

Die Wirkung von Aminoglutethimid auf die Zwischenzellen des Rattenhodens

H. Nüesch und R. Siebenmann

Pathologisches Institut des Stadtspitals Triemli, Zürich (Chefarzt: PD Dr. R. Siebenmann)

Eingegangen am 24. August 1972

The Effect of Aminoglutethimide on the Testicular Interstitial Cells in Rat

Summary. Aminoglutethimide (30 mg/100 g body weight twice daily for 12 days) was given to male puberal rats and caused the familiar lipid hyperplasia of the adrenal cortex. In the testicular interstitial cells, slightly more fatty, non birefringent material was found stored, without any significant change in the size and number of the cells. Nevertheless androgen-output of these cells was reduced, as indicated by the significant weight reduction of the target organs. The same experiment carried out during stimulation of the interstitial cells with human chorionic gonadotropin (20 IE daily) again showed an inhibition of the androgenic function of the testis by aminoglutethimide. The lipid-content of the interstitial cells was increased in proportion to the increase in cell mass following administration of chorionic gonadotropin. Again however no real lipid hyperplasia of the interstitial cells such as occurs in the adrenocortical cells, was observed. The mode and site of the inhibitory action of aminoglutethimide in steroid-producing cells is discussed and some consideration is devoted to the possibility of producing experimentally congenital lipid hyperplasia of the adrenal cortex of man; in this condition the simultaneous complete lack of masculinization of the external genital organs indicates a similar early block of steroid biosynthesis in the adrenal cortex and testis.

Zusammenfassung. Aminoglutethimide (30 mg/100 g Körpergewicht zweimal täglich während 12 Tagen) führt bei der puberalen männlichen Ratte zur bekannten Lipoidhyperplasie der Nebennierenrinde. In den Hodenzwischenzellen treten dabei vermehrt fein- bis mittelgrobtröpfige sudanophile, nicht doppellichtbrechende Lipide auf, ohne daß ihre Zahl und ihre Kerngröße signifikant verändert würde. Es kommt dabei aber zu einer an den Erfolgsorganen Prostata und Samenblasen meßbaren Reduktion der Androgensekretion. Wird der gleiche Versuch unter gleichzeitiger Stimulation der Zwischenzellen mit humanem Choriongonadotropin (20 IE tgl.) durchgeführt, so kommt es wiederum zur signifikanten Verminderung der Androgenwirkung auf die Erfolgsorgane. Der Lipid-Gehalt der Zwischenzellen nimmt nur entsprechend der Choriongonadotropinbedingten Hyperplasie der Zwischenzellen zu und zur Ausbildung von großen Spongiocyten, wie sie unter AG in der NNR auftreten, kommt es auch im stimulierten Hoden nicht. Es wird Art und Sitz der Hemmwirkung durch Aminoglutethimid in den verschiedenen steroidbildenden Zellen diskutiert und die Möglichkeit besprochen, mit dieser Substanz das Krankheitsbild der kongenitalen Lipoidhyperplasie der Nebennierenrinde zu reproduzieren, insbesondere die dabei gleichzeitig auftretende mangelhafte Maskulinisierung bei den männlichen Individuen.

Unter den heute bekannten Stoffen, welche hemmend in die Steroidbiosynthese eingreifen, kommt dem *Amino-Glutethimid* (AG) insofern besondere Bedeutung zu, als seine Wirkung auf Funktion und Struktur der Nebennierenrinde (NNR) nicht experimentell, sondern als Nebenwirkung bei der therapeutischen Anwendung als Antiepilepticum („Elipten“) entdeckt wurde.

AG wurde 1958 als „Elipten“ in die Therapie eingeführt. 1963 beobachtete Cash [2], 1964 Rallison, Tyler und Kumagi [20] bei eliptenbehandelten Kindern das Auftreten einer mit einer Struma verbundenen Hypothyreose und einer Nebenniereninsuffizienz. In der Folge haben zahlreiche Autoren die AG-Wirkung teils tierexperimentell, teils *in vitro* und teils bei der therapeutischen Anwendung beim Menschen untersucht [1, 2, 4, 6, 7, 13, 17, 20—22, 24]. Ihre Ergebnisse seien kurz zusammengefaßt.

AG hat funktionell und morphologisch eine ähnliche Wirkung wie das bereits länger bekannte *Amphenon*; beide chemisch stark verschiedenen Stoffe sind zugleich Adrenostatica und Thyreostatica. Die Nebennieren AG-behandelter *Ratten* sind deutlich vergrößert und gelb verfärbt. Die zugrunde liegende Substanzvermehrung beruht zu 25 % auf Cholesterin und Cholesterinestern, zu 50 % auf Wasser. Histologisch zeigen die Nebennierenrinden eine massiv vermehrte Lipoidspeicherung mit großen Lipoidtropfen im ganzen Cortex. Diese Veränderungen werden als Ausdruck einer Steroidsynthesestörung, eines Syntheseblocks, aufgefaßt, bei der es zu einer Anschnuppung von Steroidvorstufen kommt. Es konnte bei Ratten gezeigt werden, daß der durch ACTH induzierte Corticosteronanstieg im peripheren Blut unter AG fast vollständig ausbleibt. Für das Vorliegen einer Synthesestörung spricht auch die starke Zunahme des Serum-ACTH-Spiegels, der durch Entfesselung des Rückkopplungsmechanismus Nebenniere-Hypothalamus-Hypophyse erklärt wird. Unter AG ist nicht nur der Corticosterongehalt des Nebennierenvenenblutes, sondern auch derjenige des Nebennierengewebes vermindert. Damit wurde bewiesen, daß AG zu einer Störung der Steroidproduktion und nicht nur der Steroidsekretion führt.

Beim *Menschen* fanden sich gleichartige morphologische und funktionelle Veränderungen [6]. Die Blockierung der Synthese ist aber nicht vollständig, sie wird bei normalen Versuchspersonen durch einen bis 7fach erhöhten ACTH-Spiegel kompensiert. Der Hemmeffekt auf die Steroidbiosynthese zeigt sich nur in der trotz des massiv erhöhten ACTH-Spiegels gleichbleibenden *Cortisol*-produktion. Eine Dosiserhöhung verbietet sich wegen der AG-Nebenwirkungen (Ataxie, Anorexie und Somnolenz) bei Dosen von 1,5—2 g/die. Dies erklärt auch die Tatsache, daß autonome, nicht ACTH-abhängige Nebennierenrindenadenome viel besser auf die AG-Behandlung ansprechen als ACTH-abhängige Hyperplasien. Auch die *Aldosteron*-produktion wurde beim Menschen konstant gehemmt, es kam zum Anstieg der Natriurese und zum Abfall der Kaliurese. Diese Hemmung konnte offenbar auch durch einen stark erhöhten Plasma-Renin-Spiegel nicht durchbrochen werden.

