Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Giessen

Immunhistologische und morphometrische Untersuchungen zur proliferativen Aktivität adrenokortikaler Zellen der Wistar-Ratte

> INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen

> > Eingereicht von ANJA KNIPPEL

> > > Gießen 2003

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Giessen

Betreuer: Prof. Dr. W. Baumgärtner

Immunhistologische und morphometrische Untersuchungen zur proliferativen Aktivität adrenokortikaler Zellen der Wistar-Ratte

> INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen

Eingereicht von ANJA KNIPPEL Tierärztin aus Duisburg (Nordrhein-Westfalen)

Gießen 2003

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann

- 1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Baumgärtner
- 2. Berichterstatter: H Doz. Dr. G. Schuler

Tag der mündlichen Prüfung: 08.04.2003

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

| 2. LITERATURÜBERSICHT 2 | | |
|-------------------------|--|----|
| 2.1 | Zellproliferation | 2 |
| 2.1.1 | Zellzyklus | 4 |
| 2.1.2 | Zellproliferation und Kanzerogenese | 6 |
| 2.1.3 | Genotoxische Kanzerogene | 8 |
| 2.1.4 | Nichtgenotoxische Kanzerogene | 9 |
| 2.1.5 | Anwendung von Zellproliferationsmessungen | 10 |
| 2.1.6 | Methoden zur Messung der Zellproliferation | 12 |
| 2.1.6.1 | Mitose-Zählung | 12 |
| 2.1.6.2 | Metaphase-Arrest Technik | 13 |
| 2.1.6.3 | Exogene Proliferationsmarker | 13 |
| 2.1.6.3.1 | ³ H-Thymidin | 14 |
| 2.1.6.3.2 | 5-Bromo-2'-Desoxyuridin (BrdU) | 14 |
| 2.1.6.4 | Endogene Proliferationsmarker | 17 |
| 2.1.6.4.1 | "Proliferating cell nuclear antigen" (PCNA) | 17 |
| 2.1.6.4.2 | Ki-67 | 17 |
| 2.1.6.4.3 | Histone | 18 |
| 2.2 | Zelltod | 19 |
| 2.2.1 | Nomenklatur | 19 |
| 2.2.2 | Vergleich zwischen Apoptose und Onkose | 20 |
| 2.2.3 | Apoptose und Kanzerogenese | 21 |
| 2.2.4 | Feststellung der Apoptose am Paraffinschnitt | 21 |
| 2.2.4.1 | Histologisches Erscheinungsbild | 21 |
| 2.2.4.2 | "TUNEL-Assay" | 23 |
| 2.3 | Die Nebennierenrinde der Ratte | 26 |
| 2.3.1 | Anatomie und Histologie | 26 |
| 2.3.2 | Nebennierenrindenproliferation | 27 |
| 2.3.3 | "Labeling Index", Datenmaterial | 29 |
| 2.3.4 | Zytogenese | 31 |
| 2.3.5 | Substanzwirkungen auf die Zellproliferation | 33 |
| 2.3.5.1 | АСТН | 33 |
| 2.3.5.2 | Dexamethason | 36 |
| 2.3.5.3 | Aminomethyl-Chroman-Derivat | 38 |
| 2.3.6 | Substanzwirkungen auf die Steroidsynthese | 38 |
| 2.3.6.1 | ACTH | 39 |
| 2.3.6.2 | Dexamethason | 39 |
| 2.3.6.3 | Aminomethyl-Chroman-Derivat | 40 |

Seite

1

3. MATERIAL UND METHODEN

| 41 |
|----|
|----|

62

| 3.1 | Untersuchungsmaterial | 41 |
|---|--|--|
| 3.1.1 | Tiere, Alter, Haltungsbedingungen | 41 |
| 3.1.2 | Tierzahl und Gruppeneinteilung | 41 |
| 3.1.3 | Applikation und Dosierung | 42 |
| 3.1.4 | BrdU-Applikation | 42 |
| 3.1.4.1 | Pumpenvorbereitung | 43 |
| 3.1.4.2 | Pumpenimplantation | 43 |
| 3.1.5 | Blutentnahme | 44 |
| 3.1.6 | Sektion | 44 |
| 3.1.7 | Histotechnik | 44 |
| 3.2 | Untersuchungsmethoden | 45 |
| 3.2.1 | Hämatoxylin-Eosin-Färbung | 45 |
| 3.2.2 | BrdU-Nachweis | 45 |
| 3.2.2.1 | Verwendete Reagenzien | 45 |
| 3.2.2.2 | Biotin-Streptavidin Amplified (B-SA)-Technik | 46 |
| 3.2.2.3 | Methodische Kontrollen | 48 |
| 3.2.3 | TUNEL-Methodik | 48 |
| 3.2.3.1 | Methodische Kontrollen | 50 |
| | | |
| 3.3 | Histometrische Untersuchungen | 51 |
| 3.3 3.3.1 | Methodenetablierung (Vorversuch) | 51 51 |
| 3.3 3.3.1 3.3.1.1 | Histometrische UntersuchungenMethodenetablierung (Vorversuch)Material und Fragestellungen | 51 51 51 |
| 3.3 3.3.1 3.3.1.1 3.3.1.2 | Histometrische UntersuchungenMethodenetablierung (Vorversuch)Material und FragestellungenZonale Unterteilung der Nebennierenrinde | 51 51 51 51 |
| 3.3 3.3.1 3.3.1.1 3.3.1.2 3.3.1.3 | Histometrische UntersuchungenMethodenetablierung (Vorversuch)Material und FragestellungenZonale Unterteilung der NebennierenrindeErmittlung des "Labeling Index" | 51 51 51 51 52 |
| 3.3 3.3.1 3.3.1.1 3.3.1.2 3.3.1.3 3.3.1.4 | Histometrische UntersuchungenMethodenetablierung (Vorversuch)Material und FragestellungenZonale Unterteilung der NebennierenrindeErmittlung des "Labeling Index"Art und Dauer der BrdU-Exposition | 51 51 51 51 52 52 |
| 3.3 3.3.1 3.3.1.1 3.3.1.2 3.3.1.3 3.3.1.4 3.3.1.5 | Histometrische UntersuchungenMethodenetablierung (Vorversuch)Material und FragestellungenZonale Unterteilung der NebennierenrindeErmittlung des "Labeling Index"Art und Dauer der BrdU-ExpositionKriterien für die Zellkernzählung | 51 51 51 51 52 52 52 53 |
| 3.3 3.3.1 3.3.1.1 3.3.1.2 3.3.1.3 3.3.1.4 3.3.1.5 3.3.1.6 | Histometrische UntersuchungenMethodenetablierung (Vorversuch)Material und FragestellungenZonale Unterteilung der NebennierenrindeErmittlung des "Labeling Index"Art und Dauer der BrdU-ExpositionKriterien für die ZellkernzählungAuszählung mit Hilfe eines Okularrasters | 51 51 51 52 52 53 54 |
| 3.3 3.3.1 3.3.1.1 3.3.1.2 3.3.1.3 3.3.1.4 3.3.1.5 3.3.1.6 3.3.1.7 | Histometrische UntersuchungenMethodenetablierung (Vorversuch)Material und FragestellungenZonale Unterteilung der NebennierenrindeErmittlung des "Labeling Index"Art und Dauer der BrdU-ExpositionKriterien für die ZellkernzählungAuszählung mit Hilfe eines OkularrastersWahl der auszuwertenden Rasterflächen | 51 51 51 52 52 53 54 54 |
| 3.3 3.3.1 3.3.1.1 3.3.1.2 3.3.1.3 3.3.1.4 3.3.1.5 3.3.1.6 3.3.1.7 3.3.1.8 | Histometrische UntersuchungenMethodenetablierung (Vorversuch)Material und FragestellungenZonale Unterteilung der NebennierenrindeErmittlung des "Labeling Index"Art und Dauer der BrdU-ExpositionKriterien für die ZellkernzählungAuszählung mit Hilfe eines OkularrastersWahl der auszuwertenden RasterflächenKorrekturen | 51 51 51 52 52 53 54 54 55 |
| 3.3 3.3.1 3.3.1.1 3.3.1.2 3.3.1.3 3.3.1.4 3.3.1.5 3.3.1.6 3.3.1.7 3.3.1.8 3.3.1.9 | Histometrische UntersuchungenMethodenetablierung (Vorversuch)Material und FragestellungenZonale Unterteilung der NebennierenrindeErmittlung des "Labeling Index"Art und Dauer der BrdU-ExpositionKriterien für die ZellkernzählungAuszählung mit Hilfe eines OkularrastersWahl der auszuwertenden RasterflächenKorrekturenStatistische Analyse der Variabilitätsfaktoren | 51 51 51 52 52 53 54 54 55 56 |
| 3.3 3.3.1 3.3.1.1 3.3.1.2 3.3.1.3 3.3.1.4 3.3.1.5 3.3.1.6 3.3.1.7 3.3.1.8 3.3.1.9 3.3.2 | Histometrische UntersuchungenMethodenetablierung (Vorversuch)Material und FragestellungenZonale Unterteilung der NebennierenrindeErmittlung des "Labeling Index"Art und Dauer der BrdU-ExpositionKriterien für die ZellkernzählungAuszählung mit Hilfe eines OkularrastersWahl der auszuwertenden RasterflächenKorrekturenStatistische Analyse der VariabilitätsfaktorenHauptversuch | 51 51 51 52 52 53 54 54 55 56 57 |
| 3.3 3.3.1 3.3.1.1 3.3.1.2 3.3.1.3 3.3.1.4 3.3.1.5 3.3.1.6 3.3.1.7 3.3.1.8 3.3.1.9 3.3.2 3.3.2.1 | Histometrische UntersuchungenMethodenetablierung (Vorversuch)Material und FragestellungenZonale Unterteilung der NebennierenrindeErmittlung des "Labeling Index"Art und Dauer der BrdU-ExpositionKriterien für die ZellkernzählungAuszählung mit Hilfe eines OkularrastersWahl der auszuwertenden RasterflächenKorrekturenStatistische Analyse der VariabilitätsfaktorenHauptversuchAuswertung der BrdU-Immunhistologie | 51 51 51 52 52 53 54 54 55 56 57 57 |
| 3.3 3.3.1 3.3.1.1 3.3.1.2 3.3.1.3 3.3.1.4 3.3.1.5 3.3.1.6 3.3.1.7 3.3.1.8 3.3.1.9 3.3.2 3.3.2.1 3.3.2.2 | Histometrische UntersuchungenMethodenetablierung (Vorversuch)Material und FragestellungenZonale Unterteilung der NebennierenrindeErmittlung des "Labeling Index"Art und Dauer der BrdU-ExpositionKriterien für die ZellkernzählungAuszählung mit Hilfe eines OkularrastersWahl der auszuwertenden RasterflächenKorrekturenStatistische Analyse der VariabilitätsfaktorenHauptversuchAuswertung der BrdU-ImmunhistologieAuswertung der TUNEL-Methodik | 51 51 51 52 52 53 54 54 55 56 57 57 58 |
| 3.3 3.3.1 3.3.1.1 3.3.1.2 3.3.1.3 3.3.1.4 3.3.1.5 3.3.1.6 3.3.1.7 3.3.1.8 3.3.1.9 3.3.2 3.3.2.1 3.3.2.2 3.3.2.3 | Histometrische UntersuchungenMethodenetablierung (Vorversuch)Material und FragestellungenZonale Unterteilung der NebennierenrindeErmittlung des "Labeling Index"Art und Dauer der BrdU-ExpositionKriterien für die ZellkernzählungAuszählung mit Hilfe eines OkularrastersWahl der auszuwertenden RasterflächenKorrekturenStatistische Analyse der VariabilitätsfaktorenHauptversuchAuswertung der BrdU-ImmunhistologieAuswertung der TUNEL-MethodikKriterien für die Zellzählung | 51 51 51 52 52 53 54 54 55 56 57 57 58 59 |
| 3.3 3.3.1 3.3.1.1 3.3.1.2 3.3.1.3 3.3.1.4 3.3.1.5 3.3.1.6 3.3.1.7 3.3.1.8 3.3.1.9 3.3.2 3.3.2.1 3.3.2.3 3.4 | Histometrische UntersuchungenMethodenetablierung (Vorversuch)Material und FragestellungenZonale Unterteilung der NebennierenrindeErmittlung des "Labeling Index"Art und Dauer der BrdU-ExpositionKriterien für die ZellkernzählungAuszählung mit Hilfe eines OkularrastersWahl der auszuwertenden RasterflächenKorrekturenStatistische Analyse der VariabilitätsfaktorenHauptversuchAuswertung der BrdU-ImmunhistologieAuswertung der TUNEL-MethodikKriterien für die ZellzählungStatistische Auswertung | 51 51 51 52 52 53 54 54 55 56 57 57 58 59 60 |
| 3.3 3.3.1 3.3.1.1 3.3.1.2 3.3.1.3 3.3.1.4 3.3.1.5 3.3.1.6 3.3.1.7 3.3.1.8 3.3.1.9 3.3.2 3.3.2.1 3.3.2.2 3.3.2.3 3.4 3.4.1 | Histometrische UntersuchungenMethodenetablierung (Vorversuch)Material und FragestellungenZonale Unterteilung der NebennierenrindeErmittlung des "Labeling Index"Art und Dauer der BrdU-ExpositionKriterien für die ZellkernzählungAuszählung mit Hilfe eines OkularrastersWahl der auszuwertenden RasterflächenKorrekturenStatistische Analyse der VariabilitätsfaktorenHauptversuchAuswertung der BrdU-ImmunhistologieAuswertung der TUNEL-MethodikKriterien für die ZellzählungBrdU-Immunhistologie und TUNEL-Methodik | 51 51 51 52 52 53 54 54 55 56 57 57 58 59 60 60 |

4. ERGEBNISSE

4.1 Körpergewichte 62 Körpergewichtsentwicklung und Futterverbrauch 4.1.1 62 Terminale Körpergewichte, Woche 1 4.1.2 66 Terminale Körpergewichte, Woche 4 4.1.3 67 Nebennierengewichte 4.2 68 Woche 1 4.2.1 68 Woche 4 4.2.2 69 4.3 Leber-, Milz-, Thymus- und Hypophysengewichte 70

| 4.3.1 | Woche 1 | 70 |
|---------|--|-----|
| 4.3.2 | Woche 4 | 71 |
| 4.4 | Makroskopische und histologische Befunde | 72 |
| 4.5 | Ergebnisse der Blutuntersuchung | |
| 4.6 | Ergebnisse des Vorversuches | 75 |
| 4.6.1 | Varianzkomponenten für die Zona glomerulosa | 75 |
| 4.6.2 | Varianzkomponenten für die Zona fasciculata | 76 |
| 4.6.3 | Statistische Aussagekraft | 78 |
| 4.6.4 | Zusammenfassung der Auszählmethodik | 78 |
| 4.7 | Morphometrie (BrdU-Hauptversuch) | 79 |
| 4.7.1 | Auswertung der Gruppen nach Zonen | 80 |
| 4.7.1.1 | Zona glomerulosa, Woche 1 | 80 |
| 4.7.1.2 | Zona glomerulosa, Woche 4 | 81 |
| 4.7.1.3 | Zona fasciculata, Woche 1 | 82 |
| 4.7.1.4 | Zona fasciculata, Woche 4 | 83 |
| 4.7.1.5 | Zona reticularis, Woche 1 | 84 |
| 4.7.1.6 | Zona reticularis, Woche 4 | 85 |
| 4.7.2 | Vergleich zwischen Woche 1 und Woche 4 | 86 |
| 4.7.2.1 | Zona glomerulosa | 86 |
| 4.7.2.2 | Zona fasciculata | 87 |
| 4.7.2.3 | Zona reticularis | 88 |
| 4.7.3 | Vergleich zwischen rechter und linker Nebenniere | 89 |
| 4.7.3.1 | Zona glomerulosa, Kontrollgruppe, Woche 1 | 89 |
| 4.7.3.2 | Zona glomerulosa, Kontrollgruppe, Woche 4 | 90 |
| 4.7.3.3 | Zona fasciculata, Kontrollgruppe, Woche 1 | 91 |
| 4.7.3.4 | Zona fasciculata, Kontrollgruppe, Woche 4 | 92 |
| 4.7.3.5 | Zona reticularis, Kontrollgruppe, Woche 1 | 93 |
| 4.7.3.6 | Zona reticularis, Kontrollgruppe, Woche 4 | 94 |
| 4.8 | Kombinierte Betrachtung der Nebennieren- | 95 |
| | gewichte und "Labeling-Indizes" | |
| 4.8.1 | Zona fasciculata, Woche 1 | 96 |
| 4.8.2 | Zona fasciculata, Woche 4 | 97 |
| 4.9 | Morphometrie (TUNEL-Methodik) | 98 |
| 4.9.1 | Auswertung der Gruppen nach Zonen | 99 |
| 4.9.1.1 | Zona glomerulosa, Woche 1 | 99 |
| 4.9.1.2 | Zona glomerulosa, Woche 4 | 100 |
| 4.9.1.3 | Zona fasciculata, Woche 1 | 101 |
| 4.9.1.4 | Zona fasciculata, Woche 4 | 102 |
| 4.9.1.5 | Zona reticularis, Woche 1 | 103 |
| 4.9.1.6 | Zona reticularis, Woche 4 | 104 |

5. DISKUSSION

105

| Körper- und Organgewichte | 105 |
|--|--|
| Plasmahormonspiegel | 109 |
| Methodik der Zellproliferationsmessung | 111 |
| Wahl des Markers | 111 |
| Immunhistologischer BrdU-Nachweis | 112 |
| Morphometrische Auswertestrategie | 113 |
| | Körper- und Organgewichte Plasmahormonspiegel Methodik der Zellproliferationsmessung Wahl des Markers Immunhistologischer BrdU-Nachweis Morphometrische Auswertestrategie |

| 5.3.4 | Vergleich des "Labeling Index" mit Literaturangaben | 113 |
|-------|---|-----|
| 5.4 | BrdU-Immunhistologische Auswertung | 115 |
| 5.4.1 | Proliferationsdaten der einzelnen | 115 |
| | Behandlungsgruppen | |
| 5.4.2 | Proliferationsdaten der einzelnen Zonen | 118 |
| 5.4.3 | Proliferationsdaten der rechten und linken Nebenniere | 120 |
| 5.5 | Nebennierengewichte und "Labeling-Indizes" | 120 |
| 5.6 | Apoptose der Nebennierenrinde | 122 |
| 5.6.1 | TUNEL-Methodik | 123 |
| 5.6.2 | TUNEL-positive Zellen in den einzelnen | 124 |
| | Behandlungsgruppen | |

