

Aus der Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie der Freien Universität Berlin
(Leiter: Prof. Dr. med. WILLY SCHWARZ)

Die Wirkung von Metopiron und Amphenon B auf die Nebennierenrinde der Ratte*

Von

W. SCHWARZ und G. K. SUCHOWSKY

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 26. Juni 1963)

Einleitung

Die Biosynthese der Corticosteroide setzt sich aus einer Reihe von einzelnen Schritten zusammen, die in den Nebennierenrindenzellen von ganz verschiedenen Zellorganellen geleistet werden.

Die Bildung von Cholesterin aus Acetaten ist an die Gegenwart der löslichen und der Mikrosomenfraktion gebunden (BUCHNER et al. 1956). Die Umwandlung von Cholesterin über Pregnenolon zu Progesteron bzw. zu 17-hydroxy-Progesteron ist ebenfalls mikrosomenabhängig (BEYER u. SAMUELS 1956). Alle weiteren Hydroxylierungen sollen wieder mitochondrienabhängig sein (HAYANO et al. 1956). Die biochemischen Befunde können lichtmikroskopisch nicht oder kaum in der Zelle lokalisiert werden, da die betreffenden Zellorganellen an der Grenze oder außerhalb des Auflösungsvermögens des Lichtmikroskopes liegen. Im Elektronenmikroskop dagegen können die in-vitro-Bestandteile der Mikrosomen- und Mitochondrienfraktion morphologisch geprüft werden. In den Dünnschnitten von Zellen sind diese Bestandteile wiederzufinden. Auch kann man Veränderungen an diesen Zellorganellen erkennen, die mit Funktionszuständen in Zusammenhang stehen. Nach Hypophysektomie verändert sich das submikroskopische Zellbild der Fasciculatazellen erheblich (SCHWARZ/MERKER/SUCHOWSKY 1962). Im Zelleib liegen viele Fetttropfen, die eine bizarre Kontur haben und lichtmikroskopisch noch sichtbar sind. Das nur elektronenmikroskopisch erkennbare tubuläre endoplasmatische Reticulum ist vermindert. Auch die großen Vesikel, die im normalen Zellbild zahlreich sind, kommen nach Hypophysektomie nur noch in wenigen Exemplaren vor. Die Mitochondrien sind zwar kleiner geworden, doch haben sie ihren typischen Aufbau mit zwei Außenmembranen, Tubuli und kleinen Vesikel als Inhalt beibehalten. Werden diese hypophysektomierten Tiere mit ACTH behandelt, so verschwinden die Fetttropfen völlig, und das tubuläre endoplasmatische Reticulum vermehrt sich stark. An den Mitochondrien kommt es zu blasenförmigen Abhebungen an den Außenmembranen, die sich abschnüren und dann als große Vesikel isoliert im Cytoplasma liegen. Die Stärke dieser Vorgänge ist von der Menge und Dauer der ACTH-Gaben abhängig. Die normalen (nicht hypophysektomierten) Tiere reagieren auf Stress mit ihren Fasciculatazellen in ähnlicher Weise. Die Bildung von Vacuolen durch Vorwölbung und anschließender Abschnürung der äußeren Mitochondrienmembran wurden auch von YAMORI; MATSUURA und SAKAMOTO (1961) bei Ratten, vor allem nach Kältestress, gesehen. SABATINI et al. (1961, 1962) haben ebenfalls solche Mitochondrienveränderungen gefunden. Sie fanden, daß intramitochondriale Vesikel nach ihrer Erweiterung durch die äußeren Mitochondrienmembranen nach außen abgeschoben werden. Bei Stress treten aber noch zusätzlich in den Mitochondrien zentrale größere Vacuolen auf.