Kahnt und Neher [13] zeigten 1966 bei Untersuchungen mit Nebennieren-Homogenisaten, daß AG lediglich die Umwandlung von Cholesterin zu Pregnenolon, nicht aber die weiteren Steroidsynthese-Schritte hemmt. AG blockiert die Abspaltung der Seitenkette des Cholesterins durch den sog. 20—22-Desmolase-Komplex, insbesondere wird dabei die Hemmung der 20- α -Hydroxylierung am Cholesterin postuliert. Cash, Brough, Cohen und Sato [2] bestätigten 1967 diese Befunde. Neuere Untersuchungen [25] haben aber gezeigt, daß wahrscheinlich außer dieser Hauptwirkung auch die 11-beta-Hydroxylase und die 18-Hydroxylase-Reaktion beeinflußt werden. Ob es sich dabei nicht um eine spezifische AG-Wirkung, sondern um eine toxische Wirkung auf die Mitochondrien und damit Hemmung dieser mitochondrialen Synthese-Schritte handelt, ist noch unklar.

Der Syntheseweg vom Cholesterin zum Pregnenolon ist, soweit heute bekannt, der Biosynthese aller aktiven Steroidhormone gemeinsam. So ist also unter AG neben der nachgewiesenen Störung der Cortisol- und Aldosteronproduktion auch eine Störung der Sexualhormonbildung zu erwarten. Zavadil, Schreiber und Kmentova-Zbuzkova [27] fanden 1968 bei Ratten unter AG eine signifikante Vergrößerung der Ovarien mit einer Vermehrung der reifen Follikel und Corpora lutea und dazu eine Verminderung des Uterusgewichtes. Sie deuten diese Veränderungen als morphologisches Substrat einer Hemmung der Oestrogen- und Gestagen-Synthese, die zu einer Vermehrung der Gonadotropine führt.

Wir haben uns in der vorliegenden Arbeit die Frage nach der Wirkung auf die Hodenzwischenzellen gestellt und berichten hier über die Auswirkungen von AG auf die Zwischenzellen der puberalen männlichen Ratte mit und ohne gleich-

zeitige Stimulation durch Choriogonadotropin (HCG). Wir tun dies besonders im Hinblick auf eine beim Menschen vorkommende Steroidsynthesestörung, das seltene Krankheitsbild der Lipoidhyperplasie der Nebennierenrinde, das von Siebenmann 1957 [23] beschrieben wurde. Die Lipoidhyperplasie geht nicht nur mit einer schweren und frühletalnen Nebennierenrinden-Insuffizienz einher, sondern auch mit einer mangelhaften Maskulinisierung der betroffenen männlichen Individuen. Zur Erklärung wurde deshalb durch Prader und Siebenmann [19] eine frühe Steroidsynthesestörung in der Nebenniere und im Hoden postuliert. Es ist bekannt, daß ein Ausfall des im fetalen Hoden gebildeten Testosterons zu einer mangelhaften Maskulinisierung des äußeren Genitale, zu einem Pseudohermaphroditismus masculinus externus führt (Jost [11]).

Die Wirkung eines hochwirksamen Adrenostaticums war für uns wegen der Möglichkeit der experimentellen Reproduktion der menschlichen Störung interessant, vor allem weil die experimentell nachgewiesene Blockade der Steroidsynthese durch AG an der gleichen Stelle erfolgt, wie sie von Prader und Siebenmann [19] bei der kongenitalen Lipoidhyperplasie postuliert wird.

Material und Methode¹

41 männliche Ratten (Stamm CF-Gif, Tierzuchtstation des Kantonalen Tierspitals Zürich) im Gewicht von 63—90 g wurden in 4 Gruppen aufgeteilt und während 12 Tagen wie folgt behandelt:

Gruppe A (8 Tiere): unbehandelte Kontrollen.

Gruppe B (13 Tiere): Aminoglutethimid, 30 mg/100 g; Körpergewicht 2mal täglich p.o.

Gruppe C (8 Tiere): HCG (Pregnyl) 20 IE/die i. m.

Gruppe D (12 Tiere): AG und HCG, Dosierung wie oben.

AG wurde, suspendiert in 4%iger Gummi arabicum-Lösung, per Schlundsonde verabreicht. Zur Stimulation der Zwischenzellen wurde menschliches Choriongonadotropin als „Pregnyl®“ verwendet und in täglich frisch bereiteter Lösung i. m. injiziert. Die Tiere wurden in Käfigen zu ca. 5 Ratten gehalten, Temperatur 21°C, Futter (Mischkörner-Rattenwürfel „Nafag“, Gossau/SG) und Wasser ad libitum. Gewichtskontrollen alle 2 Tage. Am 13. Tag wurden die Tiere in Chloroformnarkose durch Ausbluten getötet. — Vollständige Autopsien. Wägen von Nebenniere, Hoden und Prostata, Messen der Samenblasenlänge, Einteilung des Füllungszustandes der Samenblasen von 0 bis +++. Die Organgewichte wurden auf ein „Normaltier“ von 100 g Körpergewicht umgerechnet, ebenso die Samenblasenlänge mittels des Ähnlichkeitsgesetzes. Es wurden arithmetisches Mittel und Standardabweichung errechnet und die Werte mittels des *Wilcoxon-Testes* auf ihre Signifikanz geprüft. p-Werte von 0,05 und kleiner wurden als signifikant betrachtet.

Histologische Untersuchungen

Fixation eines Hodens und einer Nebenniere mit Formol-Sublimat, Paraffineinbettung, Stufenschnitte und Färbung mit HE. Histologische Beurteilung qualitativ und im Hoden auch quantitativ. Zählung der Zwischenzellen pro Tubulusquerschnitt (100 Tubulus-Querschnitte pro Tier) und Ermittlung des kleinsten mittleren Kerndurchmessers der Zwischenzellen (100 Zellkerne pro Tier).

Eine Nebenniere und die Hälfte des anderen Hodens wurden sofort auf Trockeneis gefroren und zu unfixierten Cryostatschnitten verarbeitet.

a) Darstellung der 3-β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase (-HSD) nach Wattenberg [26], modifiziert nach Levy, Deane und Rubin [15].