6. ZUSAMMENFASSUNG

127

129

7. SUMMARY

8. ANHANG

131

| 8.1 | Abbildungen | 131 |
|-------|--|-----|
| 8.2 | Vorversuch ("Labeling-Indizes") | 134 |
| 8.3 | ACTH- und Kortikosteronblutplasma- | 136 |
| | konzentrationen | |
| 8.4 | Hauptversuch ("Labeling-Indizes") | 138 |
| 8.5 | Lösungen, Puffer, Bezugsquellen | 144 |
| 8.5.1 | Lösungen für die H&E-Färbung | 144 |
| 8.5.2 | Lösungen und Puffer für die immunhistologische | 144 |
| | BrdU-Färbung | |
| 8.5.3 | Bezugsquellen | 145 |

9. LITERATURVERZEICHNIS

147

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| Abb. | Abbildung | | |
|---------|--|--|--|
| АСТН | Adrenokortiokotrophes Hormon | | |
| AgNOR | "Argyrophilic Nuclear Organizer Regions" | | |
| AI | Apoptoseindex | | |
| BrdU | 5-Bromo-2'-desoxyuridin | | |
| cAMP | "cyclic adenosine monophosphate" | | |
| CRH | "corticotropin releasing hormone" | | |
| D | Dopamin | | |
| d | Tag | | |
| DAB | Diaminobenzidintetrahydrochlorid | | |
| Dexa. | Dexamethason | | |
| DNA | Desoxyribonucleinsäure | | |
| ELISA | "enzyme-linked immunosorbent assay" | | |
| EMD | Emanuel Merck Darmstadt | | |
| et al. | et alteri | | |
| G-Phase | gap-Phase | | |
| h | Stunde | | |
| H&E | Hämatoxylin-Eosin | | |
| HPF | "high power field" | | |
| HT | Hydroxytryptamin | | |
| ISEL | "in situ end-labeling" | | |
| i.p. | intraperitoneal | | |
| I.U. | "International Unit" | | |
| i.v. | intravenös | | |
| Kap. | Kapitel | | |
| LI | "Labeling Index" | | |
| LIs | "Labeling-Indizes" | | |
| Μ | Molar | | |
| MI | Mitoseindex | | |
| ml | Milliliter | | |
| min | Minute | | |
| M-Phase | Mitose-Phase | | |
| MW | Mittelwert | | |

| Ν | Normal |
|----------|---|
| PBS | "phosphate buffered saline" |
| PCNA | "proliferating cell nuclear antigen" |
| pI | isoelektrischer Punkt |
| RNA | Ribonucleinsäure |
| SD | Standardabweichung |
| sec | Sekunde |
| SPF | "specific pathogen free" |
| S-Phase | Synthesephase |
| S.C. | subcutan |
| Tab. | Tabelle |
| TdT | Terminale Desoxynucleotidyl Transferase |
| tgl. | täglich |
| TUNEL | "terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling" |
| Wo | Woche |
| Z. glom. | Zona glomerulosa |
| Z. fasc. | Zona fasciculata |
| Z. ret. | Zona reticularis |

1. EINLEITUNG

Die Nebennierenrinde gehört zu den Organen, die häufig von chemisch induzierten Läsionen betroffen sind (ROSOL et al., 2001). Daher besitzen Methoden, die früh toxikologische Potentiale von neu entwickelten Substanzen detektieren, eine große Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wird die proliferative Aktivität der Nebennierenrinde der Ratte unter physiologischen, stimulierenden sowie hemmenden Bedingungen untersucht. Darüber hinaus wird der Einfluß auf die Apoptoserate beschrieben, da zellkinetische Studien neben einer Quantifizierung neu gebildeter Zellen auch den Zellverlust mit einbeziehen sollten. Das Ziel der Arbeit ist die Etablierung einer Methode zur Bestimmung der Zellkinetik in der Nebennierenrinde unter physiologischen Bedingungen sowie unter der Wirkung verschiedener Stressoren.

Die Nebennierenrindenproliferation wurde bisher fast ausschließlich unter phylogenetischen Gesichtspunkten betrachtet, das heißt im Mittelpunkt des Interesses stand die physiologische Zellmauserung dieses Organs sowie die Suche nach einer mutmaßlich vorhandenen Stammzellschicht.

Als Zellproliferationsmarker wurde das Thymidinanalog 5-Bromo-2'-desoxyuridine (BrdU) mit Hilfe einer osmotischen Minipumpe kumulativ appliziert. Hierdurch werden in der Nebennierenrinde, einem Organ mit niedriger proliferativer Aktivität, ausreichend Zellen für eine Auswertung markiert.

Als physiologisches Stimulans kam ACTH und als inhibierende Substanz das synthetische Glukokortikoid Dexamethason zur Anwendung. Vergleichend wurde ein Aminomethyl-Chroman geprüft, welches bei hohen Dosierungen im Tierversuch über eine Steroidsynthesehemmung eine Nebennierenrindenhyperplasie bei Ratte und Hund induziert.

Die Bedeutung von Zellproliferationsmessungen beruht auf der Annahme, daß die Zellproliferation einen integralen Bestandteil für die Kanzerogenese darstellt und ihre Bestimmung daher der frühzeitigen Erkennung von Kanzerogenen dienen kann (AMES und GOLD, 1990a, b). Dies wird für die verschiedenen Organsysteme aber nur dann möglich sein, wenn genügend Daten zur basalen Zellproliferation vorliegen und auch substanzbedingte Veränderungen untersucht worden sind. Daher war das Ziel dieser Arbeit Grunddaten zur Zellproliferation der Nebennierenrinde zu erstellen, welche sowohl Kontrolldaten als auch substanzbedingte Veränderungen beinhalten soll.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 Zellproliferation

Zellproliferation ist einer der fundamentalsten biologischen Prozesse überhaupt. Durch mitotische Zellteilungen entstehen aus der befruchteten Eizelle die Gewebe des Organismus, welche sich wiederum mittels Mitosen regenerieren. Zellteilung erfolgt im embryonalen, fetalen, neonatalen, juvenilen und maturen Stadium. Im adulten Lebewesen sind die Gewebezellen in ihrem weiteren Proliferationsverhalten unterschiedlich determiniert (IATROPOULOS und WILLIAMS, 1996).

Nach COTRAN et al. (1999) existieren drei Haupttypen der Zellproliferation: die statische ("nondividing permanent cells"), die sich kontinuierlich erneuernde ("labile cells") und die sich konditional ("stable" = "quiescent") erneuernde Zellpopulation.

Die <u>statische</u> Zellpopulation kann nicht prolifererieren, sie adaptiert durch Hypertrophie. Zu den statischen Zellpopulationen werden zum Beispiel Neuronen gerechnet, die sich laut LEBLOND (1964) bei der Ratte bereits 7 Tage nach der Geburt nicht mehr teilen.

erneuernde Typ proliferiert kontinuierlich. Die hohe Der sich gleichbleibend Zellproduktionsrate wird durch einen hohen Zellverlust ausbalanciert. Es werden also mehr Zellen produziert als für die Aufrechterhaltung der Organgröße notwendig wären. Klassische Beispiele für sich kontinuierlich erneuernde Zellpopulationen sind Epithelzellen der Haut, des Verdauungstraktes, des Atmungstraktes, die Spermatogenese sowie die blutbildenden Zellen des Knochenmarkes. LEBLOND (1964) berechnet, daß in jeder Sekunde 2 Millionen rote Blutkörperchen in die Blutzirkulation abgegeben werden. Allein für die Aufrechterhaltung des Gehaltes an roten Blutkörperchen im Blut sind täglich 8 Billionen Mitosen im Knochenmark erforderlich. 2 Billionen Zellen werden täglich in das Lumen des Verdauungstraktes abgegeben, d.h. monatlich verliert der Körper über seinen Verdauungstrakt numerisch gesehen seinen gesamten Zellbestand.

<u>Stabile oder sich konditional erneuernde</u> Zellpopulationen sind laut COTRAN et al. (1999) durch gerade die für das Organwachstum notwendigen Zellteilungen gekennzeichnet und weisen daher eine sehr niedrige Zellteilungsaktivität auf.

Weit verbreitet ist die Ansicht, daß Differenzierung also funktionelle Spezialisierung der Zellen und Proliferation sich gegenseitig ausschließen. (MALENDOWICZ et al., 1997a; IATROPOULOS und WILLIAMS, 1996; MALENDOWICZ, 1986; RAMACHANDRAN et al., 1977).

COTRAN et al. (1999) und LEBLOND (1964) führen dagegen aus, daß Differenzierung nicht notwendigerweise zu einem Verlust der Fähigkeit zur Zellteilung führt. MICHALOPULOS und DeFRANCES (1997) haben für die Leber nachweisen können, daß Leberzellen ihre normale metabolische Funktion aufrecht erhalten können während sie proliferieren. Bei sich kontinuierlich erneuernden Zellpopulationen trifft die These der negativen Korrelation zwischen Differenzierung und Proliferation jedoch zu, da hier nur die sogenannten Stammzellen mitotische Aktivität zeigen.

Die sogenannte Wachstumsfraktion ergibt sich aus dem Quotienten zwischen sich teilenden und insgesamt vorhandenen Zellen (HALL und LEVISON, 1990).

2.1.1 Zellzyklus

Ursprünglich wurde angenommen, daß die Zelle ihre DNA während der Mitose dupliziert. Das neue Konzept des Zellzyklus wurde in den frühen 50er Jahren formuliert (ALISON, 1995). Hiernach erfolgt die Duplikation der DNA während der Synthese-Phase (S-Phase), welche von der eigentlichen Mitose noch durch die sogenannte G_2 -Phase getrennt wird (Abb.1).

Abb. 1: Zellzyklusphasen (aus HENKES et al., 1993)





Ein entscheidender Punkt, der die Zellteilung einleitet, ist die frühe G_1 -Phase (ALISON, 1995). In der G_1 -Phase des Zellzyklus finden u.a. RNA-Synthese, Proteinbiosynthese und Aufbau des Zytoskeletts statt. Auch Cykline und DNA-Polymerasen werden hier gebildet (JONES et al., 1996). Alle Wachstumsfaktoren üben ihren Einfluß in dieser Phase des Zellzyklus aus (IATROPOULOS und WILLIAMS, 1996). Die nachfolgende S-Phase dient der Replikation der genomischen DNA. In der G_2 -Phase finden DNA-Reparaturmechanismen statt, so daß beschädigte Zellen länger in dieser Phase verbleiben (IATROPOULOS und WILLIAMS, 1996).

Der Zellzyklus weist laut COTRAN et al. (1999) komplexe regulative Mechanismen sowie Kontrollpunkte ("checkpoints") auf: insbesondere der Übergang G₁-S und G₂-M wird durch das Wechselspiel von Cyclinen, Cyclin-abhängigen Kinasen und dem Phosphorylierungsgrad des Retinoblastoma-Proteins (Rb) reguliert (COTRAN et al., 1999). So werden Zellen mit geschädigter DNA an der Replikation (G₁-S) bzw. nichtintakte Chromosomen an der Teilung (G₂-M) gehindert. G₁, S und G₂ werden auch als Interphase zusammengefaßt und machen den größten Anteil des Zellzyklus aus. Demgegenüber steht die Mitose, welche sich aus vier morphologisch unterscheidbaren Phasen (Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase) zusammensetzt.

Zellen in der G₀-Phase befinden sich nicht in einem Zellzyklus. Nach entsprechender Stimulation können sie aber wieder Teil des proliferierenden Kompartments werden (YU et al., 1992), was bei permanent ruhenden Zellen (z.B. Neurone, Kardiozyten) nicht mehr möglich ist. Die sich konditional erneuernden Gewebezellen treten nach einem spezifischen Stimulus (z.B. Zellverlust oder gesteigerte funktionelle Anforderungen) aus der G₀-Phase wieder in G₁ über und können daher einen Zellverlust bzw. erhöhten Zellbedarf schnell ausgleichen.

Insgesamt dauert ein Zellzyklus 2-4 Tage (IATROPOULOS und WILLIAMS, 1996). Diese große Variation ergibt sich hauptsächlich aus der variablen Dauer der G_1 -Phase (ALISON, 1995), welche in exponentiell wachsenden Geweben nahezu nicht existent ist, aber auch 5-6 Stunden andauern kann. Die übrigen Zellzyklusphasen sind in ihrer Dauer weniger variabel. Die S-Phase dauert 6-8 Stunden, die G_2 -Phase 1-4 Stunden und die Mitose 1-2 Stunden (ALISON, 1995). Manche Zellen, wie beipielsweise Leberparenchymzellen können sehr lang in der G_2 -Phase verweilen, und führen so zu einer Population tetraploider Zellen (CLAYSON et al., 1989).

 γ -Strahlung oder bestimmte Kanzerogene wie beispielsweise Dimethylnitrosamine können den Übergang von der G₂-Phase zur Mitose verhindern (sogenannter G₂-Block). Dieser G₂-

Block ist einer der möglichen Gründe für eine mangelnde Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil der sich in der S-Phase und der sich in der Mitose befindenden Zellen (JONES et al., 1996).

2.1.2 Zellproliferation und Kanzerogenese

Die Entstehung von gut- oder bösartigen Tumoren ist ein komplexer Vorgang, an dem viele Mechanismen auf Zell- bzw. Organebene beteiligt sind. Nach HANAHAN und WEINBERG (2000) benötigt ein bösartiger Tumor 6 charakteristische Fähigkeiten von denen sich drei u.a. in einer erhöhten Zellproliferationsrate wiederspiegeln (1; 2; 4):

- 1. Unabhängigkeit von Wachstumssignalen
- 2. Unempfindlichkeit gegen Anti-Wachstumssignale
- 3. Umgehen der Apoptose
- 4. Unbegrenzte Fähigkeit zur Replikation
- 5. Aufrechterhaltung der Angiogenese
- 6. Gewebsinvasion und Metastasierung

Eine noch immer gängige Modellvorstellung zur chemisch induzierten Tumorentstehung umfaßt die fließend ineinander übergehenden Phasen Initiation, Promotion und Progression. Initiation beinhaltet hierbei die genetische Veränderung der für die Wachstumskontrolle kritischen Gene einer Zelle. Promotion umfaßt die klonale Expansion der genetisch veränderten Zelle (BUTTERWORTH und GOLDSWORTHY, 1991). Spätere Phasen der Tumorentwicklung, werden unter dem Begriff Progression (= maligne Konversion) zusammengefaßt. Hierunter fallen Veränderungen in der Anzahl und Anordnung der Chromosomen, Gewebeinvasion und Metastasenbildung. Zusätzliche Mutationen an dem Genom der Zelle bzw. Zellen treten in dieser Phase oder auch schon während der Promotion auf. Eine anhaltende ("sustained") Erhöhung der Zellproliferation wird die Geschwindigkeit, mit der ein Tumor Mutationen ansammelt und vom benignen zum malignen Phenotyp wechselt, erhöhen (FOSTER, 1997). Für BARRASS (1993) sowie BURSCH et al. (1992) reflektiert die Zellproliferation somit nicht nur eine adaptative Antwort des Organs, sondern ist auch fundamental für die Fixation von Mutationen, für die Dedifferenzierung und für die Formation präneoplastischer "Foci" transformierter Zellen.

COHEN und ELLWEIN (1991) fassen die Grundprinzipien der Kanzerogenese in den folgenden drei Punkten zusammen:

1. Krebs ("cancer") entsteht aufgrund genetischer Veränderungen.

- 2. Mehr als eine genetische Veränderung ist erforderlich.
- 3. Die DNA-Replikation ist nicht zu 100% präzise.

Die Fähigkeit zur DNA-Replikation ist eine ursprünglich jeder Zelle gegebene Eigenschaft. Dieser grundlegende biologische Prozess ist auch Voraussetzung bzw. Begleiterscheinung jeder Tumorentstehung. Jede Runde der DNA-Replikation beinhaltet die, wenn auch geringe, Möglichkeit der Bildung spontanter Mutationen (FOSTER, 1997; CUNNINGHAM, 1996; COHEN und ELLWEIN, 1991). Eine das physiologische Maß einer Zelle übersteigende Proliferationsrate erhöht dieses Risiko, da die zelleigenen Reparaturmechanismen überfordert werden können (FOSTER, 1997; COHEN und ELLWEIN, 1996; BUTTERWORTH, 1996). Zusätzlich erhöht ein Anstieg der Zellreplikation den Anteil der Zellen, die sich in der S-Phase befinden. In dieser Phase ist die vorübergehend einsträngige DNA empfindlicher gegenüber schädigenden Einflüssen (CUNNINGHAM et al., 1994; AMES und GOLD, 1990a). Die Menge an irreparablen DNA-Schäden ist laut PRESTON-MARTIN et al. (1991, 1993) eine Funktion der Zellteilungshäufigkeit. Mathematische Modelle zeigen, daß eine erhöhte Zellproliferationsrate das Risiko der Entstehung einer genetisch veränderten Zelle erhöht (MOOLGAVKAR und LUEBECK, 1995; MOOLGAVKAR, 1993; MOOLGAVKAR und LUEBECK, 1992; COHEN und ELLWEIN, 1990). Zellteilung ermöglicht mitotische Rekombination, die im Vergleich zu einer einfachen Mutation tiefgreifendere Veränderungen der Erbsubstanz hervorrufen kann (PRESTON-MARTIN et al., 1991; PRESTON-MARTIN 1990; AMES und GOLD, 1990a). Weiterhin steigt mit Zunahme der et al.. Zellproliferationsrate die Wahrscheinlichkeit, daß eine genetische Veränderung homozygot wird (BUTTERWORTH und GOLDSWORTHY 1991; PRESTON-MARTIN et al. 1991; AMES und GOLD, 1990a).