Nähere Aussagen über die Lage der einzelnen Syntheseschritte können an Versuchstieren nicht gemacht werden. Hier vermögen nur Blockierungen einzelner Syntheseschritte weitere Erkenntnisse zu liefern, wenn diese Blockierungen

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

mit faßbaren Veränderungen der Zellorganellen einhergehen. Einige Pharmaka sind bekannt, die eine gezielte Wirkung auf einen oder mehrere Syntheseschritte haben. So soll Metopiron [SU 4885 = 2-Methyl-1,2- bis (3-pyridyl)-1-propanon] in therapeutischen Dosen spezifisch die 11β -Hydroxylierung stoppen. Dagegen ist Amphenon B [3,3-di(p-aminophenyl)butanon-2-dihydrochlorid] ein Mittel, das gleich mehrere Syntheseschritte hemmt, die Ketonisierung in Stellung 3 beim Übergang von Cholesterin zum Progesteron und die Hydroxylierungen in Stellung 11, 17 und 21. Dabei kommt es bei der Ratte zu einer Gewichtszunahme der Nebenniere, die auf eine Speicherung von Cholesterin und lipoiden Vorstufen beruht (VOGT 1956; ROSENFELD u. BASCOM 1956; KRACHT 1959).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Ratten, die mit diesen Pharmaka behandelt wurden, könnten uns somit die Möglichkeit geben, bestimmte Syntheseschritte bei der Corticosteroidherstellung *in vivo* zu lokalisieren.

Material und Methoden

Drei Rattenböcke mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 100 g erhielten 50 mg/kg Metopiron intravenös verabfolgt. Eine halbe Stunde nach der Darreichung wurden die Nebennieren entnommen. Eine weitere Gruppe von 10 Rattenböcken gleichen Körpergewichts wurden über 7 Tage täglich einmal mit 15 mg/kg Amphenon B i.m. behandelt, danach erfolgte die Entnahme der Nebennieren. Bei drei weiteren Rattenböcken wurde gleichzeitig mit der Verabfolgung von Amphenon B (15 mg/kg) über drei Tage 0,25 IE ACTH subcutan dargereicht. Bei zwei Tieren wurde zur Auslösung einer Stressreaktion eine Nebenniere exstirpiert. Vier Tage nach diesem Eingriff wurden die Tiere geopfert und die Nebenniere zur weiteren Verarbeitung entnommen. Das Material wurde in einer 1% Osmiumtetroxydlösung nach PALADE fixiert. Einbettung in Methacrylat und Vestopal W. Die Dünnschnitte wurden mit Bleihydroxyd oder Uranylacetat nachkontrastiert und mit einem Kohlefilm bedeckt (Sandwich). Aufnahmen: Siemens Elmiskop I, Strahlspannung 80 kV und Blenden 200/50 μ .

Befunde

Nach *Metopiron* zeigen die Fasciculatazellen wenig Fetteinlagerungen. Die Mitochondrien haben einen tubulären bzw. vesiculären Aufbau. Die Vesikel sind rund und haben einen Durchmesser von 30–45 $m\mu$. Das endoplasmatische Reticulum besteht aus einem verzweigten tubulösen Hohlraumsystem, das keinen Besatz von Ribosomen hat. Der Durchmesser dieser Tubuli schwankt zwischen 11 und 23 $m\mu$. Nur in unmittelbarer Nachbarschaft der Mitochondrien sind die Hohlräume des ER erweitert, sie haben dann immer noch eine ovale Kontur. Damit sind sie von den runden Vacuolen, die sich von den blasigen Vorwölbungen der Mitochondrien ableiten, leicht zu unterscheiden. Alle Mitochondrien haben blasige Vorwölbungen ihrer Außenmembranen, die auffallend dichte Konturen zeigen (Abb. 1). Man findet von der bloßen blasigen Vorwölbung an den Mitochondrien bis zur isolierten Vacuole alle Stadien der Abschnürung. Immer aber ist die Kontur dieser Teile auffallend elektronendicht. Die so entstandenen mitochondriogenen Vacuolen haben eine Größe von 80–240 $m\mu$ und liegen im Plasma verstreut, meistens in unmittelbarer Nähe der Fetttropfen. Ihre Form ist rund, und ihr Inhalt ist so wenig elektronendicht, daß diese Vacuolen einen leeren Eindruck machen. Viele solcher Vacuolen haben im Innern noch eine, zwei oder drei eingeschachtelte Vacuolen, die häufig exzentrisch in der großen Vacuole liegen (Abb. 2). Die Golgi-Zone liegt in der Nähe des Kernes und besteht aus zwei oder drei Komplexen (Abb. 3), von denen jeder 4–5 Tubuli bzw.

