

Immunhistologischer ACTH-Nachweis in einem R-Zellen-Adenom des Hypophysenvorderlappens bei M. Cushing*

J. KRACHT, H.-D. ZIMMERMANN und U. HACHMEISTER

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

Eingegangen am 21. September 1965

In früheren Arbeiten hatten wir mucoidzellige knotige Hyperplasien im Hypophysenvorderlappen bei M. Cushing hypothalamisch-hypophysärer Genese als R-Zellen-Adenome klassifiziert und sie als Reaktionsprodukt auf fehlregulierte hypothalamische Impulse, d.h. als hyperplasiogene Geschwülste im Sinne von BÜNGELER gedeutet (KRACHT, ZIMMERMANN, ZIMMERMANN u. KRACHT). Immunhistologisch konnten wir zeigen, daß im Hypophysenvorderlappen des Menschen nur R-Zellen mit fluoreszierendem Anti-ACTH reagieren und deshalb als ACTH-Depots bzw. als Bildungsstätten des corticotropen Hormons angesehen werden müssen (HACHMEISTER u. KRACHT, KRACHT u. Mitarb.). Die bereits von CUSHING geäußerte Annahme einer hormonalen Aktivität basophiler Adenome wurde durch den Nachweis von Nebennierenhypertrophie bei Mäusen nach Implantation eines basophil granulierten Adenoms (BERBLINGER) zwar gestützt, aber erst durch den biologischen Nachweis hoher ACTH-Konzentrationen in Vorderlappenadenomen bei M. Cushing objektiviert (BAHN u. Mitarb., JAILER u. HOLUB u.a.). Es lag deshalb nahe, diesen Nachweis auch immunhistologisch zu führen und damit die heute optimale cytologische Differenzierung der Adenomzellen zu verbinden.

Fallbericht. Frau H. M., 25 Jahre alt, hatte 1964 im Rahmen einer Präeklampsie mit systolischen Blutdruckwerten über 300 mm Hg eine Totgeburt. Sie bemerkte danach verstärkten Haarausfall, Zunahme der Kinnbehaarung, Zunahme von Striae und ständigen Gewichtsanstieg. Später stellte sich eine sekundäre Amenorrhoe ein. Während eines stationären Aufenthaltes auf der Inneren Abteilung eines auswärtigen Krankenhauses wurde der Verdacht auf M. Cushing durch den Ausfall des Dexamethasonbelastungstests gestützt. Die Patientin wurde zur Abklärung einer operativen Behandlung auf die II. Med. Klinik des Universitätskrankenhauses Eppendorf verlegt. Bei der Aufnahme fanden sich ein Vollmondgesicht, ausgedehnte Stammfettsucht, acneähnliche Effloreszenzen im Thoraxbereich, blaßlivide Striae an beiden Mammae sowie im Mittel- und Unterbauch. Ophthalmologisch: Fundus hypertonicus 1—2. Ausscheidung der freien 17-OHCS: 0,79 mg/24 Std, der gebundenen 17-OHCS: 20,25 mg/24 Std, der 17-Ketosteroide: 15,5 bzw. 18 mg/24 Std. Die Wiederholung des Dexamethasonbelastungstests sprach erneut für eine bilaterale Nebennierenrindenhyperplasie. Sella: röntgenologisch o. B. Therapeutisch war eine einseitige Adrenalektomie mit anschließender Hypophysenbestrahlung vorgesehen. Die Patientin starb 5 Tage nach Adrenalektomie rechts an Thromboembolie.

Obduktion (S.-Nr. 962/65). Typischer M. Cushing. 4:3 mm großes Adenom des Hypophysenvorderlappens. Diffuse Nebennierenrindenhyperplasie links (10,65 g).

Mikroskopische Befunde. Rechte Nebenniere (Op.-Präparat 5388/65): Die Rinde ist mäßig verbreitert und in zwei Zonen unterteilt. Die außen gelegene besteht aus Zellen mit hellem, die innere aus Zellen mit kompaktem Cytoplasma. Die hellen Zellen sind fasciculär ausgerichtet. Der Befund entspricht einer mäßiggradigen progressiven Umwandlung des äußeren Transformationsfeldes, wobei Fasciculatasäulen bis an die Kapsel heranreichen. Eine Z. globulosa ist nicht mehr nachweisbar.

* Herrn Prof. Dr. W. BÜNGELER zum 65. Geburtstag.