Bei der Zellteilung kann 5-Methyl-Cytosin verloren gehen; dies resultiert in Dedifferenzierung mit daran anschließenden weiteren Zellteilungen (AMES und GOLD, 1990a).

Gerade weil die Zellproliferation einen integralen Bestandteil des kanzerogenen Prozesses bildet, bleibt ihr primärer Einfluß auf diesen kanzerogenen Prozess umstritten (MELNICK et al., 1993). Fraglich ist, ob Zellproliferation per se kanzerogen wirken kann oder nur einen von vielen notwendigen sekundären Faktoren darstellt. Umstritten ist daher auch, ob Zellproliferationsmessungen der Vorhersage einer möglichen Kanzerogenität insbesondere bei nicht-erbgutverändernden (nicht-genotoxischen) Substanzen dienen können (MELNICK et al., 1996; MELNICK et al., 1993). Laut WEINSTEIN (1991) ist ein solcher Ansatz nur

dann gerechtfertigt, wenn während der Zellproliferation auftretende spontane Mutationen ein vergleichbares Risiko der Tumorentstehung wie exogen induzierte Mutationen darstellen.

Ein interessanter wissenschaftlicher Disput zu diesem Thema entwickelte sich 1995/96, nachdem FARBER (1995, 1996) die Theorie der Tumorentstehung aufgrund lediglich einer erhöhten Zellproliferationsrate als reine Spekulation abwies (Stellungnahmen hierzu von AMES und GOLD, 1996; BUTTERWORTH, 1996; COHEN und ELLWEIN, 1996; MORRIS, 1996; O'CONNELL, 1996; STEMMERMANN et al., 1996). Nach FARBER (1996) gibt es kein Beispiel welches belegt, daß Zellproliferation alleine ausreichend gewesen wäre, Tumoren zu induzieren. Zellproliferation stellt für ihn eine Notwendigkeit, aber keinen Hauptrisikofaktor ("major risk factor") der Tumorentstehung dar.

Die Beziehung zwischen Zellproliferation und Kanzerogenität ist weniger aufgeklärt als die zwischen Genotoxizität und Kanzerogenität (JONES et al., 1996). Dies liegt unter anderem an fehlenden Daten, die das Ausmaß und die Dauer chemisch induzierter Zellproliferation in Relation zu auftretenden Tumoren setzen (BUTTERWORTH, 1991). Neben diesen rein quantitativen Gesichtspunkten muß auch qualitativen Einflußgrößen Rechnung getragen werden. So scheint die Induktion der Zellproliferation bei Stammzellen eine gewichtigere Rolle zu spielen als bei ausdifferenzierten Zellen (AMES et al., 1993; COHEN und ELLWEIN, 1991). Verschiedene Gewebe sind zudem unterschiedlich empfindlich, da sie aufgrund einer physiologisch hohen oder niedrigen Zellmauserung über verschieden stark ausgeprägte DNA-Reparaturmechanismen verfügen. Schließlich spielt auch die Dauer der induzierten Zellproliferation eine nicht unerhebliche Rolle.

2.1.3 Genotoxische Kanzerogene

Genotoxische Kanzerogene (Mutagene = "Initiatoren" = genetische Kanzerogene) zeichnen sich dadurch aus, daß sie selbst oder ein Metabolit mit der DNA, mit DNA-assoziierten Enzymen oder mit dem Zellteilungsspindelapparat interagieren (ASHBY, 1992). Mutationen werden durch direkte kovalente Bindung an die DNA ausgelöst (DNA-Addukt), oder durch direkte Veränderung der Chromosomenstruktur oder –anzahl (BUTTERWORTH et al., 1995). Daher werden genotoxische Kanzerogene auch als Mutagene bezeichnet (AMES und GOLD, 1990a/b).

Genotoxische Kanzerogene sind im allgemeinen potente Kanzerogene, das heißt, sie können Tumoren bei verschiedenen Spezies und in mehreren Organen und Geweben hervorrufen. Sie sind effektivere Kanzerogene bei Dosierungen, die auch die Zellproliferation induzieren (BUTTERWORTH, 1996; BUTTERWORTH et al., 1995; CUNNINGHAM et al., 1994). Generell herrscht die Übereinkunft, daß die Risikoeinschätzung bei mutagenen Kanzerogenen berücksichtigen sollte, daß auch sehr geringe Dosen kritische Stellen der DNA schädigen können (BUTTERWORTH et al., 1995). Die zur Zeit eingesetzten in vitro Kurzzeittests detektieren genotoxische Potentiale von Substanzen. Am bekanntesten sind hierbei der Ames-Test ("Salmonella Mutagenicity Assay") (AMES et al., 1973) und der "UDS hepatocyte DNA repair test" (WILLIAMS et al., 1989). Oft kann auch die chemische Struktur bereits Hinweise auf eine mögliche Kanzerogenität geben ("Structure-Activity-Relationship") (BUTTERWORTH, 1990). MELNICK et al. (1996) sowie BUTTERWORTH (1990) und LOURY et al. (1987) führen jedoch aus, daß immer die Möglichkeit berücksichtigt werden muß, daß eine Substanz genotoxische Wirkungen zeigt, die durch die gegenwärtigen in vitro Techniken nicht erkannt werden. Andererseits können auch falsch positive Resultate auftreten.

2.1.4 Nichtgenotoxische Kanzerogene

Viele Substanzen weisen bei Langzeitversuchen an Nagerspezies ein kanzerogenes Potential auf, welches sowohl bei *in vitro* als auch *in vivo* Genotoxizitätstests nicht vorhergesehen wurde. Sie entfalten ihre Wirkung also durch andere Mechanismen als DNA-Reaktivität. Wie diese Mechanismen im einzelnen ablaufen ist jedoch aufgrund deren Vielfältigkeit oft nicht bekannt (BUTTERWORTH et al., 1995). Nichtgenotoxische Kanzerogene ("Promotoren" = epigenetische Kanzerogene) werden generell nur durch Langzeittierversuche detektiert. Gegenwärtig existiert kein zuverlässiges, validiertes Kurzzeitassay für nichtgenotoxische Kanzerogene (JONES et al., 1996). Sie werden aufgrund ihres Hauptwirkungsmechanismus in *mitogene* und *zytotoxische (zytoletale) Kanzerogene* unterteilt.

Bei <u>mitogenen Kanzerogenen</u> sind keine regressiven Veränderungen feststellbar. Es erfolgt eine Induktion der Zellproliferation ohne feststellbaren Zelltod. Die von mitogenen Kanzerogenen ausgelöste Proliferationsstimulation ist häufig nur initial (JONES et al., 1996). Daher ist insbesondere bei diesen Substanzen die Tumorentstehung nicht durch eine anhaltende Proliferationsstimulation zu erklären. Falls auch bei diesen Substanzen die Proliferation den kritischen Faktor zur Tumorentstehung darstellt, ist der initiale Proliferationsanstieg für die Entstehung von Tumoren entweder schon ausreichend, oder es werden selektiv präneoplastische Zellen in ihrem Wachstum gefördert.

Zytotoxische Kanzerogene bewirken regeneratives Zellwachstum durch primär regressive Wirkungen. Ihre kanzerogene Eigenschaft erklärt sich zumindest teilweise aus einer erhöhten

Zellproliferationsrate. Eine kontinuierliche Verabreichung kann einen sogenannten "hyperproliferativen Status" (BUTTERWORTH, 1990) im Zielgewebe auslösen. Diskutiert werden außerdem die Entstehung von DNA-Schäden durch freigesetzte Nucleasen und Sauerstoffradikale (sekundär genotoxische Wirkung). Zu beachten ist, daß alle Substanzen ab einer gewissen Dosis ein zytotoxisches Potential besitzen, ohne in jedem Fall ein Kanzerogen darzustellen. Für zytotoxische Kanzerogene wird eine Schwellendosis angenommen, ab der keine zytotoxischen und damit kanzerogenen Einflüsse mehr erwartet werden (COHEN und ELLWEIN, 1991). Daher kann eine Risikoabschätzung für den Menschen mittels des "noobserved-adverse-effect level" (NOAEL) durchgeführt werden (BUTTERWORTH et al., 1995), d.h. es existiert eine unbedenkliche Schwellendosis.

2.1.5 Anwendung von Zellproliferationsmessungen

Befürworter der Theorie, welche die Zunahme der Zellteilungsrate als einen "Schlüsselfaktor" in der Tumorgenese sehen, versuchen, Zellproliferationsmessungen als einen Kurzzeittest für die Vorhersage eines kanzerogenen Potentials einer Substanz zu etablieren. Da für nichtgenotoxische Kanzerogene momentan kein Kurzzeittest zur Vorhersage ihrer tumorinduzierenden Eigenschaften vorhanden ist, und Zellproliferation insbesondere bei diesen Substanzen einen Hauptrisikofaktor darzustellen scheint (WILLIAMS et al., 1996; GOLDSWORTHY et al., 1991), liegt insbesondere hier eine Anwendungsmöglichkeit für die Zukunft.

Zur Erkennung von substanzbedingten Effekten auf die Zellmauserung müssen Versuchsbedingungen zwischen verschiedenen Institutionen abgeglichen und eine Datenbasis erstellt werden, aus der das Ausmaß, die Dauer und die Natur einer chemisch induzierten Zellproliferation hervorgehen (GOLDSWORTHY et al., 1991). Aus diesen Daten könnte ein kanzerogenes Potential abgeleitet werden. Die 1998 gegründete Arbeitsgruppe für Zellproliferation und Apoptose (CEPA= "Cell Proliferation and Apoptosis") hat sich diese Aufgabe zum Ziel gesetzt. Zellproliferationsmessungen könnten in Zukunft mitentscheidend bei der Ermittlung eines kanzerogenen Potentials neuentwickelter Substanzen sein (BAHNEMANN und MELLERT, 1997). Bei pharmakologisch oder chemisch gleichwertigen Substanzen können Ergebnisse von Zellproliferationsmessungen eine frühzeitige "Filterfunktion" bei der Weiterentwicklung in dieser Hinsicht unbedenklicher Substanzen ausüben.

Auch bei der Ermittlung genotoxischer Kanzerogene könnten Zellproliferationsmessungen integriert werden. CUNNINGHAM (1996) führt aus, daß falsch positive Ergebnisse im

Ames-Test auf einer fehlenden Proliferationsinduktion *in vivo* beruhen können. Eine Kombination zwischen Mutagenitäts- und Zellproliferationsmessungen eröffnet neue Perspektiven in der mechanistischen Aufklärung chemisch induzierter Kanzerogenese und damit in der Risikoabschätzung für den Menschen.

Zellproliferationsmessungen könnten auch bei der oftmals schwierigen Festlegung der MTD ("maximum tolerated dose") für Kanzerogenitätsstudien an Nagerspezies hilfreich sein (ELDRIDGE und GOLDSWORTHY, 1996; AMES et al., 1993; GOLDSWORTHY et al., 1991; SWENBERG und MARONPOT, 1991; BUTTERWORTH, 1990; COHEN und ELLWEIN, 1990). Diese Dosis soll einen minimalen toxischen Effekt über den Versuchszeitraum (2 Jahre) hinweg zeigen, ohne die Lebenserwartung der Tiere zu beeinträchtigen. Sie wird zur Zeit mit Hilfe klinischer Symptome, reduzierter Körpergewichtszunahme, Blutchemie, Organgewichtsveränderungen und histopathologischen Veränderungen festgelegt.

AMES und GOLD (1990a/b) führen die Ergebnisse des "National Toxicology Program/ National Cancer Institute" (NTP/NCI) (TENNANT et al., 1987), wonach die Hälfte aller Kanzerogene ein negatives Ergebnis im Ames-Test zeigt, auf einen nichtgenotoxischen Wirkungsmechanismus zurück, der bei vielen dieser Substanzen erst bei der MTD auftritt. Diese Dosis bedinge eine chronische Gewebsirritation mit anhaltender Änderung des physiologischen Status des Zielgewebes (ROE, 1989) und dadurch eine anhaltend erhöhte Zellproliferationsrate mit den damit verbundenen Risiken.

Mit Zellproliferationsmessungen könnten Dosierungen für Langzeittierversuche gewählt werden, die die Zellproliferation nicht beeinflussen. Auch dies kann zu einer weiteren mechanistischen Abklärung der Tumorentstehung beitragen und der Risikobewertung bei Exposition des Menschen dienen.

2.1.6 Methoden zur Messung der Zellproliferation

Eine Übersicht zu den verschiedenen Methoden, die bei der Messung der Zellproliferation zur Anwendung kommen, findet sich bei FOSTER (1997) (Tab. 1).

| Biochemische Methoden | Histologische Methoden |
|-----------------------|--|
| | |
| Szintillationszähler | Mitoserate |
| Durchflußzytometrie | Stathmokinetische Mitoserate ("metaphase |
| | arrest") |
| ELISA | ³ H-Thymidin/ Bromodesoxyuridin |
| | Endogene Proteine (PCNA, Ki-67) |
| | Cyklin-abhängige Kinasen (CDKs) |
| | in situ-Hybridisierung zur Detektion von |
| | mRNA für Histon-assoziierte Enzyme |

Tab. 1: Methoden zur Messung der Zellproliferation

ELISA= Enzyme-linked immunosorbent assay

Die biochemischen Methoden kommen bei Gewebshomogenaten zum Einsatz. Sie besitzen den Vorteil, daß sehr große Zellmengen innerhalb kurzer Zeit mit wenig Arbeitsaufwand quantifiziert werden können. Ein entscheidender Nachteil ist jedoch die nicht mehr mögliche topographische Zuordnung der Zellen. Eine solche kann nur mit histologischen Methoden erzielt werden, die im weiteren näher beschrieben werden.

2.1.6.1 Mitose-Zählung

Die Mitose-Zählung ist die traditionellste, älteste und am leichtesten durchzuführende Methode zur Feststellung der Zellproliferation (LINDEN et al., 1992). Das Ergebnis einer Mitose-Zählung wird oftmals als Anzahl der Mitosen in 10 mikroskopischen Feldern bei Verwendung des 40er Objektives ("high power field" = HPF) ausgedrückt. Nachteilig wirkt sich dabei aus, daß unterschiedliche Zellgrößen zwischen untersuchten Geweben das Meßergebnis stark beeinflussen können. Der Mitoseindex (MI) dagegen ist die prozentual ausgedrückte Anzahl der sich in der Mitose befindenden Zellen und gewährleistet eine bessere Vergleichbarkeit. Da hierbei alle Zellen ausgezählt werden müssen, ist der Arbeitsaufwand wesentlich größer als bei der Auswertung von Mitosen pro Sichtfeld.

Das mitotische Kompartiment macht die kleinste Fraktion der Zellen im Zellzyklus aus. Dies bringt den Nachteil mit sich, daß biologisch bedeutungslose Meßwertvariationen das Endergebnis stark beeinflussen können. Zusätzlich von Nachteil ist die teilweise nicht eindeutig zuzuordnende Morphologie mitotischer Zellen. Verwechslungen mit Kernpyknosen sind möglich, insbesondere bei nicht rechtzeitig erfolgender Gewebefixation (WOOSLEY, 1991; HALL und LEVISON, 1990; CLAYSON et al., 1989). In unzureichend fixiertem Material können Mitosen abgeschlossen werden, während keine neuen initiiert werden, was zu einer erheblichen Unterschätzung der "wahren" Anzahl von Mitosen in diesen Arealen führen kann.

Wie bei allen statischen Parametern können auch bei der Mitose-Zählung keine "Proliferationsraten" ermittelt werden. Eine Erhöhung des mitotischen Indexes kann also auch lediglich auf einer Zunahme der Mitosedauer beruhen (ALISON, 1995).

2.1.6.2 Metaphase-Arrest Technik

Um den statistischen Fehler der sehr kleinen Zahl bei der Mitose-Zählung zu umgehen, wird die Metaphase-Arrest Technik angewendet. Die Arretierung in der Metaphase erfolgt durch Spindelgifte wie Colchicin, Colcemid, Vincristin und Vinblastin (ALISON, 1995). Das Gewebe wird *in vitro* mit einem dieser Spindelgifte inkubiert. Einflußgrößen auf das Meßergebnis sind hierbei die verwendete Konzentration des Spindelgiftes, die Dauer der Inkubation, die Inkubationsbedingungen und die Dicke des Gewebes.

Laut ALSION (1995) sind die resultierenden mitotisch abnormen Zellteilungsfiguren charakteristisch und leicht zu erkennen, laut WOOSLEY (1991) dagegen noch schwieriger gegenüber pyknotischen Kernen abzugrenzen.

2.1.6.3 Exogene Proliferationsmarker: ³H-Thymidin und 5-Bromo-2'-Desoxyuridin (BrdU)

³H-Thymidin ist ein mittels Tritium markiertes und 5-Bromo-2'-Desoxyuridin ist ein mit Brom gekennzeichnetes Thymidinanalog. Thymidin ist die einzige nur in der DNA vorkommende Base und kann somit spezifisch zur Detektion der S-Phase eingesetzt werden. Die S-Phase wiederum nimmt mit einer Dauer von 6-8 Stunden einen wesentlich längeren Zeitraum als die Mitose ein. Wenn beispielsweise 2000 Zellkerne in einem Präparat, also eine limitierte Anzahl, ausgezählt werden, so wird mit einem S-Phase Marker aller Wahrscheinlichkeit nach ein genaueres Meßergebnis resultieren als bei der Mitosezählung, da diese aufgrund ihrer geringen Inzidenz ein viel höheres Risiko zur Über-bzw. Unterschätzung bietet (ALISON, 1995).

³H-Thymidin und 5-Bromo-2'-Desoxyuridin werden *in vivo* verabreicht oder in Zellkultur verbracht. Die *in vivo* Applikation kann über eine einzelne Injektion ("pulse labeling") oder

über eine kontinuierliche Zufuhr ("continuous labeling") erfolgen. Retrospektive Studien an Archivmaterial sind mit diesen Markern nicht möglich.