¹ Der Ciba AG, Basel, danken wir für die freundliche Überlassung der nötigen Mengen Aminoglutethimid und die notwendige Menge Pregnyl wurde uns in verdankenswerter Weise von der Fa. Organon zur Verfügung gestellt.

b) Nachweis der Succinatdehydrogenase (SDH) nach Nachlas [16].

Der Rest der Nebenniere und die andere Hälfte des Hodens wurden in 4% gepuffertem neutralem Formalin fixiert und zu Gefrierschnitten verarbeitet.

a) Färbung mit Sudan III zur Darstellung der Lipide.

b) Digitoninmethode zum Nachweis von Cholesterin und Liebermann-Burchardt-Reaktion nach Schultz zum Nachweis von Cholesterin und Cholesterinestern. (Diese unter b) angeführten Untersuchungen wurden nur bei einzelnen Tieren durchgeführt.)

Ergebnisse

Einzelheiten sind den Tabellen 1 und 2 zu entnehmen.

1. Allgemeines, Gewichtszunahme

AG beeinträchtigt den Allgemeinzustand der Versuchstiere schwer. Das Fell wird struppig und glanzlos, die motorische Aktivität stark vermindert. Die Versuchstiere werden vor allem in den Hinterbeinen auffallend kraftlos. HCG hat auf diese Wirkung keinen Einfluß, die zugleich mit HCG behandelten Tiere sind nicht weniger schwer beeinträchtigt. AG führt allein und bei gleichzeitiger HCG-Gabe zu einer starken, signifikanten Wachstumshemmung gemessen an der Gewichtszunahme, die sich ohne weiteres durch die verminderte Freßlust der Tiere erklären läßt. HCG allein fördert das Wachstum schwach signifikant.

2. Spontantodesfälle

Einzelne Tiere reagierten sehr stark auf AG, schon nach dreimaliger Verabreichung wurden sie soporös und verendeten. Bei der Autopsie keine Befunde, insbesondere waren die Nebennieren noch nicht verändert. Auch später kam es zu einzelnen Todesfällen, die wahrscheinlich auf Aspiration durch Beeinträchtigung des Schluckreflexes zu erklären sind. Die Nebennieren waren nach 4 Tagen bereits deutlich vergrößert und blaßgelblich verfärbt. Diese vorzeitig spontan verstorbene Versuchstiere wurden nicht weiter ausgewertet.

3. Nebennieren (Abb. 1 A—C)

Unter AG waren die Nebennieren signifikant vergrößert und wächsern-gelb verfärbt. Die Zona fasciculo-reticularis war auf das Doppelte verbreitert, die normale Architektonik verwischt, die kompakten Zellen waren zum großen Teil umgewandelt in Spongiocyten und vollgestopft mit doppellichtbrechenden sudanophilen Substanzen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Dexter, Fishman, Ney und Liddle [4] war in unserem Versuch die Lipoidspeicherung in den äußeren Rindenschichten stärker. Die Zona glomerulosa war unter AG deutlich verschmälert und nur schwer abgrenzbar, ihr Gesamtvolume dürfte aber wegen der größeren Oberfläche der vergrößerten Nebenniere nicht wesentlich verändert sein. Einzelne Glomerulosazellen enthalten unter AG fein- bis mitteltropfiges Lipoid, deutlich mehr als bei den Kontrolltieren.

HCG beeinflußte die Nebennieren makroskopisch nicht und mikroskopisch fand sich lediglich eine fragliche Verminderung und auffallend feintropfige Verteilung der sudanophilen Substanzen.

Unter AG fanden sich beim HCG-stimulierten Tier zwar die gleichartigen Veränderungen wie beim nicht stimulierten Tier, sowohl die makroskopischen wie

Tabelle 1. Wirkung von Aminoglutethimid (AG) und Choriongonadotropin (HCG) auf Allgemeinzustand und Nebenniere

Versuchsgruppe Behandlung ^a	Anzahl Tiere	Körper- gewicht g ^b	Gewichts- zunahme g ^b	Nebennieren		Histochemie		
				Makroskop. Befund		Histologischer Befund		
				Bel. Gewicht mg/100 g	Aspekt	Z. fasc. ret.	Spongio- cyten	Sudano- phil. Mat.
A Kontrollen	8	145	67 $\sigma=7,9$	13,8 $\sigma=1,4$	klein braunrot	—	+	+
B AG $2 \times 30 \text{ mg}/100 \text{ g/d}$	8	116	33 $\sigma=11,2$	46,2 $\sigma=8,7$	groß bläsigelb	++	++	+
C HCG $20 \text{ IE}/\text{d i.m.}$	8	151	72 $\sigma=6,8$	13,9 $\sigma=0,7$	klein braunrot	—	+	+
D AG und HCG wie oben	7	109	34 $\sigma=22,8$	31,9 $\sigma=10,9$	mittelgroß abgeblät	+(+)	++	+

Signifikanz (Wilcoxon-Test—p-Werte):

A/B	< 0,01.
A/C	> 0,1.
B/D	> 0,1.
C/D	< 0,05.
	< 0,01,
	> 0,1.
	> 0,1,
	< 0,01,
	< 0,01.

^a Versuchsdauer 12 Tage. AG-Dosis: $2 \times 30 \text{ mg}/100 \text{ g Körpergewicht}/\text{die per os}$. HCG-Dosis: 20 IE/die i.m.^b Am Schluß des Versuches.