Linke Nebenniere (Obduktionspräparat): Die Rindenstruktur kontrastiert zu den zuvor beschriebenen Veränderungen. Die Rinde ist wesentlich verbreitert, vor allem breiter als auf der rechten Seite und zugunsten von Fasciculatastrukturen umgebaut. Die Außenzone und die an das Mark angrenzenden Rindenanteile sind gut lipoidhaltig, die übrigen Rindenabschnitte weitgehend lipoidverarmt. Verschiedentlich finden sich Kapselaufbrüche und Proliferationen des Rindengewebes in das extraadrenale Fettbindegewebe, vereinzelt auch extracapsuläre Adenomknoten.

Hypophyse. Mikroskopisch findet sich ein in seinem Granulabestand variierendes überwiegend aber gut granulierte und bindegewebig abgekapseltes mucoid-zelliges Adenom. In der Färbung nach GOMORI färben sich die Granula mit Chromhämatoxylin, in der PAS-Trichromfärbung (PEARSE) kräftig PAS-positiv an; in der Perameisensäure-Alcianblau-PAS-Orange G-Färbung (ADAMS u. SWETTENHAM) nehmen sie den rötlich-violetten Farnton der R-Zellen an. In der unmittelbaren Umgebung des Adenoms finden sich im mäßig komprimierten Vorderlappenrestgewebe zahlreiche R-Zellen mit homogenisiertem Cytoplasma und randständigem Granulasaum (Crooke-Zellen). Im weiteren Abstand vom Adenom erscheinen die R-Zellen verminderd. S-Zellen kommen spärlich vor. Acidophile und chromophobe Elemente weichen nicht von der Norm ab. Keine R-Zellen im Hinterlappen.

Immunhistologie. Dünne Sagittalschnitte der 16 Std p. m. entnommenen Hypophyse wurden bei 4° C 1 Std. lang in 10%igem neutralen Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Paraffinschnitte wurden beschichtet mit:

- a) durch Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markiertem Anti-Acethropan (Hoechst), Anti- β^{1-24} und Anti- β^{1-39} -Corticotropin¹;
- b) durch Rhodamin B Isothiocyanat gekoppeltem Anti- β^{1-24} - und Anti- β^{1-39} -Corticotropin, sämtlich vom Kaninchen. Die Markierung der Antiseren und Kontrollseren erfolgte nach der von HACHMEISTER u. KRACHT mitgeteilten Methodik, die durch Anwendung der von GOLDSTEIN u. Mitarb. entwickelten Verbesserung (Fraktionierung der markierten Seren auf der DEAE-Cellulose-Säule) erweitert wurde.

In Kontrolluntersuchungen erfolgte die Schnittbeschichtung mit:

1. unmarkiertem Anti-Acethropan gefolgt von markiertem Anti-Acethropan;
2. unmarkiertem Anti- β^{1-24} -Corticotropin gefolgt von markiertem Anti- β^{1-24} -Corticotropin;
3. markiertem Serum unbehandelter Kaninchen.

Außerdem wurden Paraffinschnitte von Leber, Milz und Niere von Mensch und Ratte mit markiertem Anti- β^{1-24} -Corticotropin beschichtet. Zur Beurteilung der Immunfluoreszenzphänomene diente die Leitz-Fluoreszeineinrichtung mit Dunkelfeldkondensor und der Quecksilberhochstdrucklampe HBO 200 W am Ortholuxmikroskop in Verbindung mit der Mikroskopkamera Orthomat. UV-Erregerfilter: Schott UG 1 (1 mm) in Verbindung mit dem Rotdämpfungsfilter BG 38 (4 mm). UV-Sperffilter: K 430. Filmmaterial: Adox KB 14, Anscochrome 200 (24 DIN).

Mit allen drei markierten ACTH-Antiseren werden im Hypophysenvorderlappen zwei Komponenten dargestellt:

1. das R-Zellen-Adenom und
2. extraadenomatöse R-Zellen.

Der gesamte Zellbestand des Adenoms zeichnet sich durch eine deutliche, stellenweise aber ungleichmäßige Fluoreszenz aus, die topographisch dem Ausmaß der Cytoplasmagranulierung entspricht. Die Zellkerne sind ausgespart. Das

¹ Für die Überlassung von Acethropan danken wir den Farbwerken Hoechst AG, der Ciba AG für β^{1-24} -Corticotropin und Herrn Prof. SCHWYZER, Zürich, für die Überlassung von β^{1-39} -Corticotropin.