2.1.6.3.1 ³H-Thymidin

³H-Thymidin stellte seit Mitte des 20. Jahrhunderts die Standardmethode ("gold standard"; ALISON, 1995) zur Proliferationsmessung dar. Hieraus ergibt sich eine große, historisch gewachsene Datenbank zu Versuchen mit ³H-Thymidin (GOLDSWORTHY et al., 1991). Niedrige ³H-Thymidin-Dosen sollen die normale Zellfunktion nicht beeinträchtigen und damit keine Veränderungen in der Zellzyklusdynamik hervorrufen (GOLDSWORTHY et al., 1991). Gravierende Nachteile beruhen auf der Radioaktivität dieses Stoffes. Damit verbunden sind die hohen Kosten für den Strahlenschutz und die Dekontamination. Zusätzlich dauert die radioaktive Belichtungsperiode der Photoemulsion Wochen bis Monate.

Die am weitesten verbreitete Form des ³H-Thymidin ist (mit Tritium) an der Methylgruppe markiert. Es exisitiert auch eine Form, die in der Ringstruktur mit Tritium markiert ist, und die damit weniger Hintergrundprobleme aufweisen soll, da eine Demethylierung nicht zu einem markierten Abbauprodukt führt (GOLDSWORTHY et al., 1991).

Unterschiede bestehen in der Bioverfügbarkeit zwischen der Exposition *in vivo* und in der Zellkultur. *In vivo* wird überschüssiges, nicht innerhalb von 30 Minuten in die DNA eingebautes ³H-Thymidin, schnell verstoffwechselt. In Zellkultur steht ³H-Thymidin den Zellen tagelang für ihre DNA-Synthese zur Verfügung (BASERGA und WIEBEL, 1969). *In vivo* Exposition von ³H-Thymidin ist daher equivalent zu einer kurzen Markierungsperiode ("pulse-labeling"). Eine langfristige Applikation von ³H-Thymidin mit Hilfe einer osmotischen Minipumpe bringt schwerwiegende Probleme für die Strahlensicherheit mit sich und verbietet sich daher in den meisten Fällen (GOLDSWORTHY et al., 1991).

Von Vorteil ist die hohe Sensitivität dieser Methode. So können sogar DNA-Reparaturvorgänge, also der Einbau nur weniger Nukleotide nachgewiesen werden (DOOLITTLE et al., 1992). Eine Abgrenzung zwischen Reparaturvorgängen und der Synthese-Phase ist aufgrund der hierbei eingebauten viel größeren Menge an ³H-Thymidin unproblematisch.

2.1.6.3.2 5-Bromo-2'-Desoxyuridin (BrdU)

BrdU kann immunhistologisch in alkohol- oder formalinfixiertem Material mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern nachgewiesen werden. GRATZNER (1982) entwickelte den ersten monoklonalen Antikörper gegen BrdU. Aufgrund fehlender Radioaktivität sowie geringem Kosten- und Zeitaufwand ist BrdU mitlerweile die Substanz der Wahl zur Messung der Synthese-Phase (ELDRIDGE und GOLDSWORTHY, 1996; ALISON, 1995; SWENBERG und MARONPOT, 1991).

Der Hauptnachteil der BrdU-Immunhistologie liegt in der teilweise schwierigen Abgrenzbarkeit zwischen positiven und negativen Zellkernen (DOOLITTLE et al., 1992; GOLDSWORTHY et al., 1991), insbesondere wenn das verwendete immunhistologische Färbeprotokoll zu einer unvollständigen bzw. schwachen Antigendetektion führt.

BrdU-Nachweis

Die DNA muß zum BrdU-Nachweis denaturiert werden, da nur einzelsträngige DNA eine Antikörperbindung erlaubt. Die Denaturierung erfolgt in den allermeisten Fällen durch eine Säurebehandlung. Auch eine Hitzebehandlung (Mikrowelle oder Dampfdruck) kann zum Zwecke der Denaturierung durchgeführt werden. Bei der Fixation mit beispielsweise Formalin ist zusätzlich eine enzymatische Aufspaltung der entstandenen Proteinvernetzungen notwendig. Die Durchführung dieser Schritte und natürlich auch die Konzentration des verwendeten Antikörpers und Brückenantikörpers beeinflussen das Färberesultat nicht unerheblich. Die optimalen Antikörperkonzentrationen variieren zudem zwischen unterschiedlichen Spezies und Geweben (GOLDSWORTHY et al., 1991). Zusätzlich von Bedeutung ist die verwendete Gegenfärbung, welche keinesfalls zu einer Überdeckung positiver Zellkerne führen sollte (GOLDSWORTHY et al., 1991).

Auf der anderen Seite ist aber auch eine Zerstörung des Antigens durch die Gewebsbehandlung zu vermeiden. Diese kann aus einer überlangen Fixation, Dekalzifizierung, Immersion in Alkoholen oder heißem Wachs oder durch die Verbringung der Paraffinschnitte in den Brutschrank resultieren (FOSTER, 1997).

Toxizität von BrdU

BrdU ist mutagen und kanzerogen (ANISIMOV und OSIPOVA, 1993; NAPALKOV et al., 1989; MAIER et al., 1983). Der Einbau von BrdU in die DNA erhöht das Risiko der Chromosomenaberration ausgelöst durch Röntgenstrahlung oder ultraviolettes Licht (ANISIMOV und OSIPOVA, 1993). Berücksichtigung finden sollte außerdem eine mögliche chemische Interaktion mit bestimmten Substanzen (GOLDSWORTHY et al., 1991). Eine kontinuierliche BrdU-Applikation kann durch kumulative Toxizität eine Zellproliferation induzieren. Dieser Effekt tritt laut ELDRIDGE und GOLDSWORTHY (1996) jedoch nicht bei einwöchiger kontinuierlicher Applikation (mittels osmotischer Minipumpe) von 20 mg/ml in der Leber von Ratten und Mäusen auf.

Applikationsmöglichkeiten von BrdU

Die verschiedenen Möglichkeiten der BrdU-Applikation werden (modifiziert nach FOSTER, 1997) in Tabelle 2 aufgeführt.

| Applikationsart | Vorteile | Nachteile |
|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Injektion | leichte Durchführung; | Nur ein Zeitfenster von 30min |
| (pulsatile Messung) | kostengünstig | bis 1h (Halbwertszeit der |
| | | Nukleotide) wird erfaßt |
| Trinkwasser | minimales | Diurnale Einflußfaktoren da |
| (kumulative Messung) | Intoxikationsrisiko; | keine konstante |
| | kostengünstig | Wasseraufnahme über den |
| | | Tag hinweg erfolgt; nur bei |
| | | Einzeltierhaltung einsetzbar |
| Subkutan implantierte Slow- | kostengünstig | Eventuell Toxizitätsprobleme |
| release Pellets | | (insbesondere lokal); |
| (kumulative Messung) | | operativer Eingriff |
| Subkutan implantierte | Konstante BrdU-Freisetzung | Operativer Eingriff, |
| osmotische Minipumpen | über den gewählten Zeitraum | kostenintensiv |
| (kumulative Messung) | (abhängig vom Pumpentyp) | |

Tab. 2: Applikationsmöglichkeiten von BrdU

Vergleich zwischen pulsatilen und kumulativen Messungen

Eine pulsatile Applikation ("pulse labeling") ist bei sich schnell teilendem Gewebe (z.B. Darm) die Methode der Wahl. Bei sich langsam teilendem Gewebe sollte eine kontinuierliche ("continuous labeling") und damit kumulative Applikation bevorzugt werden.

Pulsatile Applikationsarten bringen den Nachteil mit sich, daß die BrdU-Inkorporation sehr stark von exogenen oder endogenen "Störgrößen" (z.B. Hormonstatus und diurnale Rhythmik) beeinflußt werden kann. Um Werte zwischen verschieden behandelten Tiergruppen vergleichen zu können, müssen diese auch zur gleichen Uhrzeit (besser noch am gleichen Tag) den Marker erhalten haben und zum gleichen Zeitpunkt nach Markerverabreichung getötet werden. Zusätzlich ist der Anteil solcher Zellen, die nur wenig BrdU inkorporiert haben, da sie bei Anwesenheit des Markers entweder gerade in die S-Phase eintreten oder diese verlassen, relativ groß. Daraus resultieren verhältnismäßig viele nur schwach positiv angefärbte Zellkerne (GOLDSWORTHY et al., 1991). Um diese Nachteile zu umgehen, werden von einigen Forschern auch wiederholte Einzelinjektionen durchgeführt. Um hierbei wirklich alle S-Phase Zellen zu detektieren, müßten solche Injektionen aufgrund der Halbwertszeit dieses Nukleotids jedoch in halbstündigem Abstand vorgenommen werden (BARRASS, 1993).

Kumulative Messungen haben den großen Vorteil, daß tagesabhängige Schwankungen keinen Einfluß auf das Meßergebnis ausüben. Sie stellen eine Summation aller Zellen dar, die sich während des gewählten Zeitraumes (meist 3 oder 7 Tage) in der S-Phase befanden oder noch befinden (JONES und CLARKE, 1993). Auch geringgradige Änderungen der BrdU-Inkorporation können so erfaßt werden (BARRASS, 1993; GOLDSWORTHY et al., 1991; MARSMAN et al., 1988).

2.1.6.4 Endogene Proliferationsmarker

Endogene Proliferationsmarker werden während des Zellzyklus (bis auf G₀) exprimiert und können mit entsprechenden Antikörpern nachgewiesen werden. Nur mit solchen Markern sind retrospektive Studien an Archivmaterial möglich. Nachteilig ist das lückenhafte Wissen um die Funktion und Exprimierung dieser einzelnen Proteine. Die Vorteile einer kumulativen Messung mit Hilfe exogener Proliferationsmarker gehen ebenfalls verloren. Die bekanntesten endogenen Proliferationsmarker sind PCNA ("proliferating cell nuclear antigen") und Ki-67. Der Nachweis von cyklinabhängigen Kinasen (CDKs) und von Histon-mRNA sind demgegenüber neuere Techniken.

2.1.6.4.1 PCNA ("proliferating cell nuclear antigen")

PCNA ist ein 36kD schweres nukleäres Protein und wird als Hilfsprotein der DNA-Polymerase-Delta während der DNA-Synthese und DNA-Reparatur exprimiert (ALISON, 1995). PCNA tritt während des gesamten Zellzyklus auf, die höchste Konzentration findet sich jedoch in der S-Phase (DIETRICH, 1993; GREENWELL et al., 1993). Die genaue Rolle von PCNA während des Zellzyklus ist unklar (YU et al., 1992).

Es existieren verschiedene Antikörper gegen PCNA, die auch entsprechend unterschiedliche Epitope dieses Proteins detektieren. Die gängigsten Antikörper sind PCNA-PC 10 und PCNA-19 A2 (ALISON, 1995). Die Fixationsdauer und die Art der Antigendemaskierung sind kritische Faktoren für den PCNA-Nachweis (HALL et al. 1990).

2.1.6.4.2 Ki-67

Ki-67 ist ein nicht genau identifiziertes nukleäres Protein, welches bis auf G_0 und die frühe G_1 -Phase während des Zellzyklus exprimiert wird (LINDEN et al., 1992). Während der Interphase ist es im Kernkörperchen lokalisiert, erscheint während der Prophase im Kernplasma, ist in der Metaphase mit einzelnen Chromosomen assoziiert und während der Telophase über den gesamten Zellkern verteilt (LINDEN et al., 1992).

Ki-67 findet vorwiegend Einsatz in der Humanmedizin zur Prognostik von Tumoren. VERHEIJEN et al. (1989) demonstrierten einen Verlust von Ki-67 nach dem Entzug von Nährstoffen in Zellkultur, obwohl sich die untersuchten Zellen nachweislich in der S-, G₂bzw. M-Phase befanden. Da viele Tumoren, insbesondere zentral, eine Unterversorgung an Nährstoffen aufweisen, könnte dieses Phänomen zu den uneinheitlichen Resultaten mit Ki-67 beigetragen haben (YU et al., 1992).

Durch den monoklonalen Antikörper MIB1 ("Molecular Immunology Borstel") kann Ki-67 nach einer Mikrowellenvorbehandlung auch an formalinfixiertem Material nachgewiesen werden.

2.1.6.4.3 Histone

"Histon-messenger RNA" (mRNA) wird mittels *in situ*-Hybridisierung mit markierten Oligonukleotiden nachgewiesen (ALISON et al., 1994). Da die Histon-assoziierten Proteine (H2b, H3, H4) zeitgleich mit der DNA während der S-Phase des Zellzyklus synthetisiert werden, ist auch die Synthese der mRNA für diese Proteine eng mit der S-Phase verknüpft (ALISON et al., 1994).

Von Vorteil ist die konservierte Nukleotid-Sequenz der Histone, das auf die S-Phase limitierte Auftreten der Histon-mRNA und das Fehlen einer aufwendigen Antigendemaskierung für den Nachweis der mRNA in fixiertem Material (ALISON et al., 1994). Wie bei Ki-67 und PCNA kann auch mit dieser Methode Archivmaterial untersucht werden.

2.2 Zelltod

Als Zelltod wird das Erlöschen aller Zellfunktionen und das Absterben der Zelle bezeichnet, welches in der Regel durch Noxen ausgelöst wird und ursprünglich als passives Phänomen dargestellt wurde. Dieses Konzept wurde von KERR et al. (1972) revolutioniert, als sie den Mechanismus der Apoptose, des aktiven Zelltodes, einführten.

Apoptose ist nicht nur ein entscheidender Vorgang während der embryonalen und fetalen Morphogenese der Organe, sondern erlaubt dem multizellulären Organismus eine kontinuierliche Regeneration der Gewebe unter "steady-state"-Bedingungen (BEN-SASSON et al., 1995). Apoptose stellt das Komplement zur Mitose dar (WYLLIE et al., 1973b; KERR et al., 1972). Beide zusammen determinieren Organwachstum, Organinvolution und die Aufrechterhaltung der Organgröße. Darüber hinaus stellt Apoptose einen Mechansimus dar, durch den der Körper geschädigte, präkanzeröse oder überschüssige Zellen eliminieren kann (BURSCH et al., 1992). Andererseits wird auch diskutiert, ob die Apoptose nicht lediglich eine morphologische Variante der unter dem Begriff Nekrose subsummierten Zellveränderungen darstellt (FARBER, 1994).

2.2.1 Nomenklatur

Die "Society of Toxicologic Pathologists" hat 1999 ein Schema zur Nomenklatur des Zelltodes vorgeschlagen (LEVIN et al., 1999). Dies erschien nötig, da in den letzten Jahrzehnten ein verwirrendes Spektrum an Begriffen verwendet wurde, die nicht näher oder unterschiedlich definiert wurden. Oft werden die Begriffe Nekrose und Apoptose als zwei konträre Formen des Zelltodes einander gegenübergestellt. Apoptose ist hiernach charakterisiert durch einen "aktiven" Vorgang, wohingegen Nekrose einen passiven, katabolischen, degenerativen Prozess darstellt (DARZYNKIEWICZ et al., 1997).

Die "Society of Toxicologic Pathologists" schlägt den Begriff "Nekrose" für alle Befunde vor, die Zelltod in histologischen Präparaten beschreiben, unabhängig von dem Mechanismus, durch den dieser Zelltod erfolgte. Wenn möglich, kann der morphologisch vorherrschende Modus des Zelltodes näher definiert werden, so daß dann von einer "apoptotischen Nekrose" ("apoptotic necrosis"), "onkotischen Nekrose" ("oncotic necrosis") bzw. "gemischter onkotischer und apoptotischer Nekrose" ("mixed apoptotic and oncotic necrosis") gesprochen werden kann. Der Begriff Onkose soll das vorherrschende morphologische Kriterium des vormals als ischämisch bezeichneten Zelltodes beschreiben, nämlich das Anschwellen der

Zelle und deren Organellen vor dem Absterben. Diese neue Nomenklatur beruht weitgehend auf den Vorschlägen von MAJINO und JORIS (1995).

2.2.2 Vergleich zwischen Apoptose und Onkose

Die Hauptunterschiede zwischen Apoptose und Onkose werden nachfolgend tabellarisch aufgeführt (Tab. 3).

| | Apoptose | Onkose |
|----------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| Umgebung | Keine Entzündungsreaktion | Entzündungsreaktion |
| Morphologische | (1) die Zelle schrumpft und wird | (1) die Zelle schwillt an |
| Hauptcharak- | dichter | (2) im allgemeinen tritt eine |
| teristika | (2) das Chromatin wird | Karyolyse ein |
| (Histologie) | pyknotisch und sammelt sich | (3) die Zellmembran und das |
| | an der nukleären Membran | darunterliegende |
| | (Marginalisierung des | Zytoskelett verlieren ihren |
| | Chromatins) | Kontakt; dadurch kommt es |
| | (3) die Zelle bildet Pseudopodien | zur Ausbildung von Blasen, |
| | aus ("budding") und schnürt | die typischerweise nur mit |
| | sogenannte "apoptotic | Flüssigkeit gefüllt sind und |
| | bodies" ab, die | keinerlei Organellen |
| | Zellorganellen und/oder | enthalten ("blebbing"); |
| | Chromatinanteile enthalten | diese Blasen können sehr |
| | | leicht zerreißen |
| Ultrastruktur | (1) die Organellen zeigen wenig | (1) die Organellen schwellen an |
| | oder kein Anschwellen | (2) die Plasmamembran |
| | (2) die Plasmamembran bleibt | rupturiert und |
| | erhalten und umgibt die | zytoplasmatische |
| | apoptotischen Körperchen, es | Bestandteile gelangen in die |
| | kommt jedoch zum Verlust | Umgebung |
| | spezialisierter Oberflächen- | |
| | strukturen (Mıkrovıllı und | |
| | Kontaktregionen) | |
| Molekular- | Die DNA wird enzymatisch in je | Die DNA wird unspezifisch |
| biologie | nach Zelltyp spezifisch große | fragementiert |
| X X X | Fragmente aufgespalten | |
| Ursache | Der Prozess steht unter | Der Prozess beruht auf einem |
| | genetischer Kontrolle (kann von | Versagen der Ionenpumpen der |
| | der Zelle selbst oder durch | Plasmamembran autgrund eines |
| | extrazellulare Agentien initiert | A I P-Verlustes (bedingt durch |
| 7.4.1 | werden) | Ischamie, Toxine, etc.) |
| Zeitdauer | | ca. 24n |
| Verwendete | Selbstmord der Zelle, aktiver | akzidenteller Zelltod, |
| Synonyme | Zelitod, physiologischer Zelltod, | ischamischer Zelltod, Zellmord, |
| | Schrumpfungsnekrose, program- | passiver Zeiltod, Karyolyse |
| | mierter Zelltod, individuelle | |
| | Zellnekrose, Karyorrhexis | |

Tab. 3: Vergleich zwischen Apoptose und Onkose

Apoptose und Onkose führen beide zur Nekrose. Nekrotische Zellen verlieren die Fähigkeit zum Plasma-Membran-Transport, daher können Farbstoffe wie Trypanblau oder Propidiumiodid nicht mehr ausgeschleust werden. Autolytische Vorgänge setzen ein und führen zur Dissolution übriggebliebener Zellbestandteile.

