur Abschnürung einer Vacuole reicht. In Abb. 11 sind diese

Vorgänge schematisch dargestellt. Zuerst wölbt sich die Doppelmembran des Mitochondriums blasig nach außen vor. Man findet darin aber weder Vesiculae noch Tubuli, sondern nur einzelne granuläre und fädige Strukturen. Die äußere Mitochondrienmembran löst sich dabei mitunter auf, so daß in diesen Fällen die Vorwölbung nur von der inneren Membran begrenzt wird. An der Basis der Vor-

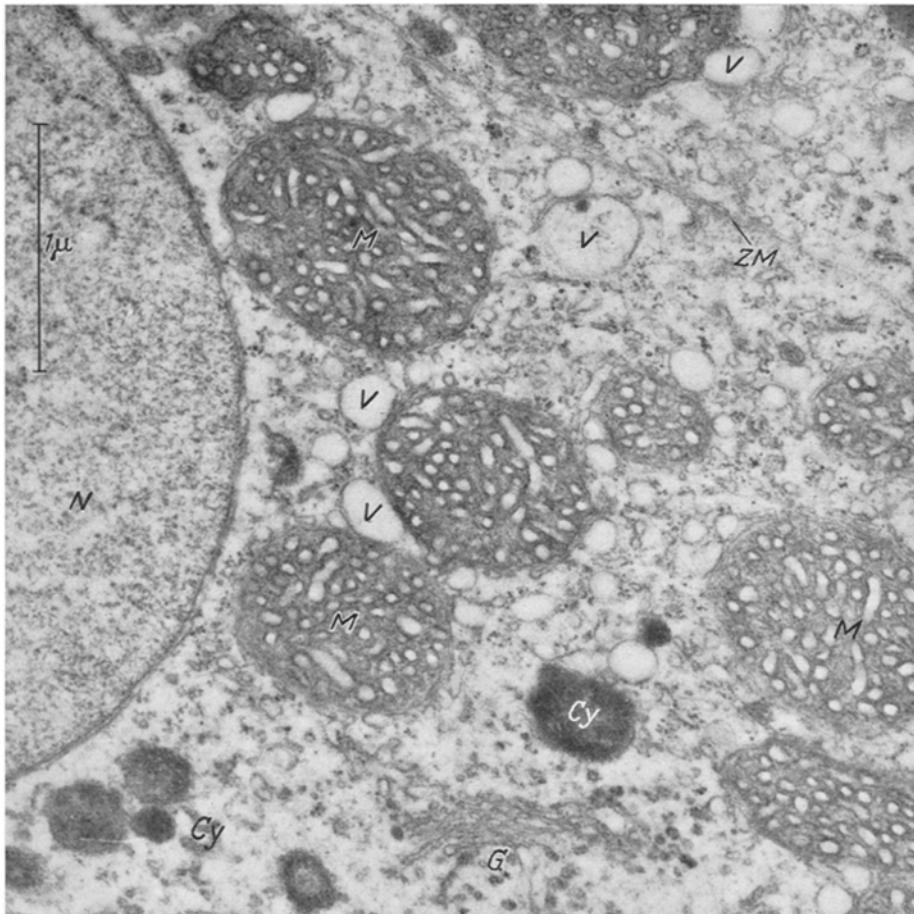


Abb. 7. Fasciculatazelle der rechten Nebenniere einer Ratte 2 Std nach Entfernung der linken Nebenniere bei gleichzeitiger Behandlung mit Cortison. 1:31500

wölbung schiebt sich die innere Mitochondrienmembran nach innen vor und schnürt dadurch eine Vacuole vom Mitochondrium ab. Ist die äußere Mitochondrienmembran verlorengegangen, so entsteht eine Vacuole mit einfacher Grenzmembran. Wenn beide Membranen erhalten bleiben, ist nach dem Abschnüren die Vacuole von einer Doppelmembran umgeben. Häufig verbreitert sich hier der Spalt zwischen den beiden Membranen bis zum Bild einer Vacuole in einer Vacuole. Dieser Prozeß der Vacuolenbildung kann sich an der gleichen Stelle mehrmals wiederholen. Dabei werden in die erste Vorwölbung kleine Bläschen hineingeschoben, die von der neugebildeten Mitochondriendoppelmembran

ausgehen. Dadurch können Vacuolen entstehen, die in ihrem Innern konzentrisch geordnete Lamellen enthalten (Abb. 5). Neben dieser Vacuolenbildung durch Vorwölbungen der äußeren Mitochondrienmembranen sind noch Vacuolen im Innern der Mitochondrien zu unterscheiden (Abb. 6). Hier bleibt aber die äußere Umhüllung der Mitochondrien intakt. Der Inhalt ist elektronenoptisch meistens leer oder enthält nur wenig fädiges Material. Die Größe dieser Vacuolen ist sehr verschieden. Ihre Begrenzung kann als Membran nicht überall eindeutig erkannt werden.