Adenom hebt sich scharf gegen das extraadenomatöse Vorderlappengewebe ab. Adenomnahe fluorescieren teils singuläre, teils in kleinen Gruppen angeordnete R-Zellen. Dies sind vorwiegend große Elemente mit nicht fluorescierendem Internum und in der Zellperipherie positiver Fluorescenz. Umfärbungen gleicher Schnitte ergeben, daß es sich dabei um Crooke-Zellen handelt, in denen Kern und homogenisierte Cytoplasmaanteile nicht fluorescieren und Fluorescenz nur im Bereich des Granularestbestandes angetroffen wird (Abb. 1). Erwähnenswert

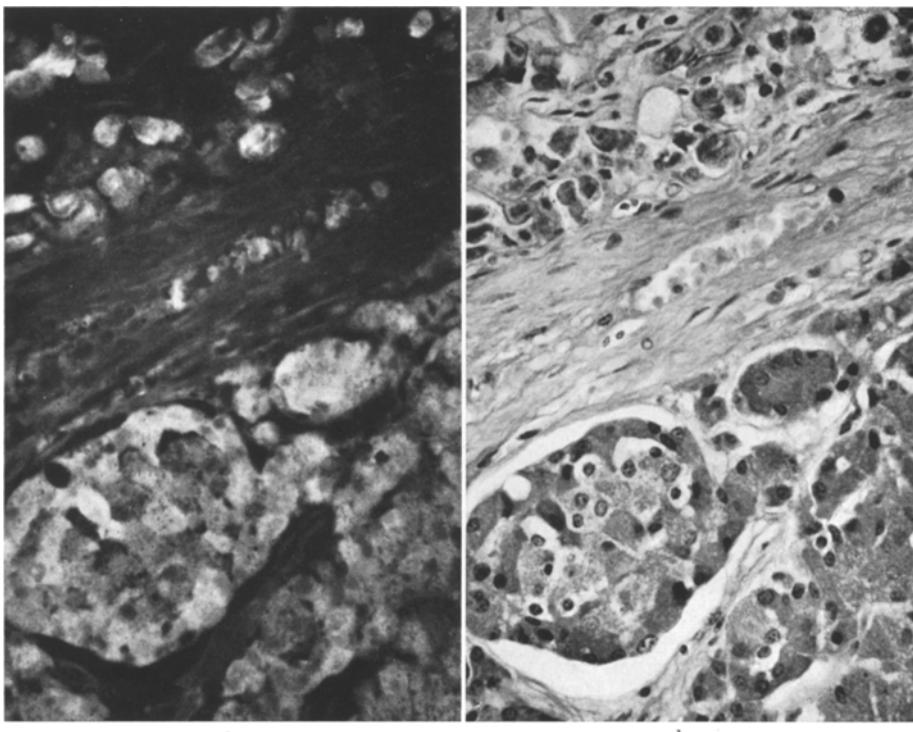


Abb. 1a u. b. 962/65, M. CUSHING: Randpartie eines R-Zellenadenoms des Hypophysenvorderlappens. a Immunfluorescenz nach Beschichtung mit Anti-Acethropan. Mit dem Granulierungsgrad korrespondierende Fluorescenz der Adenomzellen und fluorescierende extraadenomatöse R-Zellen als Crooke-Zellen. b Gleicher Ausschnitt in der PAS-Trichromfärbung. Vergr.: 322fach

ist, daß beim Vergleich von Einzelzellen intensivere Fluorescenzphänomene in extraadenomatösen R-Zellen wahrgenommen werden. Dem färberischen Befund entsprechend scheint die Zahl der R-Zellen auch immunhistologisch in der weiteren Umgebung des Adenoms vermindert zu sein. Nicht fluorescierende R-Zellen konnten nicht ermittelt werden. Fluorescenzphänomene an S-Zellen, acidophilen oder chromophoben Elementen wurden nicht festgestellt. Die Fluorescenz intra- und extraadenomatöser R-Zellen wurde durch Vorbehandlung der Schnitte mit unmarkiertem Anti-ACTH inhibiert, die übrigen Kontrollen fielen negativ aus.

Besprechung

CUSHING erkannte dem basophilen Adenom im Hypophysenvorderlappen bei dem später nach ihm benannten Krankheitsbild ein pathogenetisches Prinzip zu, räumte aber die Möglichkeit ein, daß die klinische Symptomatik Folgezustand