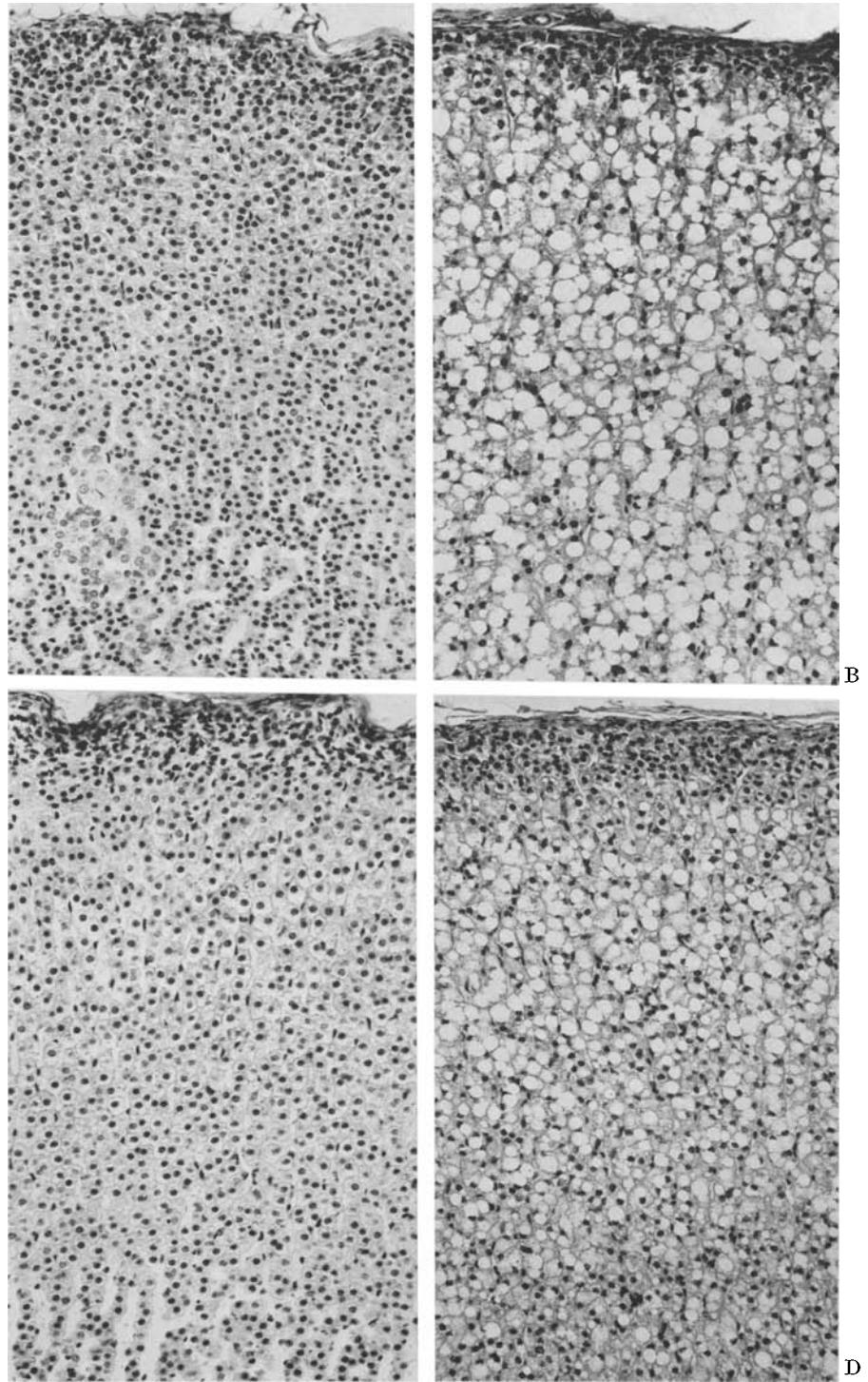


Abb. 1 A—D

Tabelle 2. Wirkung von AG und HCG auf Hoden, Prostata und Samenblase

Ver- suchs- gruppe	Hoden					Prostata mg/100 g	Samenblasen-	
	Gewicht mg/100 g	makr. Befund	Tubuli Spermio- genese	Zahl ^a	Kern- größe ^b		Länge ^c	Füllung
A	961 $\sigma=49$	descendiert	+	6,9 $\sigma=0,6$	8,8 $\sigma=0,6$	(+)	117 $\sigma=11$	7,0 $\sigma=0,8$
B	973 $\sigma=147$	3 mal desc. 5 mal n.desc.	(+)	7,5 $\sigma=0,8$	9,0 $\sigma=0,5$	+	69 $\sigma=9,6$	4,8 $\sigma=0,7$
C	939 $\sigma=38$	descendiert	+	18,2 $\sigma=2,7$	10,2 $\sigma=0,5$	+	320 $\sigma=22$	17,0 $\sigma=0,6$
D	1136 $\sigma=139$	descendiert	(+)	12,9 $\sigma=1,7$	9,9 $\sigma=0,4$	++	307 $\sigma=28$	14,1 $\sigma=1,9$

Signifikanz (Wilcoxon-Test = p-Werte):

A/B	>0,1	>0,1	>0,1	<0,01	<0,01
A/C	>0,1	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
B/D	>0,05	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
C/D	<0,01	<0,01	<0,02	>0,1	<0,01

^a Zahl der ZZ pro Tubulusquerschnitt, Mittel von 100 ausgezählten Tubulusquerschnitten.^b Kleinster mittlerer Kerndurchmesser bei 100 ausgemessenen Kernen/Tier.^c Umgerechnet auf ein „Normaltier“ von 100 g mittels des Ähnlichkeitsgesetzes, s. Text.

auch mikroskopischen Veränderungen waren aber deutlich *weniger* stark ausgesprochen, die Anschoppung der Spongiocyten mit Lipoidtropfen waren geringer, auch die Umwandlung von kompakten Zellen in Spongiocyten nicht so ausgesprochen.

Das mit *Digitoxin* nachweisbare Cholesterin und die *Liebermann-Burchardt-Reaktion* verhielten sich parallel zum Lipidgehalt. Die histochemische Darstellung der *SDH* und der *3-β-HSD* fielen in allen Gruppen *gleichmäßig positiv* aus.

4. Hoden

Die Ratten waren während des Versuches in der Pubertät, die Hoden bei den Gruppen A, C und D descendiert, bei Gruppe B bei 5 Tieren nicht descendiert. Die Zwischenzellen der unbehandelten Tiere zeigten wenig feintropfiges, nicht doppelbrechendes sudanophiles Material (Abb. 2A).

Abb. 1. Nebennierenrinde der Ratte unter Aminoglutethimid und HCG-wirkung, Versuchs-dauer 12 Tage, H.-E., 190×. A Unbehandeltes Kontrolltier. B Aminoglutethimid 2mal 30 mg/100 g täglich: ausgeprägte Hyperplasie der Fasciculo-Reticularis mit Umwandlung der Rindenzellen zu vacuolären Spongiocyten. C HCG 20 IE/die. D AG + HCG bei gleicher Dosierung: etwas geringere Hyperplasie der Fasciculo-Reticularis mit Ausbildung kleiner Spongiocyten