Stress

Zwei Stunden nach einseitiger Adrenalektomie zeigen die Fasciculatazellen der anderen Nebenniere Veränderungen, die ungefähr in der Mitte zwischen Normalbild und den Verhältnissen nach höheren ACTH-Gaben stehen. Das endoplasmatische Reticulum ist stärker ausgeprägt als in den normalen Fasciculatazellen. Fetttropfen kommen nur vereinzelt vor. Die blasigen Vorwölbungen an den Mitochondrien und auch die isolierten Vacuolen sind ebenfalls häufiger als in den normalen Fasciculatazellen. Einzelne Mitochondrien haben eine innere Vacuole.

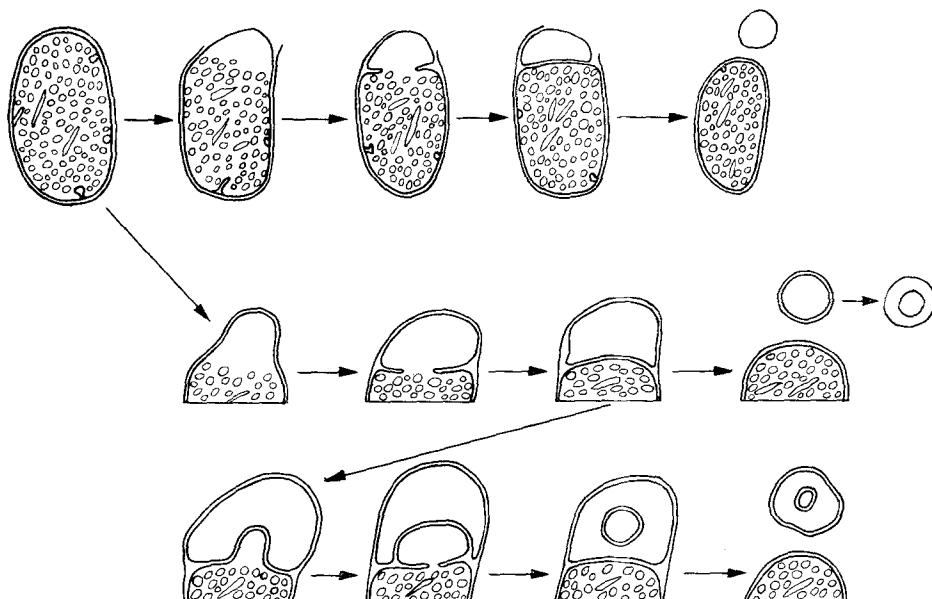


Abb. 8. Schema der Vacuolenentstehung aus den Mitochondrien

Cortison nach einseitiger Adrenalektomie

Nach einseitiger Adrenalektomie und Cortisoninjektion fällt die große Zahl freier Vacuolen im Cytoplasma auf (Abb. 7). Einige enthalten im Innern konzentrisch geschichtete Lamellen. Die blasigen Vorwölbungen an den Mitochondrien sind selten. Im Innern der Mitochondrien findet man keine Vacuolen. Die Fetteinschlüsse sind zahlreich und haben oft eine zentrale Vacuole. Die Cytosomen lassen sich in allen Zellen beobachten.