Zu beachten ist, daß in einem aktiven Gewebeverband apoptotische Körperchen schnell von benachbarten Zellen bzw. Gewebemakrophagen phagozytiert werden und dann lysosomal verdaut werden können (SAMALI et al., 1996). Auch Bestandteile onkotischer Zellen werden phagozytiert, da sie jedoch nicht von einer Zellmembran umgeben sind, führen insbesondere enzymatische Anteile zu einer weiteren Destruktion benachbarter Zellen. Hieraus erklärt sich die anschließende Entzündungsreaktion mit dem Auftreten spezialisierter "Phagozyten" (Granulozyten, Makrophagen).

2.2.3 Apoptose und Kanzerogenese

Wachstumskinetische Studien sollten sowohl Zellneubildung als auch Zelltod berücksichtigen (STRÄTER et al., 1995). Neoplastisches Wachstum entsteht nicht nur durch eine erhöhte Zellneubildung, sondern auch bei normaler Zellproliferation durch Akkumulation neoplastisch klonierter Zellen als Konsequenz abnorm langer Überlebensraten (SCHULTE-HERMANN et al., 1997; STRÄTER et al., 1995). Zumindest in einigen Tumoren ist die Malignität mit dem Verlust der Fähigkeit zur Apoptose korreliert (ROBERTS et al., 1995; GORCZYCA et al., 1993).

Auf zellulärer Ebene wird die Initiation einer Zelle durch Replikation fixiert und durch Apoptose eliminiert (BURSCH et al., 1992). Substanzen, die die Apoptose einer initiierten Zellpopulation inhibieren, führen zu einem Wachstumsvorteil dieser Population. Andererseits werden solche Substanzen, die die Apoptose initiierter Zellen fördern, eine antikanzerogene Wirkung aufweisen (MARSMAN und BARRETT, 1994).

2.2.4 Feststellung der Apoptose am Paraffinschnitt

2.2.4.1 Histologisches Erscheinungsbild

Apoptose ist ursprünglich elektronenmikroskopisch über ihre Zellmorphologie definiert worden (WYLLIE, 1980). Obwohl heute eine Reihe von weiteren Techniken der Identifikation apoptotischer Zellen dienen können, ist die morphologische Bestimmung apoptotischer Zellen die einzige unwiderlegbare Methodik (CUMMINGS et al., 1997; NEGOESCU et al., 1996; LEVIN, 1995; BURSCH et al., 1992).

Die folgenden Veränderungen repräsentieren Apoptose (KERR et al., 1972; WYLLIE, 1980):

- (a) deutliche Kondensation des Chromatins und des Zytoplasmas (apoptotische Zellen)
- (b) zytoplasmatische Fragmente mit oder ohne kondensiertem Chromatin (apoptotische Körperchen)
- (c) intra- und extrazelluläre Chromatinfragmente ("Micronuclei").

Die Kondensation beruht auf einem intrazellulären Wasserverlust. Dadurch verlieren apoptotische Zellen den Kontakt zu ihren Nachbarzellen (DARZYNKIEWICZ et al., 1997). Die Kondensation des Chromatins (Pyknose) beginnt an der Peripherie des Zellkerns (Margination), und das kondensierte Chromatin nimmt oft eine konkave Form an, welches Ähnlichkeit mit einem Halbmond, einem Hufeisen oder einer Sichel aufweist. Es hat ein einheitliches, glattes Aussehen, in dem keine Strukturen, die normalerweise im Kern zu erkennen sind, sichtbar werden.

Diese typische Veränderung des nukleären Materials ist in einem 5µm dicken Paraffinschnitt oft nicht zu sehen, stattdessen erscheint das Chromatin bei HE-Färbung als einheitlich basophile Masse (CUMMINGS et al., 1997). Verwechselungen können lichtmikroskopisch mit mitotischen Zellen in der Telophase auftreten (STAUNTON und GAFFNEY, 1995; WIJSMAN et al., 1993; GAVRIELI et al., 1992).

Eine apoptotische Zelle ist nur für wenige Minuten sichtbar (BURSCH et al., 1992, 1990; GAVRIELI et al., 1992). Apoptotische Körperchen sind demgegenüber für 1 bis 2 Stunden histologisch erkennbar (CUMMINGS et al., 1997; GAVRIELI et al., 1992). In Gewebe, in dem die Apoptose asynchron auftritt, sind sogenannte "budding cells", also solche, die gerade apoptotische Körperchen abschnüren, selten und apoptotische Körperchen in verschiedenen Stadien der Degeneration herrschen vor (KERR et al., 1995).

Apoptotische Körperchen erscheinen als runde oder ovale, zytoplasmatische, eosinophile Massen mit oder ohne basophilem nukleärem Material (CUMMINGS et al., 1997). Sie variieren sehr stark in ihrer Größe, die kleinsten sind im Lichtmikroskop nicht zu erkennen, es sei denn, sie enthalten zumindest ein nukleäres Fragment (CUMMINGS et al., 1997; KERR et al., 1995). Während elektronenmikroskopisch apoptotische Körperchen eindeutig identifizierbar sind, ist bei einer lichtmikroskopischen Untersuchung Vorsicht und Erfahrung gefordert (BURSCH et al., 1992).

So kann auch die Entscheidung, ob ein bestimmtes apoptotisches Körperchen intra- oder extrazellulär liegt, mit dem Lichtmikroskop schwierig sein (KERR et al., 1995). Körperchen, die von großen, schwach gefärbten Makrophagen aufgenommen worden sind, scheinen auf den ersten Blick in einem klaren Raum zu liegen (KERR et al., 1995). Demgegenüber führt
die Schrumpfung der Zellen, welche durch die Präparation des Paraffinblocks unvermeidlich auftritt, oftmals zu der Entstehung von leeren Räumen um die extrazellulär liegenden apoptotischen Körperchen (sogenannte "halos") (KERR et al., 1995).

Die Mehrzahl der lichtmikroskopisch in Geweben untersuchten apoptotischen Körperchen sind von benachbarten Zellen phagozytiert worden und befinden sich im Stadium der sogenannten progressiven Degeneration (ARENDS und WYLLIE, 1991).

Wenn die apoptotischen Körperchen nach der Phagozytose einen deutlichen lysosomalen Verdau aufweisen, sind sie nur schwer zu erkennen. Solche, die eine nukleäre Komponente enthalten, bleiben länger sichtbar als rein zytoplasmatische Körperchen. Kleinere, unlösliche Membranabbauprodukte, morphologisch erkennbar als Lipofuszin, können sogar über einen beträchtlichen Zeitraum erkennbar bleiben (MARSMAN und BARRETT, 1994).

Die geringe Größe und die kurze "Halbwertszeit" apoptotischer Körperchen, das Fehlen einer Entzündungsreaktion und das "Aufrücken" benachbarter Zellen an die Position der durch Apoptose verschwundenen Zellen, machen den gesamten Vorgang histologisch unauffällig (CUMMINGS et al., 1997).

2.2.4.2 TUNEL-Assay

Strukturelle Alterationen der DNA während der Apoptose liefern die Basis für dieses Nachweissystem. Kennzeichnend für diese Alterationen ist die Aktivierung von Endonukleasen, welche zu der Entstehung von DNA-Fragmenten mit einer Größe von etwa 180-200 Basenpaaren bzw. deren Vielfaches führt (ARENDS und WYLLIE, 1991). Diese DNA-Fragmente resultieren in der charakteristischen DNA-Leiter nach Elektrophorese extrahierter DNA.

Die in Situ-Identifikation apoptotischer Zellen beruht auf dem Gebrauch exogener Enzyme, wie der DNA-Polymerase (GOLD et al., 1993; WIJSMAN et al., 1993) und der "Terminalen Deoxynucleotidyl Transferase" (TdT) (Gold et al., 1994; Gavrieli et al., 1992), welche markierte Nukleotide an die 3'-Hydroxyl-Enden der DNA-Brüche einfügen.

Generell werden solche Techniken als "in Situ End Labeling" (ISEL) bezeichnet. Bei Gebrauch der DNA-Polymerase bezeichnet man sie als "in Situ Nick Translation" (ISNT), bei Gebrauch der Terminalen Transferase als "TdT-Mediated dUTP Nick End-Labeling" (TUNEL).

Die TUNEL-Methode wird im Vergleich zur ISNT-Methode als die sensitivere und spezifischere angesehen (GOLD et al., 1994; GORCZYCA et al., 1993). Das TdT-Enzym besitzt gegenüber der DNA-Polymerase den Vorteil, daß es keine Matrize ("Template") für

die Einfügung neuer Nukleotide benötigt. Ein "Template" fehlt an den Enden doppelsträngiger internukleosomaler DNA-Fragmente mit sogenannten "blunt ends" (glatte Enden), welche für die Apoptose typisch sein sollen (GOLD et al., 1994).

Die zwei kommerziell erhältlichen Kits zur Detektion apoptotischer Zellen von Oncor (Gaitersburg, MD) und Boehringer (Mannheim, Deutschland) beruhen auf der TUNEL-Methodik.

Die Spezifität wird limitiert durch die unvermeidliche Präsenz von DNA-Strangbrüchen aufgrund einer Reihe von Einflußfaktoren, wie beispielsweise DNA-Rekombination, DNA-Replikation, DNA-Reparatur (EASTMAN und BARRY, 1992), Autolyse, Fixation, Paraffin-Einbettung, sowie der Gewebevorbehandlung mit H₂0₂, Proteinase K und/oder Mikrowelle (LABAT-MOLEUR et al., 1998). Laut ANSARI et al. (1993) ist die ISEL-Technik trotzdem eine spezifische Nachweismethode für apoptotische Zellen, da diese einen wesentlich höheren Gehalt an DNA-Fragmenten aufweisen, wobei insbesondere doppelsträngige DNA-Strangbrüche überwiegen (LABAT-MOLEUR et al., 1998; WYLLIE et al., 1992).

Auch Ca-haltige Vesikel können zu einer unspezifischen Bindung der markierten Nukleotide führen (KOCKX et al., 1998).

Vielfach wird betont, daß sowohl die onkotische Nekrose als auch die apoptotische Nekrose zu einem positiven Ergebnis bei Anwendung der ISEL-Technik führen (KOCKX et al., 1998; TRUMP et al., 1997; GRASL-KRAUPP et al., 1995; LEVIN, 1995) und die Methode daher keine eindeutige Unterscheidung erlaubt. Andererseits treten DNA-Strangbrüche bei der onkotischen Nekrose durch unspezifische Degradation erst zu einem späten Zeitpunkt auf, der bereits morphologisch zu erkennen ist (LABAT-MOLEUR et al., 1998; KRESSEL und GROSCURTH, 1994; COLLINS et al., 1992) und sich von apoptotischen Zellen unterscheidet.

Die Klassifizierung normal geformter, intensiv TUNEL-positiver Zellen ist Inhalt eines wissenschaftlichen Disputes. Laut GAVRIELI et al. (1992) befinden sich solche Zellen in einer präapoptotischen Phase. Diese Zellen würden dann zu einer Phase korrespondieren, in der DNA-Fragmente entstehen, bevor Änderungen in der Zellmorphologie auftreten (MUNDLE et al., 1994; GORCZYCA et al., 1993; WALKER et al., 1993). TUNEL-positive Zellen ohne apoptotische Morphologie sollten laut NEGOESCU et al. (1996) dann als präapoptotische Stadien gewertet werden, wenn sie mit typischen apoptotischen Zellen, die ebenfalls TUNEL-positiv sind, in demselben Präparat vorkommen. COLLINS et al. (1997) betonen jedoch, daß der Zeitpunkt der DNA-Segmentierung während der Apoptose *in vivo* noch immer unbekannt ist.

Vorteile der TUNEL-Methodik gegenüber einer rein lichtmikroskopischen Untersuchung liegen in der erleichterten Quantifizierbarkeit (LEVIN, 1995; WIJSMAN et al., 1993; GAVRIELI et al., 1992), insbesondere für ein automatisiertes Zählsystem, und der erleichterten Detektion der lichtmikroskopisch oftmals unauffälligen apoptotischen Vorgänge (ANSARI et al., 1993; WIJSMAN et al., 1993).

Nachteilig wirkt sich die mangelnde Spezifität dieser Methode aus, so daß insbesondere Einzelzellonkosen nicht eindeutig von Apoptosen abzugrenzen sind. Wie schon oben ausgeführt, stellen diese beiden Vorgänge laut FARBER (1994) jedoch lediglich zwei Varianten der ursprünglich unter den Begriff Nekrose fallenden Veränderungen dar, und sind nach heutigem Erkenntnisstand auch unter weiteren Gesichtspunkten nicht eindeutig voneinander abgrenzbar.

2.3 Die Nebennierenrinde der Ratte

2.3.1 Anatomie und Histologie

Anatomie: Die Nebennieren liegen retroperitoneal als paarige Organe kraniomedial im Fettgewebe eingebettet in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Nieren. Gewicht und Größe der Nebennieren hängen von Alter, Geschlecht, Ernährungszustand und Rasse ab. Die Nebennieren der weiblichen Ratten sind signifikant größer und schwerer (sowohl relativ als auch absolut) als die der männlichen, auch wenn hier relative Unterschiede zwischen den einzelnen Rattenstämmen und sogar zwischen einzelnen Zuchtlinien bestehen (MALENDOWICZ, 1987). Die Nebennieren erhalten ca. 0,14% des Blutvolumens, obwohl sie nur 0,02% des Körpergewichtes ausmachen. Damit gehören sie zu den am besten durchbluteten Organen überhaupt (SAPIRSTEIN und GOLDMAN, 1959).

Histologie: Jede Nebenniere ist von einer zellreichen, gefäßführenden fibrösen Kapsel überzogen. Die fibröse Kapsel steht mit dem vorwiegend retikulären Faserstroma des Organs in Verbindung. Drei fließend ineinander übergehende Zonen werden histologisch unterschieden: die Zona glomerulosa, die Zona fasciculata und die Zona reticularis.

Die außen liegende <u>Zona glomerulosa</u> setzt sich aus knäuelartig gewundenen Epithelzellsträngen zusammen. Die Zellen sind klein und azidophil und besitzen einen dunklen ellipsoidalen Zellkern mit deutlichem Nukleolus. Das Zytoplasma weist nur wenige paraplasmatische Einschlüsse auf. Laut NUSSDORFER (1986) macht die Zona glomerulosa 10-15% des Gesamtdrüsenvolumens bei der Ratte aus.

Die sich anschließende Zona fasciculata ist durch parallel verlaufende, zwei bis drei Zellen breite Säulen gekennzeichnet, die sich in enger Nachbarschaft parallel zu den Blutkapillaren orientieren. Sie setzt sich aus großen polygonalen Epithelzellen mit hohem Lipidgehalt zusammen. Dieser nimmt von außen nach innen ab. Routinemäßig mit Fettlösungsmitteln behandelte histologische Schnitte lassen einen hellen, grobwabigen Zelleib erkennen, woraus sich der ebenfalls verwendete Name "Spongiozyten" erklärt. Im Vergleich zur Zona glomerulosa sind die Zellkerne der Zona fasciculata kugeliger und größer. Immer ist ein deutlicher Nukleolus vorhanden (NUSSDORFER, 1986).

Die innerste Nebennierenrindenzone, die <u>Zona reticularis</u>, ist oft nur unscharf von der Zona fasciuclata abgegrenzt. Sie macht etwa 26,5% des Gesamtdrüsenvolumens aus (NUSSDORFER, 1986). Die Zellbalken erscheinen im Vergleich zur Zona fasciculata dünner und sind netzartig miteinander verbunden. Die ungleichmäßig geformten Zellen sind kleiner

und enthalten weniger Lipide als in der Zona fasciculata. Mit zunehmendem Alter ist eine ansteigende Lipofuszinablagerung in den Zellen der Zona reticularis zu beobachten.

Von NUSSDORFER (1986) wird zusätzlich eine <u>Zona intermedia</u> zwischen Zona glomerulosa und Zona fasciculata beschrieben. Diese bei der Ratte drei bis fünf Zellagen breite Schicht wird nur bei wenigen Spezies beobachtet. Hauptsächlich zeichnet sie sich durch ihre Sudanophobie und damit durch das Nichtvorhandensein von Liposomen aus. Die Zellen dieser Zone besitzen einen ovoiden Zellkern und nur wenig Zytoplasma.