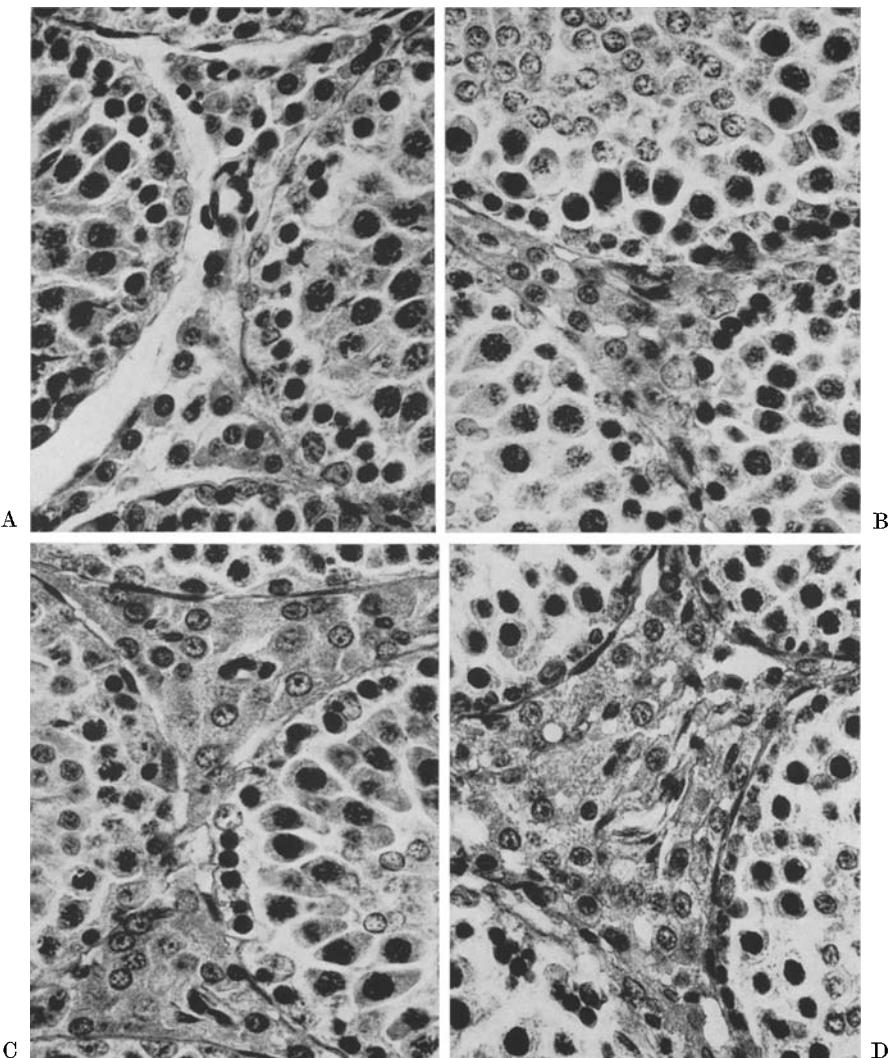


Abb. 2. Rattenhoden unter Aminoglutethimid und HCG-Wirkung, Versuchsdauer 12 Tage, H.-E., 480 \times . A Normales Kontrolltier. B Aminoglutethimid: Vermehrung und Vergrößerung der Zwischenzellen mit deutlicher partieller Vacuolisierung des Cytoplasmas. C HCG: beträchtliche Vermehrung und Vergrößerung der Zwischenzellen mit wenig vacuolisiertem feinkörnigem Cytoplasma. D AG + HCG: geringere Vermehrung und Vergrößerung der Zwischenzellen mit stärkerer Vacuolisierung

Unter AG allein ist das Hodengewicht nicht signifikant verändert, mikroskopisch erscheinen die Zwischenzellen vermehrt und ihre Kerne vergrößert. Die Meßwerte sind jedoch gegenüber den Kontrollwerten nicht signifikant verändert. Die Zellen enthalten aber vermehrt fein- und spärlich auch mitteltropfige nicht doppelbrechende sudanophile Substanzen (Abb. 2 B).

HCG führt ebenfalls zu keiner signifikanten Veränderung des Hodengewichts, wie erwartet ist die Zahl der Zwischenzellen stark vermehrt, die Zellkerne sind signifikant größer und zeigen ein stark aufgelockertes Chromatingerüst (funktionselles Kernödem). Die Zellen enthalten im reichlichen körnig-eosinophilen Cytoplasma spärlich feintropfiges, nicht doppelbrechendes, sudanophiles Material, in etwa der gleichen Menge wie die Kontrollen.

Die mit AG behandelten und HCG stimulierten Tiere zeigen eine signifikante Zunahme des Hodengewichts gegenüber den nur mit HCG stimulierten. Histologisch aber wird die Zunahme der Zwischenzellen unter HCG durch gleichzeitige AG-Gabe signifikant gehemmt, die Zellkerne sind weniger groß und chromatin-dichter. Die Zellen enthalten reichlich mittel- bis grobtropfiges, teilweise doppellichtbrechendes sudanophiles Material (Abb. 2C).

Weder mit der Digitonin-, noch mit der Schultz-Methode ließen sich in irgend einer Versuchsgruppe in den Zwischenzellen *Cholesterin* oder *Cholesterinester* nachweisen.

Die Wattenberg-Reaktion ergibt in den Gruppen A und B eine positive und etwa gleich starke Reaktion. Unter HCG ist die Reaktion deutlich stärker, da jedoch die Zahl der Zwischenzellen und damit der positiv reagierenden Zellen stark zugenommen hat, ist die Reaktion auf die Einzelzelle bezogen wohl etwa gleich stark. Unter AG und HCG-Stimulation ist die Reaktion deutlich schwächer, die Aktivität scheint leicht vermindert zu sein, eine genauere quantitative Aussage ist jedoch nicht möglich. Die Succinatdehydrogenase-Reaktion ist in allen Gruppen gleich deutlich positiv.

Die Kontrolltiere zeigen eine wechselnd ausgeprägte, teils unvollständige Spermiogenese. AG allein führte zu einer deutlichen Reifungshemmung. Durch HCG wurde die Spermiogenese kaum verändert, bei gleichzeitiger HCG-Stimulation ließ sich mit AG keine eindeutige Verminderung der Spermiogenese erreichen. Der Tubulusdurchmesser war nicht sichtbar verändert, auf eine quantitative Auswertung wurde verzichtet.

5. Prostata und Samenblasen

Gewicht der Prostata und Länge der Samenblasen stellen in unserer Versuchsanordnung ein Maß für die Androgensekretion der Zwischenzellen dar [18]. Unter der starken Stimulation der Zwischenzellen mit HCG nahm denn auch das Prostatagewicht stark zu, auch die Samenblasen waren stark verlängert und prall gefüllt. AG allein verringerte das Prostatagewicht signifikant, auch Samenblasenlänge und -füllung waren vermindert.