Diskussion

Die Zellorganellen (Mitochondrien, endoplasmatisches Reticulum und Vacuolen) der Fasciculatazellen reagieren auf ACTH-Mangel oder Überschuß in charakteristischer Weise. Die stimulierte Zelle hat größere Mitochondrien, weniger Fetteinschlüsse und mehr Vacuolen und Strukturen des endoplasmatischen Reticulums. Diese Veränderungen an den Zellorganellen weisen auf vermehrte Leistungen hin, die hier einer erhöhten Produktion von Corticosteroiden entsprechen. BELT et al. (1956), LEVER (1955, 1956), LUFT et al. (1957), MÖLBERT et al. (1960) und SABATINI et al. (1961) haben die tubuläre bzw. vesiculäre Form der Mitochondrien in den Fasciculatazellen für die Steroidproduktion verantwortlich gemacht. ASHWORTH (1959), CARR (1961) und ÜBERBERG (1960) schließen aus den Veränderungen des endoplasmatischen Reticulums unter verschiedenen experimentellen Bedingungen auf eine Mitbeteiligung dieses Zellorganells an der Hormonsynthese. Auch die biochemischen Untersuchungen von Zellfraktionen der Nebennierenrinde haben zeigen können, daß neben den Mitochondrien die Mikrosomenfraktion an diesen Prozessen beteiligt ist. Darüber hinaus konnte auch der Zusammenhang verschiedener Stufen der Steroidsynthese mit den einzelnen Fraktionen festgestellt werden. Nach BUCHER et al. (1956) ist zur Bildung des Cholesterins aus Azetat die lösliche und die Mikrosomenfraktion notwendig. HAYANO et al. (1956) und SABA et al. (1955) konnten Cholesterin in Progesteron bei Anwesenheit von Mitochondrien umwandeln. Dieser mitochondrienabhängige Schritt ist aber nur die Umwandlung des Cholesterins in Pregnenolon (SABA et al. 1955). Die Entstehung von Progesteron aus Pregnenolon soll wieder an die Mikrosomenfraktion gebunden sein (AXELROD et al. 1954). Zur Bildung des 17-Hydroxyprogesterons ist nach den Untersuchungen von LYNN et al. (1958) ebenfalls die Mikrosomenfraktion verantwortlich. Progesteron und 17-Hydroxyprogesteron gelten beide als Vorstufen der Corticosteroide (Literatur s. HAYANO et al. 1956). Ihre weitere notwendige Hydroxylierung in Stellung 21 soll nach PLAGER et al. (1954) durch Fermente bewirkt werden, die im Überstand nach einer Zentrifugierung (20000 g) vorkommen. BROWNIE et al. (1954) konnten zeigen, daß die folgende Hydroxylierung zu den 11-Desoxycorticosteroiden in der Bullennebennierenrinde durch Enzyme ausgeführt wird, die wieder in den *Mitochondrien* lokalisiert sind. Diese biochemischen Daten erleichtern die Deutung unserer elektronenmikroskopischen Bilder. Die vesiculären und tubulären Strukturen des endoplasmatischen Reticulums führen in der Zelle die Funktionen aus, die man in der Mikrosomenfraktion nachweisen kann. Drei wesentliche Schritte in der Hormonsynthese, nämlich der Aufbau von Cholesterin aus Acetat, die Umwandlung von Progesteron in 17-Hydroxyprogesteron und von Pregnenolon in Progesteron, sind an das Membransystem des endoplasmatischen Reticulums gebunden. Dadurch erklärt sich auch der enge Kontakt dieser Membranstrukturen mit den Fetteinschlüssen (als Rohstoffquelle) und mit den Mitochondrien, die für die übrigen Schritte der Hormonsynthese verantwortlich sind. Hier ist der erste mitochondrienabhängige Schritt die Umwandlung von Cholesterin in Pregnenolon. Ein gleicher Vorgang spielt sich auch in den interstitiellen Hodenzellen des Opossums ab, die FAWCETT (1960) elektronenmikroskopisch untersucht hat. Er beobachtete hier in den wenigen Mitochondrien, die sowohl Cristae als auch Tubuli enthalten, keine morphologisch faßbaren Zeichen einer Sekretion. Wir

fanden dagegen an den Mitochondrien der Fasciculatazellen starke Veränderungen, die als eine Sekretion zu deuten sind und nach ACTH-Gaben bzw. beim Stress vermehrt auftreten. Deshalb möchten wir diese Sekretionsvorgänge mit dem zweiten Syntheseschritt, der an die Mitochondrien gebunden ist, nämlich mit der 11β -Hydroxylierung in Zusammenhang bringen. Dieser Schritt kommt in den Hodenzwischenzellen bei der Bildung androgener Substanzen nicht vor, entsprechende Mitochondrienveränderungen sind deshalb auch hier nicht zu erwarten. Die Veränderungen an den Mitochondrien der Fasciculatazellen beginnen als blasige Vorwölbungen der äußeren Mitochondrienmembranen. Durch Abschnürung entstehen dann geschlossene Vacuolen, die an das Cytoplasma abgegeben werden. Sie sind leicht an den Vesikeln des endoplasmatischen Retikulums durch ihre Gestalt und Größe zu unterscheiden. Ihr Inhalt müßte das fertige Hormon sein. Auch die Veränderungen nach einem Stress entsprechen den Bildern nach ACTH-Gaben. Das vermehrte Auftreten der Vacuolen nach Operationsstress und Cortison könnte auf einer Verhinderung der Abgabe des Hormones beruhen, das durch Stress vermehrt gebildet wird.