flache Säcke hat, die einigermaßen parallel liegen. Doch verlaufen diese Tubuli nicht immer gerade, sondern sie sind auch ein- oder mehrmals gekrümmt. An den Enden dieser Golgi-Komplexe liegen kleine Bläschen. Außerdem kommen in ihrer Nähe ovale oder dreieckige Einschlußkörper vor, die meistens eine Länge

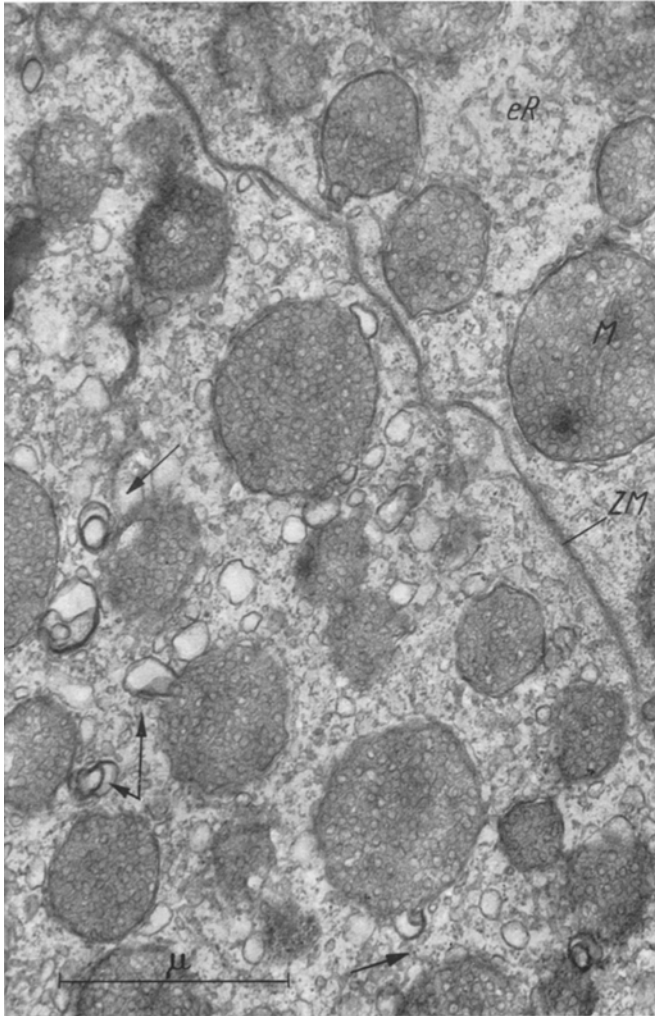


Abb. 1. Zona fasciculata der Rattennebennierenrinde nach Behandlung mit Metopiron. Blasige Vorwölbungen an den Mitochondrien mit elektronendichter Wand (\rightarrow). *M* Mitochondrium, *eR* endoplasmatisches Reticulum, *ZM* Zellmembran. 1:30 000

von ungefähr 350μ und eine Breite von 90μ haben. Sie sind sehr elektronendicht und lassen in ihrem Innern noch vereinzelte dichtere Zonen erkennen.

Nach *Amphenon B* treten bei sonst unbehandelten Tieren an vielen Mitochondrien gleich mehrere blasige Vorwölbungen der Außenmembranen auf, deren Konturen ebenfalls sehr elektronendicht sind. Manche haben sogar eine Begrenzung durch zwei oder mehr Membranen (Abb. 4). Die Vesikel in den Mitochondrien sind rund, oval oder in die Länge gezogen. Ihr Durch-

messer liegt zwischen 35 und 55 $m\mu$. Das endoplasmatische Reticulum kommt in zwei Formen vor. Das verzweigte tubuläre Hohlraumsystem ist stark vermehrt und füllt den Raum zwischen den Mitochondrien aus. Die Tubuli haben zahlreiche kleine blasige Erweiterungen. Daneben kommen kleine Vesikel vor, die wie die Tubuli einen Durchmesser von 18 $m\mu$ haben. In der Nähe der Mitochon-