Beim HCG-stimulierten Tier führte AG dagegen nicht zu einer Gewichtsreduktion der Prostata, doch waren die Samenblasen signifikant kürzer und weniger gefüllt.

Diskussion

Die AG-Behandlung bewirkt in unserer Versuchsreihe die von früheren Untersuchungen bekannte *Lipoidhyperplasie der NNR*, sowie die schwere Beeinträchtigung des Allgemeinzustandes, die wohl teilweise auf eine NNR-Insuffizienz und Hypothyreose zurückzuführen ist. Die Anschnuppung von Lipiden, darunter Cholesterin und Cholesterinestern, in den zu Spongiocyten umgewandelten Zellen der Fasciculoreticularis ist gut mit dem postulierten Block der Steroidbiosynthese

zwischen dem Cholesterin und dem Pregnenolon vereinbar, während die Hyperplasie Ausdruck der infolge Cortisolmangels enthemmten ACTH-Stimulation der Rinde darstellt. Von den an der Steroidbiosynthese beteiligten Enzymen und Enzymkomplexen kann bekanntlich nur die 3- β -HSD histochemisch nachgewiesen werden und dieses Enzym ist bei unseren Versuchstieren trotz der schweren Störung durch das AG in den Rindenzenellen nachweisbar. Dieser Befund stimmt mit elektronenmikroskopischen Befunden [12] insofern gut überein, als das AG im wesentlichen eine schwere Mitochondrien-Veränderung mit zunehmender vacuolärer Auftreibung bewirkt, während das ER¹ lediglich die Zeichen der gesteigerten ACTH-Einwirkung zeigt. Beim gestörten Desmolasekomplex handelt es sich tatsächlich um ein mitochondriales Enzym und die gleichzeitige Beeinträchtigung der ebenfalls mitochondrialen 11- β -Hydroxylase und 18-Hydroxylase [12] mag wohl Folge dieser Mitochondrienveränderung sein. Da die 3- β -HSD ein mikrosomales Enzym ist, steht ihre unveränderte Darstellbarkeit trotz AG-Einwirkung mit den elektronenmikroskopischen Befunden in auffallend guter Übereinstimmung. An anderen Enzymen wurde lediglich noch die Bernsteinsäure-Dehydrogenase kontrolliert, um eine etwaige allgemeine Störung des Zellmetabolismus zu erfassen. Ihre Aktivität wird durch das AG nicht beeinträchtigt.

Die von uns gesuchten Veränderungen an den *Zwischenzellen des Hodens* sind gegenüber denjenigen der NNR-Zellen auffallend *bescheiden*: Zwar ist es zu einer eindeutig abnormen vacuolären Ansammlung von Lipiden in ihrem Cytoplasma gekommen, vereinzelt sind auch eigentliche kleine Schaumzellen (Abb. 2B) aufgetreten, hingegen fehlt die Vermehrung dieser Zellen und die in der NNR so eindrückliche Umwandlung zu großen Spongiocyten. Bei den Speicherstoffen handelt es sich um sudanophiles Material, in dem weder Cholesterin noch dessen Ester nachweisbar werden. Die enzymhistochemischen Befunde sind die gleichen wie in der NNR, d. h. sie zeigen keine Abweichung von der Norm. Zu einer Lipoidhyperplasie der Zwischenzellen kommt es also nicht. Andererseits ist die geringe Fettstoffspeicherung im Cytoplasma wohl doch als Korrelat einer Steroidsynthesestörung auch in den Zwischenzellen zu deuten, denn eindeutig ist die Verminderung der Androgenwirkung an den Erfolgsorganen Prostata und Samenblasen nachzuweisen. Sie ist auf eine inkretorische Insuffizienz der Hodenzwischenzellen und nicht auf die NNR-Insuffizienz zurückzuführen [3, 18]. Elektronenmikroskopische Untersuchungen, die zeigen würden, ob die Mitochondrien der Zwischenzellen unter AG analoge Veränderungen aufweisen wie diejenigen der NNR-Zellen, stehen zur Zeit noch aus.

Daß die Zwischenzellen trotz nachweisbarer Synthesestörung durch AG sich nicht zu Spongiocyten vermehren, mag mit der grundsätzlich andersartigen Funktionsweise dieser endokrinen Zellen zusammenhängen, bei denen es auch sonst nicht zur Bildung lipoidhaltiger Speicherformen kommt wie in der NNR.

Beim Menschen kommt es nur im kryptorchenen Hoden des Erwachsenen zu einer namhaften, manchmal geradezu spongiocytären Ansammlung von Fettstoffen in den Zwischenzellen, wobei noch nicht entschieden ist, ob dies eine Steroidsynthesestörung oder eine banale degenerative Verfettung darstellt.

Ferner reagieren die Zwischenzellen auf die Verminderung ihrer Androgenausschüttung nicht mit einer Hyperplasie. Es läßt sich dies so deuten, daß das über-

¹ ER = Endoplasmatische Reticulum.

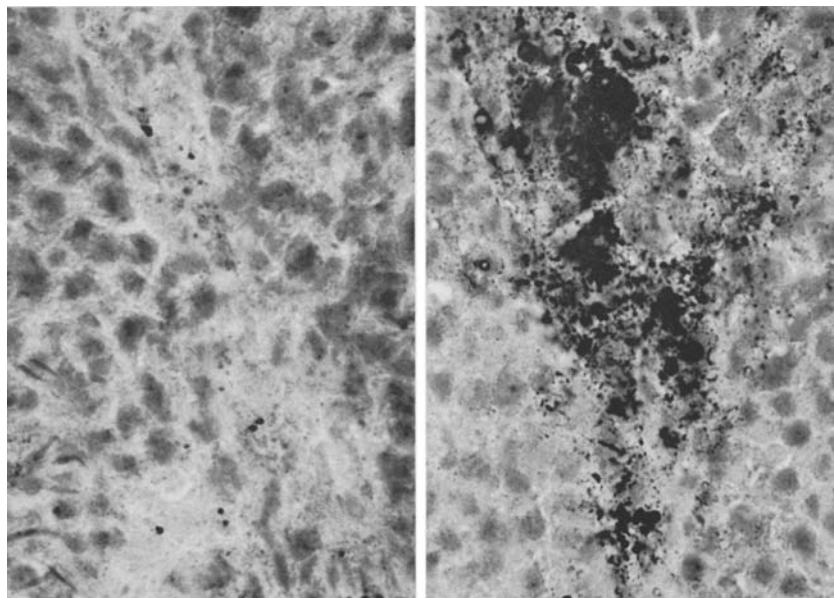


Abb. 3. Aminoglutethimid-Wirkung auf die Zwischenzellen des Rattenhodens bei Choriongonadotropin-Stimulation: (Sudanfärbung, Cryostatschnitt, 480 \times). A Unbehandeltes Kontrolltier: spärliche kleine sudanophile Tropfen in den Zwischenzellen. B AG + HCG: reichlich kleine und große sudanophile Tropfen in den vermehrten Zwischenzellen