einer Stimulierung der Nebennierenrinde durch das Adenom sein könnte. Dieser Auffassung wurde auch in neuerer Zeit immer wieder mit dem Hinweis begegnet, daß basophile Vorderlappenadenome keineswegs in allen Fällen von M. Cushing vorkämen und nicht selten als Nebenbefund bei endokrin Gesunden im höheren Lebensalter gefunden werden (PURVES). Mit dieser Einstellung wären Vorderlappenadenome bei M. Cushing Nebenbefunde ohne pathogenetische Bedeutung. Im eigenen Material der letzten Jahre fanden wir in 5 von 6 Fällen von M. Cushing hypophysär-hyothalamischer Genese (ACTH-unabhängige Formen von Cushing-Syndrom und extrahypophysäre corticotrop aktive Geschwülste ausgenommen) insgesamt 7 basophile und 1 chromophobes Vorderlappenadenom; in 3 Fällen lagen zwei Adenome vor. Wir vertreten die Meinung, daß eine derartige Koinzidenz nicht zufälliger Art ist, sondern betrachten diese Adenome als regulierte knotige Hyperplasien, die unter einer permanenten und der Tagesrhythmik entzogenen Stimulierung durch hypothalamische Impulse vom Typ des Faktors CRF entstanden sind. Sie würden damit im Prinzip den knotigen Anpassungshyperplasien peripherer endokriner Drüsen auf glandotrope Impulse durch Vorderlappenhormone entsprechen.

Als Stütze für diese Hypothese führen wir an:

1. Das Fehlen knotiger mucoidzelliger Hyperplasien im Vorderlappen bei M. Cushing schließt ihre Bedeutung nicht aus, da diesem Stadium der Anpassung im allgemeinen die diffuse Hyperplasie vorausgeht.
2. Durch das Vorkommen multipler mucoidzelliger knotiger Hyperplasien wird die Existenz eines übergeordneten Regulationsprinzips unterstrichen.
3. Die Bedeutung von hypothalamischen Impulsen, die wohl nicht nur einen Releasing-Faktor sondern auch einen auf die ACTH-Bildungsstätten gerichteten Wachstums- und Produktionsfaktor einschließen, erhellt aus der Stimulierung vorhandener oder der Neuentstehung von Vorderlappenadenomen nach therapeutischer bilateraler Adrenalektomie bei M. Cushing. Es sei darauf hingewiesen, daß derartige Adenome nach Nebennierenextirpation aus anderer Indikation bzw. endogenem Ausfall der Nebennieren (chronischer Hypocortisolismus) wie z. B. M. Addison tuberkulöser Genese oder bei cytotoxischer Nebennierenrindenatrophie nicht vorkommen.
4. Immunhistologisch konnten wir nachweisen, daß ACTH in den R-Zellen der Adenohypophyse lokalisiert ist (HACHMEISTER u. KRACHT; KRACHT u. Mitarb.); als wahrscheinlich kann gelten, daß dieser Zelltyp zugleich Produktionsort des corticotropen Hormons ist. Knotige Vorderlappenhyperplasien bei M. Cushing bestehen im eigenen Material mit Ausnahme eines kleinen chromophoben Adenoms in der Nachbarschaft eines invasiv gewachsenen basophilen Adenoms ausschließlich aus R-Zellen (ZIMMERMANN). Der Granulierungsgrad der R-Zellen kann hierbei Schwankungen unterliegen, so daß ohne Anwendung von Spezialfärbungen chromophobe Elemente vorgetäuscht werden können. Acidophile Adenome des Hypophysenvorderlappens bei M. Cushing (HERLANT u. DECOURT) haben wir nicht gesehen.
5. Nachdem die R-Zellen als Lokalisationsort des corticotropen Hormons feststehen und in knotigen R-Zellen-Hyperplasien bei M. Cushing verschiedentlich hohe ACTH-Aktivitäten biologisch nachgewiesen werden konnten, fehlte bisher der ACTH-Nachweis in R-Zellenadenomen bei M. Cushing mit morphologischer

Methodik. Wir konnten im vorliegenden Fall immunhistologisch nachweisen daß ein R-Zellenadenom der Adenohypophyse bei M. Cushing mit fluoreszierenden ACTH-Antikörpern reagiert. Wir schließen hieraus auf einen hohen ACTH-Gehalt des R-Zellenadenoms.

Auf die besondere Klassifizierung des Zelltyps legen wir in Erweiterung der Mitteilung über immunhistologischen ACTH-Nachweis in einem lediglich als basophil charakterisierten Vorderlappenadenom bei M. Cushing (LEZNOFF u. Mitarb.) deshalb besonderen Wert, weil der Bildungsort des corticotropen Hormons in der Adenohypophyse des Menschen erst in neuerer Zeit immunhistologisch zugunsten der R-Zellen präzisiert werden konnte (PEARSE u. VAN NOORDEN, HACHMEISTER u. KRACHT, KRACHT u. Mitarb.). Nachdem mit der Perameisen-säure-Alcianblau-PAS-Orange G-Färbung eine weitere Untergruppierung des mucoidzelligen Zellpotentials möglich ist, muß für vergleichende immunhistologische Untersuchungen die heute optimale cytologische färberische Zuordnung gefordert werden. Unsere Mitteilung soll deshalb zur vergleichenden immunhistologisch-färberischen Differenzierung von einschlägigen kasuistischen Beobachtungen von Vorderlappenadenomen bei M. Cushing anregen.