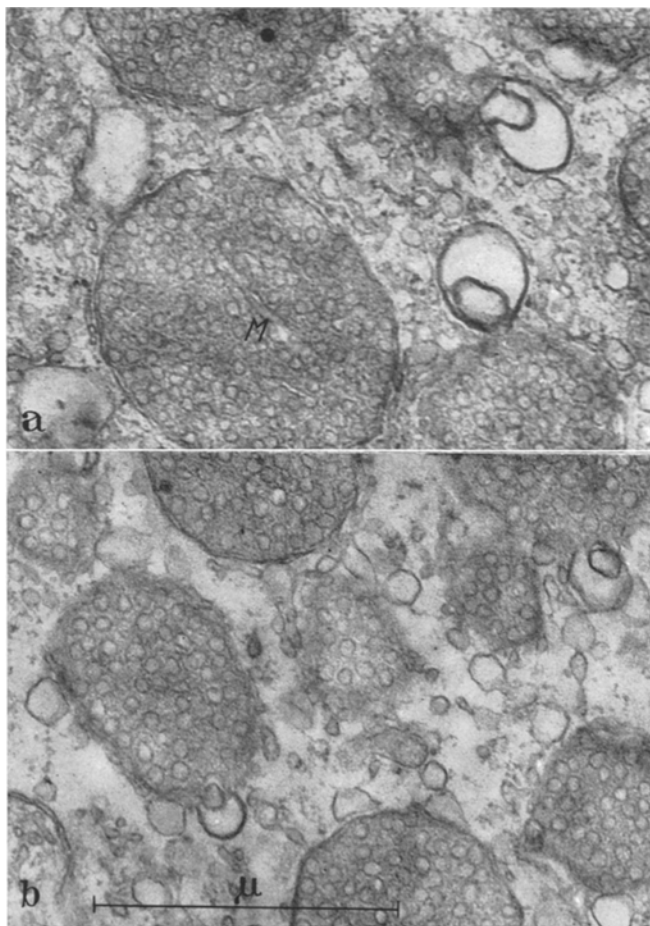


Abb. 2a u. b. Zona fasciculata nach Metopiron. Elektronendichte blasige Vorwölbungen an den Mitochondrien, z.T. mit eingeschachtelten kleineren Vacuolen. 1:40000

drien besteht das endoplasmatische Reticulum aus platten Säcken. Ihre Orientierung ist oft wirbelartig. Daneben kommen noch konzentrische Schichtungen vor. An diesen Stellen sind die Membranen wieder stärker elektronendicht als im Bereich des tubulären ER. Zwischen den Tubuli des ER liegen vereinzelte freie Ribosomen. Die Fetttropfen sind zahlreich und groß, ihr Inhalt ist homogen und nach Osmiumfixierung ungewöhnlich hell angefärbt. Werden die Ratten mit ACTH und Amphenon B gleichzeitig behandelt, so nehmen diese hellen großen Fetteinlagerungen und auch die blasigen Vorwölbungen an den Mitochondrien mit ihren vielschichtigen Begrenzungen stark zu. Hinzu kommen auch noch

Vacuolen an den Mitochondrien, die mehr Membransysteme enthalten und einen geknitterten Eindruck machen. Die freien Ribosomen haben ebenfalls zugenommen. Bei gestreßten Ratten und nach ACTH treten nach Amphenon B neben den vielschichtigen Mitochondrienvorwölbungen der Außenfläche noch vielschichtige Vacuolen in den Mitochondrien auf (Abb. 5). Hier zeichnen sich diese Membransysteme ebenfalls durch ihre große Dichte aus. Die freien Ribosomen haben erheblich zugenommen. Die ovalen, relativ hellen Lipideinschlüsse