geordnete gonadotrope hypothalamisch-hypophysäre System viel träger reagiert und der erzeugte Androgenmangel zu gering oder zu kurzdauernd war. Wir haben deshalb versucht, ausgeprägtere AG-bedingte Zwischenzellveränderungen zu erzwingen, indem wir eine *exogene gonadotrope Stimulation* mit Hilfe von humanem Choriongonadotropin (HCG) setzten. Sie führte zur bekannten massiven Hyperplasie und Hypertrophie der Zwischenzellen (Abb. 2C) ohne Speicherung von Lipiden und zur quantitativ faßbaren Steigerung der Androgenwirkung an den Erfolgsorganen. Die NNR war nicht faßbar verändert.

An den so *stimulierten* Zwischenzellen führte nun das AG zu einer signifikant geringeren Vermehrung und signifikant geringeren Kernvergrößerung als bei den lediglich mit HCG stimulierten Tieren. Die Zellen waren aber gegenüber den unbehandelten Kontrollen und den nur mit AG behandelten immer noch signifikant vermehrt und ihre Kerne immer noch signifikant größer. An diesen Parametern überwog also die HCG-Wirkung. Qualitativ aber zeigte sich die AG-Wirkung an einer sehr deutlichen fein- und grobvacuolären Lipidspeicherung, wiederum ohne nachweisbares Cholesterin, im Cytoplasma. Sie entsprach im einzelnen ungefähr der Speicherung unter AG allein, war aber infolge der größeren Zellmasse eindrücklicher (Abb. 3). Auch bei diesen stimulierten Hoden ließ sich jedoch nicht ein der NNR analoges Bild, d. h. eine eigentliche Lipoidhyperplasie erzeugen. Die enzymhistochemischen Befunde im Hoden entsprachen denen der lediglich mit HCG stimulierten Hoden, d. h. die 3- β -HSD-Aktivität der Zwischenzellen war stark positiv und die SDH-Aktivität war normal.

Die Befunde an den Androgen-Erfolgsorganen entsprachen durchaus dem Hodenbefund: Gegenüber den nicht HCG-stimulierten Tieren waren Prostata und Samenblasen immer noch signifikant vergrößert. Die zusätzliche AG-Behandlung bewirkte eine signifikant geringere Samenblasenvergrößerung, während die etwas geringere Prostatavergrößerung sich statistisch nicht signifikant von der Hypertrophie nach alleiniger HCG-Stimulation unterschied. Wir können daraus schließen, daß AG auch in dieser Versuchsgruppe die Androgensekretion hemmt, daß aber diese Hemmung bei unserer Dosiswahl durch die HCG-Stimulation durchbrochen wird.

Gesamthaft darf aus allen Versuchen geschlossen werden, daß AG in den Zwischenzellen die Androgenbiosynthese hemmt, daß aber dabei nur eine mäßige Anschoppung von Fettsubstanzen, darunter möglicherweise lipoide Hormonvorstufen im Hoden zustande kommt. Eine Bildung von Spongiocyten ist nur angedeutet und wird auch durch eine Choriongonadotropinstimulation nicht auf das in der NNR realisierte Maß gesteigert. Interessant ist die gleichzeitige Auswirkung von HCG und AG auf die Hodenzwischenzellen, indem es dabei offenbar zu einer sich konkurrenzierenden Stimulation und Hemmung ihrer Funktion kommt, die sich auch morphologisch an den Zellen und den Erfolgsorganen wieder-spiegelt. Wir haben keine plausible Erklärung für die Tatsache, daß die AG-induzierte Lipoïdhyperplasie der NNR (Abb. 1B und D) bei gleichzeitiger HCG-Gabe statistisch signifikant geringer ausfällt als ohne diese. Auch bei der einfachen Betrachtung fällt schon die geringfügigere Ausbildung von NNR-Spongiocyten auf. Entweder wird die AG-Wirkung auf die NNR-Zelle durch das HCG hemmend beeinflußt, oder aber das HCG hat einen — morphologisch nicht faßbaren — eigenständigen Einfluß auf die NNR-Zelle, welcher der AG-Wirkung zuwiderläuft. Auch hier werden vielleicht ultrastrukturelle Untersuchungen klärend wirken.

Mit dem menschlichen Krankheitsbild der *kongenitalen Lipoïdhyperplasie der NNR* mit Pseudohermaphroditismus masculinus externus bei den männlichen Säuglingen stimmen unsere Befunde in einer Beziehung überein. Es sind bei dem einzigen Fall, in dem das Krankheitsbild bei einem Neugeborenen untersucht werden konnte (Fall Dhom), in den noch nachweisbaren fetalen Zwischenzellen zwar Fettstoffe nachweisbar, jedoch ebenfalls keine Spongiocyten wie in der NNR aufgebildet. Dieser negative Befund beim Menschen läßt auf Grund unserer Versuche eine insuffiziente Androgenbildung infolge eines gleichartigen Syntheseblockes in NNR und Hodenzwischenzellen nicht ausschließen.

Die Möglichkeit mit Hilfe von AG das menschliche Krankheitsbild experimentell zu reproduzieren, ist also eindeutig gegeben und der Versuch dazu wurde kürzlich (nachdem wir unsere Versuche begannen) von Goldmann [8] vorgenommen. Er konnte durch AG-Behandlung schwangerer Ratten bei 50% der männlichen Feten eine Hypospadie erzeugen. Es gelingt also zum mindesten eine partielle Hemmung der Androgenbildung durch den fetalen Hoden und damit eine partielle Hemmung der davon abhängigen Maskulinisierung des äußeren Genitale. Atypischerweise und zum menschlichen Krankheitsbild nicht passend kam es jedoch auch zu einer partiellen Maskulinisierung der weiblichen Feten, gesamthaft also ein Befund, wie er eher zum adrenogenitalen Syndrom infolge 3- β -HSD-Mangel beim Menschen paßt. Offenbar kommt es bei männlichen und

weiblichen Feten unter der maternellen AG-Gabe zu einer pathologischen Androgensekretion durch die NNR. In dieser Hinsicht konnte also der für die menschliche kongenitale Lipoidhyperplasie postulierte Biosyntheseblock infolge eines hereditären Enzymdefektes durch die AG-Wirkung nicht exakt reproduziert werden. Dafür ist der Eingriff in das subtile Enzymmuster der NNR- und Hodenzwischenzellen durch die Fremdstoffsubstanz doch zu grob. Trotzdem dürfen wir von der weiteren tierexperimentellen Anwendung von AG und anderer analog wirkender Substanzen noch einige wichtige neue Einsichten in Struktur und Funktion der steroidbildenden endokrinen Einzelzelle erwarten.