2.3.2 Nebennierenrindenproliferation

Die Nebennierenrinde der Ratte wird seit GOTTSCHAU (1883) unter dem Gesichtspunkt der Zellproliferation intensiv untersucht. Die Lokalisation sich teilender Zellen und der Nachweis einer zentripetalen Migration stehen hierbei im Vordergrund (siehe Kapitel 2.3.4). Die Herangehensweise an diese Fragestellungen ist vielfältig. Seltener dagegen wurden Substanzeffekte im Sinne einer Auswirkung auf die physiologische Proliferationsrate der Nebennierenrindenzellen (JONES und CLARKE, 1993; McEWAN et al., 1996) untersucht. In Tabelle 4 werden einige repräsentative Veröffentlichungen zum Thema Nebennierenrindenproliferation, deren Fragestellungen und Versuchsbedingungen aufgeführt.

| Autor | Fragestellung | Tiermaterial | Proliferationsmarker | Methodik |
|-------------|-----------------|-------------------|----------------------------------|---------------------------|
| REITER, | Regenerations- | Männliche Wistar- | H ³ -Thymidin, i.p. | 1000 Zellkerne je Zone |
| PIZZA- | verhalten nach | Ratten | Tötung 6h nach | werden ausgezählt |
| RELLO | einseitiger | 3Wo und | einmaliger Injektion | _ |
| 1966 | Adrenalektomie | 16Wo alt | | |
| WRIGHT | Findet eine | Männliche Wistar- | H ³ -Thymidin, i.p. | Kinetische Analyse |
| 1971 | zentripetale | Ratten | Tötung 1h nach | Rinde wird in je 5 |
| | Migration statt | 2Wo alt | einmaliger Injektion | Zellagen dicke "Bänder" |
| | oder nicht | | | aufgeteilt, in jedem Band |
| | | | | werden 2000 Zellkerne |
| | | | | gezählt |
| WRIGHT | Findet eine | Männliche Wistar- | H ³ -Thymidin alle 6h | Kinetische Analyse |
| et al. 1973 | zentripetale | Ratten | für 96h, | Auszählung von 2000 |
| | Migration statt | 2Wo alt | Appl.art unklar | Zellkernen pro Zone |
| | oder nicht | | Tötung je eines | Bestimmung der |
| | | | Tieres 1h nach | Wachstumsfraktion und |
| | | | Injektion | der Zellzykluszeit |
| STÖCKER, | Ermittlung des | Männliche | H ³ -Thymidin | Prozentsatz markierter |
| SCHMID | Proliferations- | Sprague Dawley | Infusion 0,5 bis 20 | Parenchymkerne (10 000 |
| 1973 | umfangs der | Ratten | Tage mittels | Kerne/Zone/Tier bei |
| | verschiedenen | 2-4Wo, | Dauerkatheter über | 1000facher |
| | Zonen | 8-16Wo und | die Schwanzvene | Vergrößerung) |
| | (Markierungs- | 2-2,5 Jahre alt | | |
| | index und - | | | |
| | relation) | | | |

Tab. 4: Nebennierenrindenproliferation in der Literatur

| <u>i ontoetzang</u> | <u></u> | | | 1 |
|--|--|---|--|---|
| Autor | Fragestellung | Tiermaterial | Proliferationsmarker | Methodik |
| WRIGHT, | Findet eine | Männliche Wistar- | H ³ -Thymidin, i.p. | Kinetische Analyse |
| VONCINA | zentripetale | Ratten | Tötung 1h nach | Rinde wird in je 3 |
| 1977 | Migration statt | 2Wo alt | einmaliger Injektion | Zellagen dicke "Bänder" |
| | oder nicht | | | aufgeteilt; in jedem Band |
| | | | | werden 2000 Zellkerne |
| | | | | gezählt |
| | | | | Vergleich der |
| | | | | Wachstumsrate mit der |
| | | | | Proliferationsrate |
| ZAJICEK | Findet eine | Adulte männliche | ³ H-Thymidin, | Messung der radialen |
| et al. 1986 | zentripetale | Ratten, | Appl.art unklar | Distanz der positiven |
| | Migration statt | Hebrew University | Tötung nach 1h oder | Kerne von der Kapsel; |
| | oder nicht | Stamm | 14, 30, 60, 90 bzw. | Meßeinheit: Anzahl der |
| | | | 120d nach | Kerne, die zwischen den |
| | | | einmaliger Injektion | positiven Kernen und der |
| | | | | Kapsel liegen |
| McNICOL, | Findet eine | Sprague Dawley | BrdU, i.p. | Qualitative Feststellung |
| DUFFY | zentripetale | Ratten | Tötung nach 2, 6, | einer "Zellbewegung" im |
| 1987 | Migration statt | 6Wo alt/männlich | 24, 48, 72h sowie | Laufe der Zeit |
| | oder nicht | 2Wo alt /männlich | nach 7, 14, 21 und | |
| | | und weiblich | 28d nach einmaliger | |
| | | | Injektion | |
| JONES, | Phenobarbiton- | Männliche Wistar | BrdU für 2d mittels | Auszählung von |
| | 1 Inchood on on on | 1, I allillo II o II o cal | | |
| CLARKE | Einfluß auf die | Ratten | osmotischer | mindestens 1000 |
| CLARKE 1993 | Einfluß auf die Zellproliferation | Ratten 6-7Wo alt | osmotischer Minipumpe | mindestens 1000 Zellkernen pro Präparat |
| CLARKE 1993 | Einfluß auf die Zellproliferation verschiedener | Ratten 6-7Wo alt | osmotischer Minipumpe | mindestens 1000 Zellkernen pro Präparat |
| CLARKE 1993 | Einfluß auf die Zellproliferation verschiedener Gewebe | Ratten 6-7Wo alt | osmotischer Minipumpe | mindestens 1000 Zellkernen pro Präparat |
| CLARKE 1993 MITANI | Einfluß auf die Zellproliferation verschiedener Gewebe Bedeutung und | Ratten 6-7Wo alt Männliche | osmotischer Minipumpe BrdU, i.p. | anhand Hämatoxylin |
| CLARKE 1993 MITANI et al. 1994 | Einfluß auf die Zellproliferation verschiedener Gewebe Bedeutung und Aufgabe der | Ratten 6-7Wo alt Männliche Sprague Dawley | osmotischer Minipumpe BrdU, i.p. Tötung 1h nach | anhand Hämatoxylin gefärbter Schnitte wird |
| CLARKE 1993 MITANI et al. 1994 | Einfluß auf die Zellproliferation verschiedener Gewebe Bedeutung und Aufgabe der Zona intermedia | Ratten 6-7Wo alt Männliche Sprague Dawley Ratten | osmotischer Minipumpe BrdU, i.p. Tötung 1h nach einmaliger Injektion | anhand Hämatoxylin gefärbter Schnitte wird die Gesamtzahl |
| CLARKE 1993 MITANI et al. 1994 | Einfluß auf die Zellproliferation verschiedener Gewebe Bedeutung und Aufgabe der Zona intermedia | Ratten 6-7Wo alt Männliche Sprague Dawley Ratten 200g schwer | osmotischer Minipumpe BrdU, i.p. Tötung 1h nach einmaliger Injektion | anhand Hämatoxylin gefärbter Schnitte wird die Gesamtzahl kortikaler Zellen |
| CLARKE 1993 MITANI et al. 1994 | Einfluß auf die Zellproliferation verschiedener Gewebe Bedeutung und Aufgabe der Zona intermedia | Ratten 6-7Wo alt Männliche Sprague Dawley Ratten 200g schwer | osmotischer Minipumpe BrdU, i.p. Tötung 1h nach einmaliger Injektion | anhand Hämatoxylin gefärbter Schnitte wird die Gesamtzahl kortikaler Zellen bestimmt; BrdU positive |
| CLARKE 1993 MITANI et al. 1994 | Einfluß auf die Zellproliferation verschiedener Gewebe Bedeutung und Aufgabe der Zona intermedia | Ratten 6-7Wo alt Männliche Sprague Dawley Ratten 200g schwer | osmotischer Minipumpe BrdU, i.p. Tötung 1h nach einmaliger Injektion | anhand Hämatoxylin gefärbter Schnitte wird die Gesamtzahl kortikaler Zellen bestimmt; BrdU positive Zellen werden bei |
| CLARKE 1993 MITANI et al. 1994 | Einfluß auf die Zellproliferation verschiedener Gewebe Bedeutung und Aufgabe der Zona intermedia | Ratten 6-7Wo alt Männliche Sprague Dawley Ratten 200g schwer | osmotischer Minipumpe BrdU, i.p. Tötung 1h nach einmaliger Injektion | anhand Hämatoxylin gefärbter Schnitte wird die Gesamtzahl kortikaler Zellen bestimmt; BrdU positive Zellen werden bei 100facher Vergrößerung |
| CLARKE 1993 MITANI et al. 1994 | Einfluß auf die Zellproliferation verschiedener Gewebe Bedeutung und Aufgabe der Zona intermedia | Ratten 6-7Wo alt Männliche Sprague Dawley Ratten 200g schwer | osmotischer Minipumpe BrdU, i.p. Tötung 1h nach einmaliger Injektion | anhand Hämatoxylin gefärbter Schnitte wird die Gesamtzahl kortikaler Zellen bestimmt; BrdU positive Zellen werden bei 100facher Vergrößerung ausgezählt; fraktionale |
| CLARKE 1993 MITANI et al. 1994 | Einfluß auf die Zellproliferation verschiedener Gewebe Bedeutung und Aufgabe der Zona intermedia | Ratten 6-7Wo alt Männliche Sprague Dawley Ratten 200g schwer | osmotischer Minipumpe BrdU, i.p. Tötung 1h nach einmaliger Injektion | anhand Hämatoxylin gefärbter Schnitte wird die Gesamtzahl kortikaler Zellen bestimmt; BrdU positive Zellen werden bei 100facher Vergrößerung ausgezählt; fraktionale Anteile in den |
| CLARKE 1993 MITANI et al. 1994 | Einfluß auf die Zellproliferation verschiedener Gewebe Bedeutung und Aufgabe der Zona intermedia | Ratten 6-7Wo alt Männliche Sprague Dawley Ratten 200g schwer | osmotischer Minipumpe BrdU, i.p. Tötung 1h nach einmaliger Injektion | mindestens 1000 Zellkernen pro Präparat anhand Hämatoxylin gefärbter Schnitte wird die Gesamtzahl kortikaler Zellen bestimmt; BrdU positive Zellen werden bei 100facher Vergrößerung ausgezählt; fraktionale Anteile in den verschiedenen Zonen |
| CLARKE 1993 MITANI et al. 1994 | Einfluß auf die Zellproliferation verschiedener Gewebe Bedeutung und Aufgabe der Zona intermedia | Ratten 6-7Wo alt Männliche Sprague Dawley Ratten 200g schwer | osmotischer Minipumpe BrdU, i.p. Tötung 1h nach einmaliger Injektion | mindestens 1000 Zellkernen pro Präparat anhand Hämatoxylin gefärbter Schnitte wird die Gesamtzahl kortikaler Zellen bestimmt; BrdU positive Zellen werden bei 100facher Vergrößerung ausgezählt; fraktionale Anteile in den verschiedenen Zonen werden bestimmt |
| CLARKE 1993 MITANI et al. 1994 McEWAN | Einfluß auf die Zellproliferation verschiedener Gewebe Bedeutung und Aufgabe der Zona intermedia | Ratten 6-7Wo alt Männliche Sprague Dawley Ratten 200g schwer | osmotischer Minipumpe BrdU, i.p. Tötung 1h nach einmaliger Injektion BrdU für 2Wo | anhand Hämatoxylin gefärbter Schnitte wird die Gesamtzahl kortikaler Zellen bestimmt; BrdU positive Zellen werden bei 100facher Vergrößerung ausgezählt; fraktionale Anteile in den verschiedenen Zonen werden bestimmt Insgesamt 2000 |
| CLARKE 1993 MITANI et al. 1994 McEWAN et al. 1996 | Einfluß auf die Zellproliferation verschiedener Gewebe Bedeutung und Aufgabe der Zona intermedia Einfluß des Renin- | Ratten 6-7Wo alt Männliche Sprague Dawley Ratten 200g schwer Adulte männliche Sprague Dawley | osmotischer Minipumpe BrdU, i.p. Tötung 1h nach einmaliger Injektion BrdU für 2Wo mittels osmotischer | mindestens 1000 Zellkernen pro Präparat anhand Hämatoxylin gefärbter Schnitte wird die Gesamtzahl kortikaler Zellen bestimmt; BrdU positive Zellen werden bei 100facher Vergrößerung ausgezählt; fraktionale Anteile in den verschiedenen Zonen werden bestimmt Insgesamt 2000 Zellkerne pro Präparat |
| CLARKE 1993 MITANI et al. 1994 McEWAN et al. 1996 | Einfluß auf die Zellproliferation verschiedener Gewebe Bedeutung und Aufgabe der Zona intermedia Einfluß des Renin- Angiotensin- | Ratten 6-7Wo alt Männliche Sprague Dawley Ratten 200g schwer Adulte männliche Sprague Dawley Ratten | osmotischer Minipumpe BrdU, i.p. Tötung 1h nach einmaliger Injektion BrdU für 2Wo mittels osmotischer Minipumpe | mindestens 1000 Zellkernen pro Präparat anhand Hämatoxylin gefärbter Schnitte wird die Gesamtzahl kortikaler Zellen bestimmt; BrdU positive Zellen werden bei 100facher Vergrößerung ausgezählt; fraktionale Anteile in den verschiedenen Zonen werden bestimmt Insgesamt 2000 Zellkerne pro Präparat werden ausgezählt, |
| CLARKE 1993 MITANI et al. 1994 McEWAN et al. 1996 | Einfluß auf die Zellproliferation verschiedener Gewebe Bedeutung und Aufgabe der Zona intermedia Einfluß des Renin- Angiotensin- Aldosteron | Ratten 6-7Wo alt Männliche Sprague Dawley Ratten 200g schwer Adulte männliche Sprague Dawley Ratten | osmotischer Minipumpe BrdU, i.p. Tötung 1h nach einmaliger Injektion BrdU für 2Wo mittels osmotischer Minipumpe | mindestens 1000 Zellkernen pro Präparat anhand Hämatoxylin gefärbter Schnitte wird die Gesamtzahl kortikaler Zellen bestimmt; BrdU positive Zellen werden bei 100facher Vergrößerung ausgezählt; fraktionale Anteile in den verschiedenen Zonen werden bestimmt Insgesamt 2000 Zellkerne pro Präparat werden ausgezählt, 400fache Vergrößerung |
| CLARKE 1993 MITANI et al. 1994 McEWAN et al. 1996 | Einfluß auf die Zellproliferation verschiedener Gewebe Bedeutung und Aufgabe der Zona intermedia Einfluß des Renin- Angiotensin- Aldosteron Systems auf die | Ratten 6-7Wo alt Männliche Sprague Dawley Ratten 200g schwer Adulte männliche Sprague Dawley Ratten | osmotischer Minipumpe BrdU, i.p. Tötung 1h nach einmaliger Injektion BrdU für 2Wo mittels osmotischer Minipumpe | anhand Hämatoxylin gefärbter Schnitte wird die Gesamtzahl kortikaler Zellen bestimmt; BrdU positive Zellen werden bei 100facher Vergrößerung ausgezählt; fraktionale Anteile in den verschiedenen Zonen werden bestimmt Insgesamt 2000 Zellkerne pro Präparat werden ausgezählt, 400fache Vergrößerung Epitheliale und |
| CLARKE 1993 MITANI et al. 1994 McEWAN et al. 1996 | Einfluß auf die Zellproliferation verschiedener Gewebe Bedeutung und Aufgabe der Zona intermedia Einfluß des Renin- Angiotensin- Aldosteron Systems auf die Nebennieren- | Ratten 6-7Wo alt Männliche Sprague Dawley Ratten 200g schwer Adulte männliche Sprague Dawley Ratten | osmotischer Minipumpe BrdU, i.p. Tötung 1h nach einmaliger Injektion BrdU für 2Wo mittels osmotischer Minipumpe | mindestens 1000 Zellkernen pro Präparat anhand Hämatoxylin gefärbter Schnitte wird die Gesamtzahl kortikaler Zellen bestimmt; BrdU positive Zellen werden bei 100facher Vergrößerung ausgezählt; fraktionale Anteile in den verschiedenen Zonen werden bestimmt Insgesamt 2000 Zellkerne pro Präparat werden ausgezählt, 400fache Vergrößerung Epitheliale und endotheliale Zellen |
| CLARKE 1993 MITANI et al. 1994 McEWAN et al. 1996 | Einfluß auf die Zellproliferation verschiedener Gewebe Bedeutung und Aufgabe der Zona intermedia Einfluß des Renin- Angiotensin- Aldosteron Systems auf die Nebennieren- rindenproli- | Ratten 6-7Wo alt Männliche Sprague Dawley Ratten 200g schwer Adulte männliche Sprague Dawley Ratten | osmotischer Minipumpe BrdU, i.p. Tötung 1h nach einmaliger Injektion BrdU für 2Wo mittels osmotischer Minipumpe | mindestens 1000 Zellkernen pro Präparat anhand Hämatoxylin gefärbter Schnitte wird die Gesamtzahl kortikaler Zellen bestimmt; BrdU positive Zellen werden bei 100facher Vergrößerung ausgezählt; fraktionale Anteile in den verschiedenen Zonen werden bestimmt Insgesamt 2000 Zellkerne pro Präparat werden ausgezählt, 400fache Vergrößerung Epitheliale und endotheliale Zellen werden getrennt |

Fortsetzung Tab. 4: Nebennierenrindenproliferation in der Literatur

Erläuterungen zu den Abkürzungen: h = Stunden, d = Tage, Wo = Wochen

Die überwiegende Mehrzahl aller Veröffentlichungen setzt ³H-Thymidin als Proliferationsmarker ein. Meist wird hierbei nur eine einmalige Injektion angewendet. Um eine kontinuierliche Zufuhr dieses Markers über einen längeren Versuchszeitraum zu gewährleisten setzen WRIGHT et al. (1973) wiederholte Injektionen in sechstündigem Abstand ein. Es werden fast ausschließlich männliche Ratten verwendet, um die bei weiblichen Tieren auftretenden östrusbedingte Schwankungen der proliferativen Aktivität der Nebennierenrinde ausschließen zu können (HUNT und HUNT, 1966).

Lediglich bei zwei Veröffentlichungen (McEWAN et al., 1996; JONES und CLARKE, 1993) wurde BrdU mittels osmotischer Minipumpen appliziert.

Die Schwächen bzw. Vorteile der einzelnen Versuchsbedingungen werden von einigen Autoren selbst diskutiert. McNICOL und DUFFY (1987) führen aus, daß es bei der ³H-Thymidin Methodik oftmals schwierig sein kann, positive von negativen Zellkernen zu unterscheiden. Einen Vorteil von BrdU gegenüber ³H-Thymidin sehen sie in der fehlenden Wiedernutzung von BrdU nach Freisetzung aus absterbenden Zellen. Daraus ergibt sich ein Vorteil von BrdU gegenüber ³H-Thymidin insbesondere bei Langzeitversuchen. Aufgrund dieser Wiederaufnahme von ³H-Thymidin sind Ergebnisse aus Versuchen, die die "Bewegung" von positiven Zellen nach einmaliger ³H-Thymidin-Injektion verfolgen, leicht anfechtbar (WRIGHT und VONCINA, 1977). Außerdem führt eine einmalige Injektion von ³H-Thymidin aufgrund der daraus resultierenden geringen Anzahl markierter Zellen zu großen statistischen Abweichungen, die biologisch irrelevant sein können (STÖCKER und SCHMID, 1973).