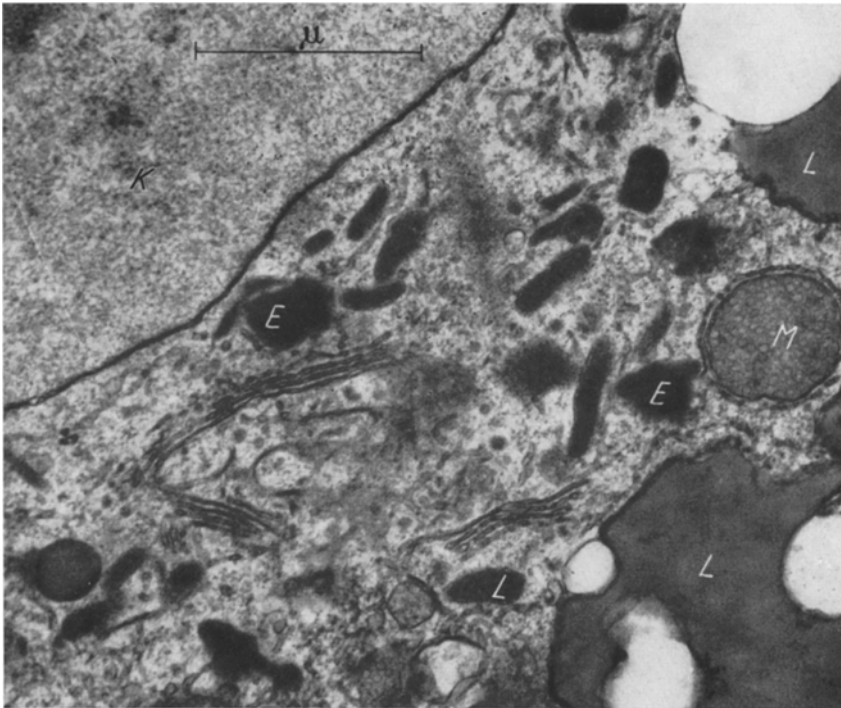


Abb. 3. Golgi-Zone einer Fasciculatazelle der Ratte nach Metopiron. *E* elektronendichte Einschlüßkörper, *K* Kern, *L* Lipoidtropfen mit Vacuolen. 1:30 000

werden meistens von zwei Membranen begrenzt, die sehr elektronendicht sind. An manchen Stellen sind jedoch diese beiden Membranen durch eine Kette kleiner Vesikel ersetzt.

Diskussion

Die Behandlung der Ratte mit Metopiron und Amphenon B bewirkt charakteristische Veränderungen in der Nebennierenrinde an solchen Zellorganellen, die nach biochemischen Untersuchungen an der Biosynthese der Nebennierenhormone beteiligt sind. Gestört ist nach Metopiron die normale Vacuolenabgabe von den äußeren Mitochondrienmembranen. Dabei zeigen die Vacuolenwände eine starke Erhöhung ihrer Dichte. Darüber hinaus treten an den Mitochondrien noch blasige Vorwölbungen auf, die eine konzentrische Membranschichtung zeigen. Auch hier sind die Membranen auffallend elektronendicht. Da nach Metopiron in therapeutischen Dosen nur die 11β -Hydroxylierung gestoppt

werden soll, so liegt es jetzt nahe, diesen Vorgang in die äußere Mitochondrienwand und speziell in die blasigen Vorwölbungen und deren Abschnürungen (mitochondriogene Vacuolen) zu verlegen. Das Auftreten der ovalen Einschlüsse im