Zusammenfassung

In einem Fall von M. Cushing mit bilateraler Nebennierenrindenhyperplasie wurde der immunhistologische ACTH-Nachweis in einem R-Zellenadenom des Hypophysenvorderlappens und in extraadenomatösen R-Zellen geführt. Mit diesem Befund wird die Annahme der ACTH-Bildung in den R-Zellen der Adenohypophyse des Menschen am Beispiel eines klassischen Krankheitsbildes gestützt.

The Immunohistological Demonstration of ACTH in a R-Cell-Adenoma of the Anterior Lobe of the Pituitary in Cushing's Syndrome

Summary

In a case of M. Cushing with bilateral hyperplasia of the adrenal cortex, ACTH was shown to be present immunohistologically in a pituitary R-cell adenoma and in extraadenomatous pituitary R-cells. This observation supports the theory that in the human pituitary, ACTH is produced by R-cells.

Literatur

- BAHN, R. C., G. T. ROSS, and C. S. MACCARTHY: Melanocyte stimulating hormone and ACTH activities of pituitary tumors in patients with Cushing's syndrome. Proc. Mayo Clin. **35**, 623 (1960).
- BERBLINGER, W.: Der Morbus Cushing. Eine Hyperpituitosis basophilica. Schweiz. med. Wschr. **24**, 1159 (1943).
- BÜNGELER, W.: Die Definition der Geschwulstbegriffe und die Abgrenzung der Hyperplasien gegenüber den Geschwülsten. Verh. dtsch. Ges. Path. **35**, 10 (1952).
- CUSHING, H.: Basophil adenomas of the pituitary body and their clinical manifestations (pituitary basophilism). Bull. Johns Hopkins Hosp. **50**, 137 (1932).
- "Dyspituitarism": Twenty years later. With special consideration of the pituitary. Arch. intern. Med. **51**, 487 (1933).
- GOLDSTEIN, G., I. S. SLIZYS, and M. W. CHASE: Studies on fluorescent antibody staining. I. Non specific fluorescence with fluorescein-coupled sheep anti-rabbit globuline. J. exp. Med. **114**, 89 (1961).
- HACHMEISTER, U., u. J. KRACHT: Antigene Eigenschaften von β^{1-24} -Corticotropin. Virchows Arch. path. Anat. **339**, 254 (1965).

- HERLANT, M., et J. DECOURT: Identification des cellules corticotropes dans un adénome hypophysaire ayant déterminé une maladie de Cushing. *Sem. Hôp. Paris* **40**, 1428 (1964).
- JAILER, J. W., and D. A. HOLUB: The significance of pituitary tumors in Cushing's syndrome. *Adv. Abstr. I. Int. Congr. of Endocr. Copenhagen* 1960, p. 363.
- KRACHT, J.: Das Hypophysen-Nebennierenrinden-System bei Cushing-Syndrom. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **47**, 280 (1963).
- U. HACHMEISTER, K. FISCHER u. H.-J. BREUSTEDT: Immunfluoreszenz der ACTH-Bildungsstätten. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **49**, 324 (1965).
- LEZNOFF, A., J. FISHMAN, M. TALBOT, E. E. McGARRY, J. C. BECK, and B. ROSE: The cytological localisation of ACTH in the human pituitary. *J. clin. Invest.* **41**, 1720 (1962).
- PEARSE, A. G. E., and S. VAN NOORDEN: The functional cytology of the human adenohypophysis. *Canad. med. Ass. J.* **88**, 462 (1963).
- PURVES, H. D.: Morphology of the hypophysis related to its function. In: W. C. YOUNG, *Sex and internal secretions*, vol. I, p. 161. Baltimore: Williams & Wilkins Co. 1961.
- ZIMMERMANN, H.-D.: Der Hypophysenvorderlappen des Menschen bei Hypercortisolismus. *Inaug.-Diss. Hamburg* 1964.
- , u. J. KRACHT: Der Hypophysenvorderlappen des Menschen bei Hypercortisolismus. *11. Symp. Dtsch. Ges. Endokrin.*, S. 180. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1965.

Professor Dr. J. KRACHT
2000 Hamburg 20
Pathologisches Institut der Universität