Daher sieht WRIGHT (1971) einen Vorteil bei Messungen an präpubertalen Tieren, deren Proliferationsrate aufgrund exponentieller Wachstumsbedingungen "adäquat" ist. Seine mathematischen Berechnungen erfordern zusätzlich diese exponentiellen Bedingungen. Demgegenüber sehen ZAJICEK et al. (1986) es bei Fragestellungen, die den Zellersatz der Nebennierenrinde betreffen, als unumgänglich an, hierfür ausgewachsene Tiere einzusetzen, da nur dann "steady state" Bedingungen vorliegen.

2.3.3 "Labeling Index", Datenmaterial

Tabelle 5 zeigt einige aus der Literatur gewonnenen Werte von Kontrolltieren zum "Labeling Index" (LI), welcher den prozentualen Anteil Marker-positiver Zellen darstellt (Berechnungsformel siehe Kap. 3.3.1.3). Die von den Autoren vorgenommene zonale Unterteilung der Nebennierenrinde ist unterschiedlich, daher ist nicht in jeder Spalte ein Wert aufgeführt.

| <u>Tab. 5</u> : Da | tenmaterial | zum LI (| ler Neber | nnierenri | nde | | | | |
|----------------------------|--|----------------------------------|----------------|-----------------------|---------------|---------------|---------|-----------|----------------|
| Autoren | Marker | Zeit | Tier- alter | "Labeling-Index" (LI) | | | | | |
| | | | | Kapsel | Z. glom. | Z. interm. | Z. f | asc. | Z. ret. |
| | | | | | | | äußere | innere | |
| REITER et al. 1966 | ³ H- Thymidin, einmalige | Tötung nach 6h | 16Wo | 2,7±0,9 | 5,8±1,2 | n.d. | 7,3±0,6 | 2,0 | 2,8±1,1 |
| | Injektion | | 3Wo | 7,7±0,8 | 20±1,1 | | 14±0,9 | 1,3±0,3 | 0,8±0,4 |
| WRIGHT 1971 | ³ H- Thymidin, einmalige Injektion | Tötung nach 1h | 2Wo | n.d. | 6,7±1,0 ** | 7,1±2,0 ** | 3,17 | ±1,3 * | 1,15±0,4 ** |
| STÖCKER | ³ H- | Tötung | juvenil | n.d. | 90 | n.d. | 7 | 0 | 10 |
| 1973 | Dauer- infusion | nacn 13d (juvenil) bzw. | adult | | 45 | | 1 | 4 | 9 |
| | | 20d | senil | | 12 | | 2 | 4 | 11 |
| WRIGHT, VONCINA 1977 | ³ H- Thymidin, einmalige Injektion | Tötung nach 1h | 2 Wo | n.d. | 5,14 | n.d. | 1, | 66 | 0,23 |
| JONES, CLARKE 1993 | BrdU Mini- pumpe | Tötung nach 2d | 6 Wo | n.d. | 10,4±1,6 | n.d. | 22,5 | £1,25 | 4,2±1,8 |
| | Lh. | | 7 Wo | | 15,8±1,6 | | 11,4 | ±1,00 | 6,5±1,24 |
| McEWAN et al. 1996 | BrdU Mini- pumpe | Tötung nach 2Wo | adult | n.d. | 2# | 9# | 12# | 3# | 8# |

Erläuterungen zu den Abkürzungen:

- h = Stunden
- d = Tage

Wo = Wochen

n.d. = nicht durchgeführt

Anmerkungen:

Standardabweichungen sind aufgeführt, sofern sie von den Autoren angegeben sind

[#] Die Werte wurden aus einem Balkendiagramm abgelesen und auf ganze Zahlen gerundet, die

Standardabweichung konnte aufgrund der Balkendiagrammeinteilung nicht genau abgelesen werden, war aber jeweils sehr gering

** Standardabweichung wurde aus Balkendiagramm abgelesen

Weitere Details zu den Veröffentlichungen gehen aus Tabelle 4 in Kapitel 2.3.2 hervor.

Aus Tabelle 5 wird ersichtlich, daß die ermittelten Werte sehr stark mit dem gewählten Versuchsaufbau variieren. Selbst bei identischer Vorgehensweise (WRIGHT und VONCINA, 1977; WRIGHT, 1971) ergeben sich nicht unerhebliche Unterschiede zwischen den gewonnenen Werten. Der "Labeling Index" hängt von vielen Einflußgrößen ab, nicht zuletzt von der Auswertestrategie und dem Auswerter sowie den verwendeten Geräten.

Aus vielen Veröffentlichungen (JONES und CLARKE, 1993; WRIGHT und VONCINA, 1977; WRIGHT et al., 1973; WRIGHT, 1971; REITER und PIZZARELLO, 1966) geht nicht genau hervor, anhand welcher morphologischer Kriterien die zonale Unterteilung der Nebennierenrinde vorgenommen wurde. Stattdessen wird teilweise auch eine Unterteilung anhand der beobachteten proliferativen Aktivität vorgenommen (WRIGHT und VONCINA, 1977; WRIGHT, 1971), und die ermittelten Werte werden nachträglich auf die ursprünglichen Zonen übertragen. Teilweise wird die Zona fasciculata in eine äußere und innere Schicht aufgegliedert (McEWAN et al., 1996; REITER und PIZZARELLO, 1966), oder es wird zusätzlich die Zona intermedia aufgeführt (WRIGHT, 1971), deren Bedeutung auch in Bezug auf Proliferation nach wie vor umstritten ist. Auch die Kriterien für die Zellkernzählung selbst werden fast nie konkretisiert (bis auf McEWAN et al., 1996).

Daher sind die ermittelten Werte lediglich für den individuellen Versuch ein Maßstab und selbst unter nahezu identischen Versuchsbedingungen kaum zu reproduzieren (WRIGHT und VONCINA, 1977; WRIGHT, 1971). Eine nahezu identische Vorgehensweise zwischen zwei verschiedenen Versuchen führt also zu einer besseren Vergleichbarkeit, aber keiner absoluten Gleichheit der ermittelten Werte.

2.3.4 Zytogenese

Nach KATAOKA et al. (1996) existieren zum heutigen Zeitpunkt vier Haupthypothesen zur Zytogenese der Nebennierenrinde. Die erste Hypothese wird unter anderem von WRIGHT et al. (1973), FORD und YOUNG (1963) sowie GOTTSCHAU (1883) postuliert und besagt, daß die adrenokortikalen Zellen in der Zona glomerulosa proliferieren und anschließend eindirektional durch die Zona fasciculata bis hin zur Zona reticularis migrieren, bevor sie untergehen.

Demgegenüber steht die Hypothese nach IDELMAN (1978), CAIN und HARRISON (1950) sowie DEANE und GREEP (1946), welche von einer bidirektionalen Migration der adrenokortikalen Zellen ausgehen. Der Ursprung der Zellen liegt zwischen Zona glomerulosa und Zona fasciculata in der sogenannten Zona intermedia. Die neugebildeten Zellen streben hiernach ausgehend von ihrem Ursprungsort gleichzeitig der kortikalen und der medullären Oberfläche zu. NUSSDORFER (1986) nennt diese Modifikation der klassischen Migrationstheorie "proliferative intermediate zone hypothesis".

Neuere Untersuchungen (MITANI et al., 1996, 1994) weisen mit spezifischen Antikörpern gegen Mineralkortikoid- und Glukokortikoid-synthetisierende Enzyme eine nicht immunreaktive Zellzone zwischen Zona glomerulosa und Zona fasciculata nach, die nach entsprechendem Stimulus zu Zona glomerulosa- bzw. Zona fasciculata-Zellen transformiert werden kann. Die Lokalisation dieser Progenitorzellschicht stimmt mit der histologisch durch ihre relative Fettarmut (Sudanophobie) und ihre große Zelldichte charakterisierten Zona intermedia überein.

BELLONI et al. (1978) schlagen folgendes Modell vor: die morphologische Grundeinheit der Nebennierenrinde ist hiernach eine Kette aus Parenchymzellen die innerhalb der Zona glomerulosa eine Schleife mit variabler Länge formt. Der Anfang dieser Schleife bildet den Bereich, in dem die Zellen proliferieren. Darauffolgende Zellen werden entlang der Kette weitergeschoben. Bei der Ratte treten häufiger lange Schleifen auf, so daß deren Anfang an der Grenze zur Zona fasciculata bzw. innerhalb der Zona fasciculata zu liegen kommt. Kurze Schleifen finden ihren Anfang in der Zona glomerulosa und nur einzelne Stränge verlaufen ohne Schleifenbildung vollkommen gerade durch die Nebennierenrinde. Deren Anfang berührt daher die Bindegewebskapsel der Nebenniere. Der Hauptanteil proliferierender Zellen wird laut diesem Modell in der Zona intermedia vorzufinden sein, geringere Anteile aber auch in der Zona glomerulosa und der äußeren Zona fasciculata. Auch einzelne proliferierende Zellen in Kapselnähe können auftreten.

Diese drei ersten Hypothesen haben gemeinsam, daß sie von einer zentripetalen Migration adrenokortikaler Zellen von ihrem Bildungsursprung in der Kortexperipherie ausgehen. Daher können sie allesamt als sogenannte "Migrationstheorien" (nicht mehr so geläufig ist der Begriff "escalator theory") aufgefaßt werden. Uneins sind sich die Vertreter dieser Theorie nur über die genaue Lage der mutmaßlichen Stammzellschicht und den Weg, den die migrierenden Zellen nach ihrer Entstehung durch die verschiedenen Zonen der Nebennierenrinde nehmen.

Die vierte Haupthypothese zur Zellkinetik der Nebennierenrinde steht diesen "Migrationstheorien" gegenüber und besagt, daß jede Zone für ihren eigenen Zellbedarf aufkommt, und somit als unabhängige Einheit betrachtet werden kann (JONES, 1948; SARASON, 1943; SWANN, 1940).

Zumindest Erwähnung finden soll auch noch die sogenannte "transformation field hypothesis" (TONUTTI 1953; YOFFEY, 1953). Laut dieser Hypothese entsprechen die äußere und innere Zone der Nebennierenrinde zwei Transformationsfeldern, die nach einem entsprechenden Stimulus (ACTH) in die sekretorisch aktive Zona fasciculata umgewandelt

werden können. Umgekehrt kann sich die Zona fasciculata unter ACTH-Mangel (z.B. durch Hypophysektomie) teilweise zu äußeren (Zona glomerulosa) und inneren (Zona reticularis) Nebennierenrindenzonen transformieren. Da diese Hypothese folglich nur die Zona fasciculata als sekretorisch aktives Kompartiment betrachtet, ist sie nach heutigem Erkenntnisstand nicht mehr haltbar.

Entscheidende Einflußfaktoren für die beobachteten Versuchsergebnisse sind Tierart, Stamm, Geschlecht, Alter, Marker, Proliferationsstimulus, Auswertemethodik, Tagesrhythmik, Stress, Substanzwirkungen und womöglich noch viele weitere Faktoren.

Daher kommen HOLZWARTH et al. (1996) zu der Feststellung, daß der Phenotyp proliferierender Zellen von dem jeweiligen Wachstumsstimulus abhängt und nicht nur Zellen in einer bestimmten Region proliferieren können.

2.3.5 Substanzwirkungen auf die Zellproliferation

2.3.5.1 ACTH

ACTH steigert das absolute und das relative Gewicht sowie das Volumen der Nebennieren. Eine Dosis von 50µg/kg (= 5IU/kg) entspricht laut ABAYESEKARA et al. (1989) der Erhaltungsdosis nach Hypophysektomie.

Nach einer 7maligen täglichen Dosis des 20fachen dieser Erhaltungsdosis, stellen STACHOWIAK et al. (1990) bei der Ratte mehr als eine Verdreifachung des absoluten Nebennierengewichtes fest. MALENDOWICZ (1986) beschreibt ebenfalls bei der Ratte bei einer täglichen Dosis, welche dem doppelten der Erhaltungsdosis entspricht, einen nahezu linearen Verlauf in der Gewichtszunahme bis zum 14. Behandlungstag. Danach erfolgt ein leichter Rückgang bis zum 21. Behandlungstag und anschließend eine erneute Zunahme des Gewichtes der Nebennieren bis hin zum 35. Behandlungstag (letzter Tag des Experiments).

Es werden **drei Ursachen** für die Gewichts- und Volumenzunahme unter chronischer ACTH-Behandlung angeführt. <u>Erstens</u> setzt nach einem kurzen Behandlungsintervall mit ACTH die Synthese und Sekretion von Steroid-Hormonen ein, welche ihr morphologisches Korrelat in einer Hypertrophie findet. <u>Zweitens</u> geht die initiale Zellhypertrophie anschließend in eine vermehrte Zellproliferation über (STACHOWIAK et al., 1990; MALENDOWICZ, 1986; NUSSDORFER, 1986; VAZIR et al., 1981; BELLONI et al., 1978). Und <u>drittens</u> findet unter ACTH-Wirkung eine starke Hyperämisierung statt (VAZIR et al., 1981; PUDNEY et al., 1984). Laut ANDREIS et al. (1989) erfolgt der Übergang von Hypertrophie zu Hyperplasie nach 5-7 Behandlungstagen. MALENDOWICZ et al. (1992) führen an, daß mindestens 3-4 Behandlungstage zur Auslösung einer proliferativen Antwort notwendig sind.

Nach MALENDOWICZ (1986) ist die vermehrte Steroidsynthese die spezifische ACTH-Wirkung. Die Replikation adrenokortikaler Zellen ist während dieses Zeitraumes gehemmt. Die unter Langzeitgabe autretenden adaptativen Effekte, wie Teilung und Differenzierung bzw. Umdifferenzierung adrenokortikaler Zellen bezeichnet MALENDOWICZ (1986) daher als unspezifische Phänomene. Nach DALLMAN (1985) sind Hypertrophie und Hyperplasie unter ACTH-Wirkung sequentielle Ereignisse, d.h. nach der hypertrophen Wirkung, die u.a. durch eine vermehrte RNA-Synthese bedingt ist, erfolgt nach Erreichen eines kritischen RNA/DNA-Verhältnisses die DNA-Synthese mit darauffolgender Zellteilung. Anschließend erfolgt eine erneute Zellhypertrophie. Auch dieser Autor sieht es als wahrscheinlich an, daß ACTH nicht über einen direkten Weg die Zellproliferation stimuliert, sondern sekundär über eine gesteigerte Funktionalität der Zellen. Neben ACTH sind viele weitere Faktoren in die Kontrolle des adrenokortikalen Wachstums involviert, wie z.B. Insulin, Wachstumshormon, Somatomedin und Fibroblastenwachstumsfaktor (RAMACHANDRAN et al., 1977).

ACTH-Wirkung auf die Zona glomerulosa

Seit den Studien von DEANE und GREEP (1946) wurde eine vollständige Unabhängigkeit der Zona glomerulosa von der Hypothalamo-Hypophysealen-Achse angenommen. Diese Ansicht beruhte auf der Beobachtung, daß die Weite der Zona glomerulosa unter ACTH-Einfluß (sowohl Mangel als auch Überschuß) unverändert blieb. Demgegenüber ist bei morphometrischen Volumenmessungen der Zona glomerulosa festgestellt worden, daß diese bei hypophysektomierten Ratten sinkt (NUSSDORFER et al., 1977). Auch das Gegenteil, eine leichte Volumenzunahme der Zona glomerulosa unter Gabe von synthetischem ACTH, konnte nachgewiesen werden (PAYET et al., 1980).

NUSSDORFER et al. (1977) stellen bei einer täglichen Applikation von 10IU/kg für 3, 6, 9, 12 und 15 Tage eine lineare Zunahme des Volumens der Zona glomerulosa fest. Auch MALENDOWICZ (1986) beobachtet eine Volumenzunahme aller drei Zonen, jedoch mit der höchsten Zunahme im Bereich der Zona reticularis. Demgegenüber beschreiben McDOUGALL et al. (1980) beim Schaf unter chronischer ACTH-Behandlung einen progressiven Abfall der Zellzahl der Zona glomerulosa. Die parenchymalen Zellstränge weisen eine deutliche Desintegration auf. Nach dem 3.-5. Behandlungstag ist die Zona glomerulosa nur noch eine Zellage dick, während eine etwa drei Zellagen dicke neue Schicht

gebildet wird, die der Zona intermedia gleicht. McDOUGALL et al. (1980) folgern, daß unter chronischer ACTH-Behandlung eine selektive Degeneration von Zellen der Zona glomerulosa induziert wird, und daß residuale Zona glomerulosa-Elemente zu Zellen vom Zona intermedia-Typ transformiert werden. VAZIR et al. (1981) sowie PUDNEY et al. (1984) beobachten bei Ratten ebenfalls einen Verlust von charakteristischen Zona glomerulosa-Zellen, so daß Zellen vom Fasciculata-Zelltyp oftmals direkt unterhalb der Kapsel zu liegen kommen. Auch STACHOWIAK et al. (1990) beschreiben bei Ratten eine relative Abnahme der Zellzahl in der Zona glomerulosa trotz eines absoluten Anstiegs adrenokortikaler Zellen. PAYET et al. (1980) stellen nach zweitägiger ACTH-Gabe eine Zunahme mitotischer Figuren in der Zona glomerulosa von Ratten fest, während sie eine nur trophische Stimulation in der Zona fasciculata und reticularis ausmachen.

ACTH-Wirkung auf die Zona fasciculata und Zona reticularis

Nach STACHOWIAK et al. (1990) nimmt die absolute Zellzahl in der Zona glomerulosa und in der Zona fasciculata unter ACTH-Gabe ab. Nur in der Zona reticularis nimmt die Zellzahl zu. Demgegenüber steigt die "Geburtsrate" nur in der Zona glomerulosa und Zona fasciculata, was für die zentripetale Migration dieser Zellen spricht. Auch MALENDOWICZ (1986) beschreibt in der Zona reticularis die höchste Volumen- und Zellzunahme unter ACTH-Wirkung.