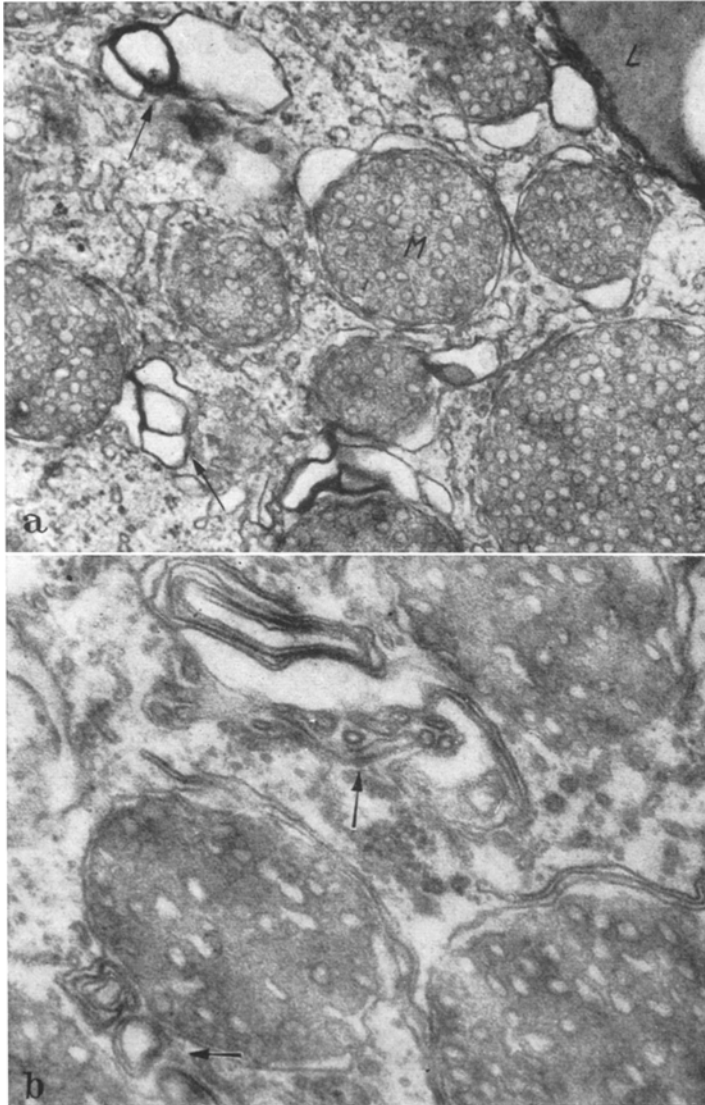


Abb. 4 a u. b. Zona fasciculata nach Amphenon B. Geschichtete Vacuolen an der Oberfläche der Mitochondrien mit elektronendichter Wand (\rightarrow) und Wirbelbildung des endoplasmatischen Reticulums (\Rightarrow) a 1:42 000, b 1:64 000

Bereich der Golgi-Zone nach Metopiron kann nicht erklärt werden, da über die Bedeutung des Golgi-Apparates für die Hormonsynthese nichts bekannt ist.

Die Veränderungen nach Amphenon B betreffen sowohl die Mitochondrien als auch das endoplasmatische Reticulum. Die Störungen an den mitochondriogenen Vacuolen, die denen nach Metopiron gleichen, können wieder auf eine

Behinderung der 11 β -Hydroxylierung, dem letzten Schritt zum Cortisol und Corticosteron, zurückzuführen sein. Die Störung und Wirbelbildung im ER muß dagegen zu anderen Syntheseschritten eine Beziehung haben. Die biochemische Mikrosomenfraktion der Nebennierenrinde, die dem elektronenmikroskopischen endoplasmatischen Reticulum entspricht, wird noch für den Schritt von Pregnenolon zu Progesteron verantwortlich gemacht, für den das betr. Ferment eine