SABATINI und DE ROBERTIS (1961) haben ebenfalls Vacuolen in den Fasciculatazellen der Ratte beschrieben und sie mit der Hormonbildung in Zusammenhang gebracht. Nach ihrer Ansicht sollen sie von den Vesiculae aus dem Innern der Mitochondrien abstammen, die in das Cytoplasma abgegeben werden sollen. Wir konnten solche Vorgänge nicht beobachten. Nach unseren Befunden entstehen die Vacuolen im Cytoplasma nicht aus der vesiculären Komponente der Mitochondrien, sondern aus Vorwölbungen der äußeren Mitochondrienmembranen. Diese Membranteile sind aber oft so zart, daß sie nur nach Kontrastierung, Kohlebedampfung (Sandwich) und hoher Anfangsvergrößerung darzustellen sind. Wahrscheinlich handelt es sich bei dem partiellen Verlust der äußeren Mitochondrienmembranen, wie sie LEVER (1956) nach ACTH-Gaben beobachtet hat, um solche blasigen Vorwölbungen, die aus präparativen Gründen nicht erfaßt wurden. Auch ÜBERBERG (1960; nach Cortison) und ASHWORTH et al. (1959; nach ACTH) fanden ebenfalls Vermehrung der Vacuolen im Cytoplasma, die sie jedoch vom endoplasmatischen Reticulum ableiten. Wir sahen aber niemals Übergänge zwischen dem kleinblasigen endoplasmatischen Reticulum und den großen Vacuolen. Die Vacuolen dieser Autoren stammen wohl ebenfalls aus den Mitochondrien ab.

Unklar bleibt die Bedeutung und Entstehung der Vacuolen in den Mitochondrien. Sie erinnern an die Befunde, die BARGMANN et al. (1959/60) an den Mitochondrien der eosinophilen Vorderlappenzellen von *Cottus bubalis* gefunden haben. Diese Mitochondrienveränderungen treten zwar nach ACTH und Stress etwas vermehrt auf, doch sind sie auch dann noch zahlenmäßig so selten, daß über ihre Bedeutung für die spezifische Hormonproduktion nichts gesagt werden kann.

Zusammenfassung

Die Zona fasciculata von 80—100 g schweren Rattenböcken wurde elektronenmikroskopisch untersucht. Nach *Hypophysektomie* nehmen das endoplasmatische Reticulum, die Cytosomen und die RNS-Granula ab. Die Lipoideinlagerung nimmt zu. Neben bizarr geformten Fetteinschlüssen kommen noch runde Fettropfen mit einer zentralen Vacuole vor. Freie Vacuolen im Cytoplasma sind verschwunden. Nach *Hypophysektomie und anschließender Substitution mit ACTH*

vermehrt sich wieder das endoplasmatische Reticulum. Auffallend ist die große Zahl der blasigen Vorwölbungen der äußeren Mitochondrienmembranen bis zur Abschnürung einer Vacuole. Die Länge der Mitochondrien hat erheblich zugenommen. Nach *Stress* treten zwar gleiche Veränderungen wie nach ACTH auf, doch sind sie mengenmäßig nicht so ausgeprägt. *Cortisonbehandlung nach Entfernung einer Nebenniere* führt zu einem vermehrten Auftreten von freien Vacuolen im Cytoplasma der anderen Nebenniere. Die Vermehrung der feinblasigen und tubulären Strukturen des endoplasmatischen Reticulums und der Vacuolenbildung aus den Mitochondrien nach ACTH und Stress spricht für eine Beteiligung des endoplasmatischen Reticulums und der Mitochondrien an der Hormon-synthese in den Fasciculatazellen.

Summary

The zona fasciculata of male rats weighing 80—100 g was studied electron-microscopically. *After hypophysectomy* the endoplasmic reticulum, the cytosomes, and the granules of RNA decrease. The deposits of lipids increase. In addition to peculiarly formed inclusions of fat, round droplets of fat with a central vacuole appear. Free vacuoles in the cytoplasm are gone. With *hypophysectomy followed by substitution* of ACTH the endoplasmic reticulum increases again. Numerous vesicle-like protuberances of the outer membranes of the mitochondria pinch off to become vacuoles. Their number is striking. The length of the mitochondria increases considerably. After stress, changes appear which are similar to those seen after ACTH; in quantity, however, they are not as marked. *Cortisone therapy after unilateral adrenalectomy* leads to an increase of free vacuoles in the cytoplasm of the other adrenal. The increase of finely vesiculated and tubular structures of the endoplasmic reticulum and the formation of vacuoles from the mitochondria after ACTH and stress suggest a participation of the endoplasmic reticulum and the mitochondria in the synthesis of hormones in the cells of the fasciculata.