Literatur

1. Camacho, A. M., Cash, R., Brough, A. J., Wilroy, R. S.: Inhibition of adrenal steroidogenesis by amino-glutethimide and the mechanism of action. *J. Amer. med. Ass.* **202**, 114—120 (1967).
2. Cash, R., Brough, A. J., Cohen, M. N. P., Satoh, P. S.: Aminoglutethimide (Elipten-Ciba) as an inhibitor of adrenal steroidogenesis: Mechanism of action and therapeutic trial. *J. clin. Endocr.* **27**, 1239—1248 (1967).
3. Deane, H. W.: The anatomy, chemistry and physiology of adrenocortical tissue, p. 135ff. In: *Handbuch der experimentellen Pharmakologie*, Bd. 14, Teil 1. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1962.
4. Dexter, R. N., Fishman, L. M., Ney, R. L., Liddle, G. W.: Inhibition of adrenal corticosteroid synthesis by aminoglutethimide: Studies of the mechanism of action. *J. clin. Endocr.* **27**, 473—480 (1967).
5. Dorfman, R. I.: Biochemistry of the adrenocortical hormones, p. 452ff. In: *Handbuch der experimentellen Pharmakologie*, Bd. 14, Teil 1. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1962.
6. Fishman, L. M., Liddle, G. W., Island, D. P., Fleischer, N., Küchel, O.: Effects of aminoglutethimide on adrenal function in man. *J. clin. Endocr.* **27**, 481—490 (1967).
7. Gaunt, R., Steinertz, B. G., Chart, J. J.: Pharmacologic alteration of steroid hormone functions. *Clin. Pharmacol. Ther.* **9**, 657—681 (1968).
8. Goldman, A. S.: Production of congenital lipoid adrenal hyperplasia in rats and inhibition of cholesterol side-chain cleavage. *Endocrinology* **86**, 1245 (1970).
9. Herzer, H.: Die Wirkung von Amphenon auf die Hodenzwischenzellen der Ratte. *Schweiz. med. Wschr.* **97**, 14—19 (1967).
10. Horoky, K., Küchel, O., Gregorova, I., Jirankova, J., Matys, Z.: Klinische Erfahrungen mit Aminoglutethimid (Elipten), einem neuen Inhibitor der Steroidbiosynthese in der Nebenniere. *Schweiz. med. Wschr.* **98**, 1843—1851 (1968).
11. Jost, A.: Embryonic sexual differentiation. In: *Hermaphroditism, genital anomalies and related endocrine disorders*, hrsg. von Jones H. W. und Scott, W. W. Baltimore: Williams & Wilkins Co. 1958.
12. Kadioglu, D., Harrison, R. G.: The functional relationships of mitochondria in the rat adrenal cortex. *J. Anat. (Lond.)* **110**, 2, 283—296 (1971).
13. Kahnt, F. W., Neher, R.: Über die adrenale Steroid-Biosynthese in vitro. III. Selektive Hemmung der Nebennierenrinden-Funktion. *Helv. chim. Acta* **49**, fasc. 1, 725—732 (1966).
14. Kracht, J.: Die Nebennierenrinde bei chemischer Adrenostase. *Allergie u. Asthma* **7**, 264—271 (1961).
15. Levy, H., Deane, H. W., Rubin, B. L.: Visualization of steroid-3 β -ol-dehydrogenase activity in tissues of intact and hypophysectomized rats. *Endocrinology* **65**, 932—943 (1959).
16. Pearse A. G. E.: *Histochemistry, theoretical and applied*, S. 910. London: J. & A. Churchill 1960.
17. Pittman, J. A., Brown, R. W.: Antithyroid and antiadrenocortical activity of aminoglutethimide. *J. clin. Endocr.* **26**, 1014—1016 (1966).

18. Poumeau-Delille, G.: Techniques biologiques en endocrinologie experimentale chez le rat. Paris: Masson & Cie. 1953.
19. Prader, A., Siebenmann, R. E.: Nebenniereninsuffizienz bei kongenitaler Lipoidhyperplasie der Nebennieren. *Helv. paediat. Acta* **12**, 569—595 (1957).
20. Rallison, M. L., Tyler, F. H., Kumagi, L. F.: Goitrous hypothyroidism induced by an anticonvulsant drug. *J. Pediat.* **65**, 1095—1096 (1964).
21. Schteingart, D. E., Cash, R., Conn, J. W.: Amino-glutethimide and metastatic adrenal cancer: Maintained reversion of Cushing's syndrome. *J. Amer. med. Ass.* **198**, 1007—1010 (1966).
22. Schteingart, D. E., Conn, J. W.: Effects of aminoglutethimide upon adrenal function and cortisol metabolism in Cushing's syndrome. *J. clin. Endocr.* **27**, 1657—1666 (1967).
23. Siebenmann, R. E.: Die kongenitale Lipoidhyperplasie der Nebenniere mit Nebennierenrinden-Insuffizienz. *Schweiz. Z. Path.* **20**, 77 (1957).
24. Smilo, R. P., Earll, J. M., Forsham, P. H.: Suppression of tumourous adrenal hyperfunction by amino-glutethimide. *Metabolism* **16**, 374—377 (1967).
25. Starka, L., Motlik, K.: The influence of injected aminoglutethimide on the morphology of the rat adrenal cortex and adrenal metabolism of progesterone. *Endokrinologie* **58**, 75—86 (1971).
26. Wattenberg, L. W.: Microscopic histochemical demonstration of steroid- 3β -ol-dehydrogenase in tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.* **6**, 225—232 (1958).
27. Zavadil, M., Schreiber, V., Kmentova-Zbuzkova, V.: Die Veränderungen am Ovarium von Ratten nach Applikation von Aminoglutethimid (Elipten-CIBA). *Endokrinologie* **53**, 405—410 (1968).

PD Dr. R. Siebenmann
Pathologisches Institut
Stadtspital Triemli
CH-8055 Zürich/Schweiz