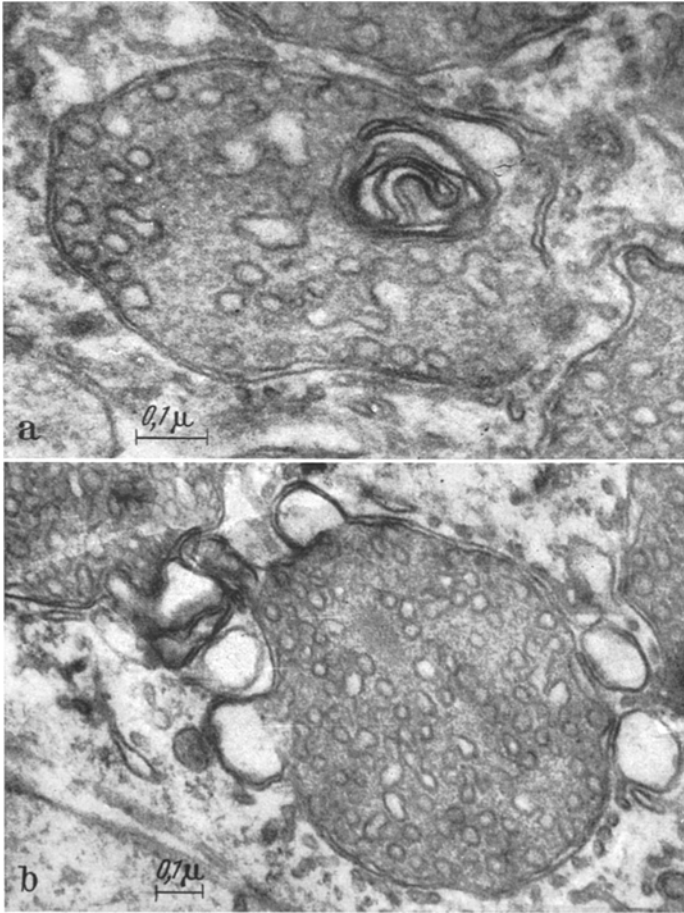


Abb. 5 a u. b. Zona fasciculata nach Amphenon B und ACTH. Verstärkte Bildung geschichteter Vacuolen in und an den Mitochondrien. a 1:80000; b 1:56000

3 β -Dehydrogenase ist. Aber auch die 17- und 21-Hydroxylase werden noch mit der Mikrosomenfraktion in Zusammenhang gebracht. Da Amphenon B auch auf diese Fermente wirken soll, so kann die Veränderung im ER mit einer Störung dieser drei Fermente in Zusammenhang stehen. Alle beschriebenen cytologischen Veränderungen beruhen auf einer Membranvermehrung und -veränderung und auf einer Änderung der Membranordnung. Wirken die Substanzen Metopiron und Amphenon B tatsächlich auf die genannten Fermente an Ort und Stelle ein, so könnten die gefundenen intracellulären Organellveränderungen auch einen Hinweis für einen Einbau dieser Fermente in die betroffenen Membranen bedeuten.

Auch die weitere Vermehrung dieser gestörten Membransysteme bei gleichzeitiger Behandlung mit Amphenon B und ACTH spricht für eine ACTH-Wirkung auf die Enzymmembransysteme, die an der Steroid-Biosynthese in den Fasciculatazellen beteiligt sind. Das gilt auch für den Schritt vom Cholesterol zum Pregnenolon, der in den Mitochondrien vor sich gehen soll. Nach ACTH vergrößern sich sowohl die Außenmembranen als auch der vesiculäre Inhalt. Der Umfang dieses Teilvorganges muß nachher auch maßgebend für die Menge der ausgestoßenen Hormone sein, wenn man nicht eine direkte Synthese von Progesteron aus Acetaten annehmen will. Da nämlich bestimmte Fermentwirkungen durch Amphenon B und Metopiron ausfallen und die dazugehörigen Membransysteme verändert sind, so könnte die weitere Vermehrung dieser gestörten Membransysteme nach ACTH bedeuten, daß ACTH ein notwendiges Mittel zur Membranvermehrung in den Fasciculatazellen ist. Damit würde auch erklärt werden können, daß sich die betr. Fermente, die wahrscheinlich membrangebunden sind, unter ACTH bei normalen Verhältnissen für alle Syntheseschritte, die an Mitochondrien und an das endoplasmatische Reticulum gebunden sind, synchron vermehren. Das ist aber nur in einer lebenden Zelle möglich. Damit erklärt sich auch die differente Wirkung von ACTH in der durchströmten Nebenniere und bei Nebennierenschnitten. So wird bei einer durchströmten Nebenniere (Rind) mit 0,1 iE ACTH und bei Nebennierenschnitten erst mit 40 iE ACTH die maximale Corticosteroidstimulation erreicht (SABA 1960). Die vermehrte Einlagerung von Cholesterin und Lipiden nach ACTH-Zuführung bei gleichzeitiger Behandlung mit Amphenon B könnte auch dafür sprechen, daß die Bildung dieser Lipide ein hier ungestörter Syntheseschritt zum Cholesterin sein könnte. Das Auftreten von zwei Membranen oder von Vesikelketten um die großen Lipideinschlüsse herum, vor allem nach Amphenoneinwirkung, läßt auch an die Möglichkeit denken, daß diese Vorgänge, nämlich die Cholesterinsynthese, wenigstens in einem Schritt membrangebunden sind.