Literatur

- ASHWORTH, CH. T., G. J. RACE and H. H. MOLLENHAUER: Study of functional activity of adrenocortical cells with electron microscopy. Amer. J. Path. **35**, 425—438 (1959).
- AXELROD, L. R., and L. L. MILLER: Arch. biophys. biochem. **49**, 248 (1954). Zit. M. HAYANO et al. 1956.
- BACHMANN, R.: Die Nebenniere. In Handbuch der mikroskopischen Anatomie, Bd. VI, Teil 5, herausgeg. von W. v. MÖLLENDORF u. W. BARGMANN. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1954.
- BARGMANN, W., u. A. KNOPP: Vakuolenbildung und Mitochondrien. Z. Zellforsch. **51**, 456—466 (1959).
- BELT, W. D., and C. D. PEASE: Mitochondrial structure in sites of steroid secretion. J. biophys. biochem. Cytol. **2**, Suppl, 369—374 (1956).
- BROWNIE, A. C., and J. K. GRANT: The in vitro enzymatic hydroxylation of steroid hormones. I. Factors influencing the enzymic 11- β -hydroxylation of 11-deoxycorticosterone. Biochem. J. **57**, 254—258 (1954).
- BUCHNER, N. L. R., and K. McGARRAHAN: The biosynthesis of cholesterol from acetat-1-C₁₄ by cellular fractions of the liver. J. biol. Chem. **222**, 1—7 (1956).
- CARR, I.: The ultrastructure of the human adrenal cortex before and after stimulation with ACTH. J. Path. Bact. **81**, 101—106 (1961).
- CHRISTENSEN, A. K., and W. FAWCETT: The normal fine structure of opossum testicular interstitial cells. J. biophys. biochem Cytol. **9**, 653—670 (1961).

- HAYANO, M., N. SABA, R. I. DORFMAN and O. HECHTER: Some aspects of the biogenesis of adrenal steroid hormones. *Recent Progr. Hormone Res.* **12**, 79—123 (1956).
- LEVER, J. D.: Electron microscopic observations on the adrenal cortex. *Amer. J. Anat.* **97**, 409—429 (1955).
- Physiologically induced changes in adreno-cortical mitochondria. *J. biophys. biochem. Cytol.* **2**, Suppl., 313—318 (1956).
- Cytological studies on hypophysectomized rat adrenal cortex: The alterations of its fine structure following ACTH administration and on lowering the Na/K ratio. *Endocrinology* **58**, 163—180 (1956).
- LUFT, J., and O. HECHTER: An electron microscopic correlation of structure with function in the isolated perfused cow adrenal, preliminary observations. *J. biophys. biochem. Cytol.* **3**, 615—620 (1957).
- LYNN, W. S., and R. H. BROWN: The conversion of progesterone to androgens by testes. *J. biol. Chem.* **232**, 1015—1023 (1958).
- MÖLBERT, E., u. K. ARNESEN: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Ultrastruktur der NNR der weißen Maus. *Beitr. path. Anat.* **122**, 31—56 (1960).
- PLAGER, J. E., and L. T. SAMUELS: The conversion of progesterone to 17-hydroxy-11-desoxy corticosterone by fractionated beef adrenal homogenates. *J. biol. Chem.* **211**, 21—29 (1954).
- SABA, N., and O. HECHTER: Cholesterol C¹⁴ metabolism in adrenal homogenates. *Fed. Proc.* **14**, 775—782 (1955).
- SABATINI, D. D., and E. D. P. DE ROBERTIS: Ultrastructural zonation of adrenal cortex in the rat. *J. biophys. biochem. Cytol.* **9**, 105—131 (1961).
- ÜBERBERG, H.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Nebennierenrinde der cortisonbehandelten Ratte. In *Proc. of the European regional conf. of electron microscopy*, Delft 1960, edit. by HOUWINK and SPIT, 1961, p. 857—861.

Prof. Dr. W. SCHWARZ,
Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie der Freien Universität Berlin,
Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Straße 15