Für die Beschaffung von Amphenon B danken wir der Schering-AG, Berlin. Herrn Priv.-Doz. Dr. SENFT (Pharmakolog. Inst. der F.U. Berlin) danken wir für die Hilfe bei den Metopiron-Versuchen.

Zusammenfassung

Metopiron und Amphenon B wurden normalen, gestreßten und mit ACTH behandelten Ratten injiziert. Diese Substanzen verändern die intracellulären Membransysteme der Fasciculatazellen in charakteristischer Weise. Die gleichzeitige Behandlung mit ACTH vermehrt noch deutlich diese Veränderungen. Dadurch ist die Lokalisation einiger Fermente in der Steroidsynthese möglich. Die blasigen Vorwölbungen der Mitochondrien und die mitochondriogenen Vacuolen sind der Sitz der 11 β -Hydroxylase. Die Hydroxylierung in Stellung 17 und 21 und die Ketonisierung in Stellung 3 sind an das endoplasmatische Reticulum gebunden.

The Action of Metopiron and Amphenone B on the Adrenal Cortex of the Rat

Summary

Metopiron und Amphenone B were injected into normal, stressed, and ACTH treated rats. These substances change the intracellular membrane system of the

cells of the zona fasciculata in a characteristic way. Simultaneous administration of ACTH distinctly augments these changes. Thus, the localization of some enzymes in the synthesis of steroids is possible. The vesicular ballooning of the mitochondria and the mitochondriogenic vacuoles are located at the site of 11 β -hydroxylase. The hydroxylation in the 17 and 21 positions and the ketonization in position 3 are closely associated with the endoplasmic reticulum.

Literatur

- BEYER, K.F., and L.T. SAMUELS: Distribution of steroid-3 β -ol-dehydrogenase in cellular structures of the adrenal gland. *J. biol. Chem.* **219**, 69—76 (1956).
- 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).
- HAYANO, M., N. SABA, J. DORFMAN and O. HECHTER: Some aspects of the biogenesis of adrenal steroid hormones. *Recent Progr. Hormone Res.* **12**, 79—123 (1956).
- KRACHT, J.: Experimentelle Untersuchungen mit Amphenon B. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 1959, S. 249—253.
- ROSENFELD, G., and W.D. BASCOM: The inhibition of steroidogenesis by amphenone B; studies in vitro with perfused calf adrenal. *J. biol. Chem.* **222**, 565 (1956).
- SABA, N.: Mechanism of corticotrophin action. *Biochem. Soc. Sympos.* 18. The biosynthesis and secretion of adrenocortical steroids. Cambridge: Cambridge University Press 1960.
- SABATINI, D.D., and E. DE ROBERTIS: Ultrastructural zonation of adrenocortex in the rat. *J. biophys. biochem. Cytol.* **9**, 105—119 (1961).
- — and B. BLEICHMAR: Submicroscopic study of the pituitary action on the adrenocortex of the rat. *Endocrinology* **70**, 390—406 (1962).
- SCHWARZ, W., H. -J. MERKER u. G. SUCHOWSKY: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Wirkungen von ACTH und Streß auf die Nebennierenrinde der Ratte. *Virch. Arch. path. Anat.* **335**, 165—179 (1962).
- VOGT, M.: The effect of amphenone on adrenocortical secretion in the rat. *J. Endocr.* **14**, 25—26 (1956).
- YAMORI, T., S. MATSUURA and S. SAKAMOTO: An electron-microscopic study of the normal and stimulated adrenal cortex in the rat. *Z. Zellforsch.* **55**, 179—199 (1961).

Professor Dr. W. SCHWARZ,
Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie der Freien Universität,
1 Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Str. 15