BELLONI et al. (1978) stellen jedoch keine signifikante Veränderung in der Anzahl parenchymaler Zellen der Zona reticularis fest. Lediglich die Zona fasciculata zeigt eine signifikante Hyperplasie, welche mit der Dauer der ACTH-Applikation positiv korreliert. Eine Hypertrophie beobachten sie dagegen in allen drei Zonen. Unter Anwendung der autoradiographischen Technik haben sie unter ACTH-Einfluß zum einen einen signifikanten Anstieg der "S-Phase"-Zellen in den äußeren Rindenschichten und zum anderen eine daran anschließende zentripetale Migration dieser neugebildeten Zellen zur Zona fasciculata hin festgestellt.

2.3.5.2 Dexamethason

Dexamethason bewirkt über einen negativen Feedback-Mechanismus auf die Hypothalamo-Hypophyseale-Achse eine Hemmung sowohl der Synthese als auch der Sekretion von CRH und ACTH. Daher sind die Wirkungen von Dexamethason auf die Nebennierenrinde der Ratte im Prinzip denen von ACTH entgegengerichtet. Darüber hinaus soll Dexamethason auch direkt auf die Zellen der Nebennierenrinde wirken (WRIGHT et al., 1974). DeKLOET und REUL (1987) postulieren, daß die Nebennierenrindenzellen einen Kortikosteron-Rezeptor (Typ 1) und einen Dexamethason-Glukokortikoid-Rezeptor (Typ 2) aufweisen. Über diesen Glukokortikoid-Rezeptor zeigen die synthetischen Glukokortikoide einen identischen oder zumindest sehr ähnlichen Wirkmechanismus wie die natürlichen Glukokortikoide (LESNIEWSKA et al., 1992) und induzieren eine Hemmung der DNA-abhängigen Proteinsynthese (NUSSDORFER, 1986).

Das Gewicht der Nebennieren wird zeit- und dosisabhängig reduziert (STACHOWIAK et al., 1990; NUSSDORFER, 1986; NUSSDORFER et al., 1977). Eine Körpergewichtsreduktion wurde von LESNIEWSKA et al. (1992) bei einer zweiwöchigen Applikation nur in der ersten Woche beobachtet, während das Nebennierengewicht über den gesamten Versuchszeitraum hin abfiel. Die Ursachen für diese Gewichtsreduktion liegen hauptsächlich in einer Atrophie der parenchymalen Zellen (LESNIEWSKA et al., 1992; NUSSDORFER, 1986). Auch die absolute Zellzahl soll unter Dexamethason-Wirkung über eine Hemmung der Zellproliferation reduziert werden (LESNIEWSKA et al., 1992; MALENDOWICZ et al., 1992; STACHOWIAK et al., 1990; WRIGHT et al., 1974). UEBERBERG et al. (1970) stellen nach histoautoradiographischen Untersuchungen mittels ³H-Thymidin Inkorporation jedoch keinen Effekt von Dexamethason auf die Zellproliferation fest. WRIGHT et al. (1974) kommen zu der Aussage, daß Dexamethason den Zellzyklus in der späten prä-DNA synthetisierenden Phase (G₁) blockiert. Auch sie sehen es als wahrscheinlich an, daß diese Blockade über eine direkte Wirkung von Dexamethason auf die Nebennierenrindenzellen zustande kommt. Ein indirekter Mechanismus über die fehlende ACTH-Wirkung läßt sich jedoch nicht ausschließen. Da ACTH- und Glukokortikoidblutspiegel in einem Regelkreis verbunden sind, wird daher das relative Überwiegen der einen oder anderen Substanz Inhibition bzw. Stimulation der Zellproliferation bewirken.

Dexamethason-Wirkung auf die Zona glomerulosa

LESNIEWSKA et al. (1992) beobachten nur eine geringe Volumenreduktion der Zona glomerulosa. Allerdings wird laut diesen Autoren gerade in der Zona glomerulosa die Zellproliferation auch bei niedrigen Dexamethason-Dosierungen (15µg/100g/Tag) stark gehemmt. MARKOWSKA et al. (1997) stellen bei einer Dosierung von 15g/100g (!?) Körpergewicht fest, daß keine Volumenreduktion der Zona glomerulosa eintritt, das Einzelzellvolumen sich jedoch verringert. Auch STACHOWIAK et al. (1990) stellen eine Volumenabnahme der parenchymalen Zellen in der Zona glomerulosa fest; der prozentuale Anteil von Zona glomerulosa-Zellen in der Nebenniere steigt unter Dexamethason-Wirkung im Vergleich zu Kontrolltieren jedoch an. NUSSDORFER et al. (1977) zeigen über einen zweiwöchigen Versuchszeitraum eine lineare Regression des Volumens sowohl der Nebenniere insgesamt, als auch der Zona glomerulosa, während ihre Schichtdicke unverändert bleibt. Diese Versuchsergebnisse sind erneut (siehe ACTH-Wirkung auf die Zona glomerulosa) widersprüchlich zu denen anderer Autoren, obwohl alle Forscher bei ihren Volumenbestimmungen jeweils Berechnungsformeln von WEIBEL (1979) benutzen.

Dexamethason-Wirkung auf die Zona fasciculata und Zona reticularis

Die durch Dexamethason induzierte Atrophie der Nebennierenrinde betrifft vor allem die inneren Zonen (LESNIEWSKA et al., 1992; MALENDOWICZ et al., 1992; STACHOWIAK et al., 1990). Der prozentuale Anteil parenchymaler Zellen verschiebt sich laut STACHOWIAK et al. (1990) nicht nur in Richtung Zona glomerulosa (siehe oben), sondern auch in Richtung Zona fasciculata, während weniger Zellen in der Zona reticularis zu finden sind. Dies ist laut diesen Autoren ein Hinweis sowohl für die Hemmung der Zellproliferation unter Dexamethason-Wirkung, als auch für die Hemmung der zentripetalen Migration. LESNIEWSKA et al. (1992) erörtern die Veränderungen im Zellvolumen und in der Zellzahl differenzierter. Nach einwöchiger Dexamethason-Applikation verringert sich das Volumen der Zellen der Zona fasciculata sowie die Zellzahl in der Zona reticularis. Nach 2 Wochen ist eine Verringerung der Zellzahl in allen adrenokortikalen Zonen im Vergleich zu Kontrollratten auszumachen.

2.3.5.3 Aminomethyl-Chroman-Derivat

Die Entwicklungssubstanz der Firma Merck KGaA (EMD-Substanz) ist ein Aminomethyl-Chroman-Derivat. Die Wirkung der EMD-Substanz beruht auf einem D₂-Antagonismus bei gleichzeitigem HT_{1A} -Agonismus im Zentralnervensystem. Zusätzlich ist eine geringe D₂agonistische Aktivität vorhanden. Dies führt zu sehr niedrigen extrapyramidalen Nebenwirkungen bei gleichzeitig hoher neuroleptischer Effizienz.

In vitro und *in vivo* Mutagenitätstests zeigten, daß die EMD-Substanz kein mutagenes Potential aufweist. Nach wiederholter oraler Applikation zeigte sich in Ratten- und Hundeversuchen, daß die Nebenniere das Hauptzielorgan ("major target organ") für eine toxische Wirkung darstellt.

In einer 2-Wochenstudie* zeigte sich bei einer Dosis von 450mg/kg bei 30% der Ratten eine milde Hyperplasie der Nebennierenrinde. In einer 4-Wochenstudie** wurde bei einer Dosis von 250mg/kg bei einigen Ratten eine Hyperplasie der Nebennierenrinde beobachtet. In einer 6-Monatsstudie*** an Ratten waren bei einer Dosierung von 125mg/kg die Nebennierengewichte beider Geschlechter um ca. 10% erhöht. Bei 25mg/kg zeigten sich erhöhte Fettdepositionen in der Zona reticularis bei 10 von 15 männlichen Tieren sowie eine geringgradige zytoplasmatische Vakuolisierung bei 2 männlichen Tieren. Bei 125mg/kg traten zytoplasmatische Vakuolen bei 7 männlichen Tieren auf. Ein Anstieg der Fettdeposition wurde bei 8 männlichen und bei 4 weiblichen Tieren beobachtet.

*: laut persönlicher Mitteilung von Frau S. Rösner, Darmstadt im Juli 2000 **: laut persönlicher Mitteilung von Herrn P. Tempel, Darmstadt im Juli 2000 ***: laut persönlicher Mitteilung von Herrn P. Tempel, Darmstadt im Juli 2000

2.3.6 Substanzwirkungen auf die Steroidsynthese

Die Nebennierensteroide werden alle aus Cholesterol synthetisiert, hauptsächlich in einer Serie von Zytochrom-P450 abhängigen Hydroxylierungen. Cholesterol wird in Esterform in den Lipidtröpfchen der Zellen gespeichert. Die Endprodukte der Steroidsynthese werden dagegen nicht bzw. nur unwesentlich gespeichert, so daß für die Nebennierenrinde eine Unterscheidung zwischen Synthese und Sekretion nicht notwendig ist. Der Endpunkt der Steroidhormonproduktion aus Cholesterol ist zonal unterschiedlich. Aldosteron wird ausschließlich in der Zona glomerulosa gebildet. Die inneren kortikalen Zonen bilden bei der Ratte hauptsächlich Kortikosteron und nur in geringem Ausmaß Geschlechtssteroide.

<u>Regulation der Steroidsynthese</u>: Die Synthese und damit Sekretion der Glukokortikoide wird nahezu ausschließlich durch ACTH reguliert. Dieses aus 39 Aminosäuren bestehende Peptid

wird von dem Vorderlappen der Hypophyse sezerniert. Die Sekretion von ACTH wiederum wird über das "Kortikotropin Releasing Hormon" (CRH) und Vasopressin (AVP) durch den Hypothalamus gesteuert. Der hauptsächliche Stimulus der Hypothalamo-Hypohysealen Achse ("hypothalamo-pituitary-adrenal axis" (HPA)) ist Stress. Schließlich ist die Kontrolle der Glukokortikoidsynthese auch alters-, geschlechts- und tageszeitabhängig.

Die Ratte weist, wie alle nachtaktiven Tiere, in den Abendstunden und nachts (zwischen 18 und 22 Uhr) höhere Kortikosteronblutspiegel als tagsüber auf.

2.3.6.1 ACTH

Unter den in der Literatur gefundenen Effekten auf die Steroidsynthese der Nebennierenrinde unter ACTH-Behandlung sind sich die Wissenschaftler über die Induktion hoher Plasma-Kortikosteron-Spiegel einig (AGUILERA et al., 1981; VAZIR et al., 1981; McDOUGALL et al., 1980; PAYET et al., 1980). ACTH bindet an seinen Zellmembranrezeptor, welcher an G-Proteine gekoppelt ist. Über einen Anstieg des zytoplasmatischen cAMP-Spiegels entsteht eine erhöhte Verfügbarkeit von Cholesterol für die 20,22-Lyase. Hieraus resultiert eine erhöhte Pregnenolon-Synthese. Dieser erste Schritt in der Glukokortikoidsynthese limitiert die weiteren intramikrosomalen und intramitochondrialen enzymatischen Reaktionen. Ein durch die ACTH-Wirkung hervorgerufener erhöhter Pregnenolon-Spiegel steigert daher die Bildung aller weiteren Glukokortikoidsyntheseprodukte (ROSOL et al., 2001).

2.3.6.2 Dexamethason

Die Wirkungen von Dexamethason auf die Steroidsynthese sind prinzipiell der ACTH-Wirkung entgegengesetzt. LESNIEWSKA et al. (1992) stellen eine deutliche Verringerung der Kortikosteron-Blutkonzentration fest.

MALENDOWICZ et al. (1991) beobachten eine deutliche Verminderung der ACTH- und Kortikosteronblutkonzentrationen, sowie eine Depression der Kortikosteronsynthese adrenaler Homogenate, die sie von Ratten nach Dexamethasonbehandlung gewonnen haben. Auch MARKOWSKA et al. (1997) beschreiben eine deutliche Reduktion der Blutkortikosteronspiegel.

2.3.6.3 Aminomethyl-Chroman-Derivat

In vivo Experimente an verschiedenen Tierarten zeigten wiederholt eine Erniedrigung der Blutkortisolspiegel nach Behandlung mit der EMD-Substanz.

In vitro wurde mit Hilfe von Schweinenebennierenrindenzellen eine substanzbedingte Hemmung der 11 β -Hydroxylase, welche die Umsetzung von Desoxykortisol zu Kortisol bzw. Desoxykortikosteron zu Kortikosteron katalysiert, nachgewiesen. Zusätzlich wird eine Enzymhemmung der 17 α -Hydroxylase oder der 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase-/ Δ 5/4-Isomerase vermutet, da die Vorläufersteroide des Kortisols und Kortikosterons trotz Hemmung der 11 β -Hydroxylase nicht vermehrt nachgewiesen werden konnten. Somit wird bei der EMD-Substanz eine Interaktion mit mehreren P450-Enzymsystemen für die beobachtete Steroidsynthesehemmung verantwortlich gemacht.

Da die EMD-Substanz eine Wirkung auf subkortikale Gehirnregionen ausübt, ist auch eine Wirkung auf die Kontrolle und Sekretion der Neurohormone des Hypothalamus möglich.

Die vorgenommenen Messungen der ACTH-Blutspiegel in einer 26-Wochenstudie bei der Ratte waren dagegen schwieriger zu interpretieren. 2 Stunden nach Substanzapplikation war oftmals eine geringgradige Erhöhung oder kein Effekt feststellbar, 24 Stunden nach Substanzapplikation zeigte sich bei den männlichen Tieren der hohen Dosisgruppe eine deutliche Reduktion nach 3 und 6 Monaten Behandlung, welche bei den weiblichen Tieren jedoch weniger ausgeprägt war. Der Regelkreismechanismus zwischen Hypothalamus, Hypophyse und Nebennierenrinde macht einen Rebound-Effekt bei substanzbedingter Erhöhung der ACTH-Blutspiegel nach 2 Stunden mit anschließender Erniedrigung nach 24 Stunden wahrscheinlich.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Untersuchungsmaterial

3.1.1 Tiere, Alter, Haltungsbedingungen

Es wurden männliche Wistar-Ratten (HsdCpb: WU; Züchter: Harlan Winkelmann GmbH) eingesetzt. Die Tiere hatten SPF-Status und zeigten klinisch bei der Ankunft keinerlei Krankheitsanzeichen. Nach einer Adaptationsperiode von 1 Woche waren die Ratten zu Versuchsbeginn 8 Wochen alt. Die Tötungszeitpunkte lagen bei 8 Tagen (Woche 1) bzw. 29 Tagen (Woche 4) nach Versuchsbeginn.

Die Tiere wurden einzeln in Makrolonkäfigen gehalten, Deckungsmöglichkeiten wurden angeboten. Als Käfigeinstreu wurde Weichholzgranulat verwendet. Die Raumtemperatur betrug bei mittlerer Feuchte 20-24°C. Die Beleuchtung mit Leuchtstoffröhren erfolgte über eine automatische Hell-Dunkelschaltung im 12-Stunden-Rhythmus. Futter und Trinkwasser wurden ad libitum angeboten. Als Futter kam eine Altromin Standard-Diät zum Einsatz; die Tränkung erfolgte mittels Frischwasser aus dem Trinkwassernetz, angeboten in Makrolon-Tränkeflaschen. Am Versuchsbeginn sowie 1x wöchentlich wurde von allen Tieren das Körpergewicht bestimmt. Zusätzlich wurde der Futterverbrauch protokolliert.

3.1.2 Tierzahl und Gruppeneinteilung

Insgesamt 100 Ratten wurden randomisiert 5 Hauptgruppen zugeordnet (Tab. 6) und mittels Ohrlochung und Tätowierung gekennzeichnet. Jede einzelne Hauptgruppe bestand aus 2 Teilkollektiven von jeweils 10 Tieren. Ein Teilkollektiv wurde nach 7 Tagen, das andere Teilkollektiv nach 28 Tagen Prüf- bzw. Referenzmaterialexposition getötet (Tab. 7).

| Gruppe | Tierzahl | Tiernummer |
|--------|----------|------------|
| 1 | 20 | 1-20 |
| 2 | 20 | 21-40 |
| 3 | 20 | 41-60 |
| 4 | 20 | 61-80 |
| 5 | 20 | 81-100 |

Tab. 6: Gruppeneinteilung mit jeweiliger Tierzahl und Numerierung

| | Tiernummer | | | |
|--------|-------------------------|--------------------------|--|--|
| Gruppe | Tötung: Tag 8 (Woche 1) | Tötung: Tag 29 (Woche 4) | | |
| 1 | 1-10 | 11-20 | | |
| 2 | 21-30 | 31-40 | | |
| 3 | 41-50 | 51-60 | | |
| 4 | 61-70 | 71-80 | | |
| 5 | 81-90 | 91-100 | | |

Tab. 7: Gruppeneinteilung mit jeweiligen Tötungszeitpunkten und Tiernummern

3.1.3 Applikation und Dosierung

Die einzelnen Hauptgruppen wurden mit ACTH, Dexamethason, der EMD-Substanz oder lediglich einem Vehikel (Kontrollgruppe) behandelt. Die unterschiedlichen Prüfmaterialien, Applikationsarten, Applikationszeitpunkte sowie die jeweils verwendeten Substanzkonzentrationen gehen aus Tabelle 8 hervor.

| Dools in den unterbemeanenen Denandrangsbruppen | | | | | |
|---|------------------|-----------------|-------------------|------------------|--|
| Gruppe | Prüfmaterial/ | Applikationsart | Applikationszeit- | Dosis (mg/kg) | |
| | Referenzmaterial | | punkt | | |
| 1 | Kontrolle | Oral per Sonde | tgl. 1x, 7x pro | 0 | |
| | Methocel® | | Woche | | |
| 2 | Synacthen | subkutan | tgl. 1x, 7x pro | 0,05 (≈ 5 IU/kg) | |
| | Depot® (ACTH) | | Woche | , () | |
| 3 | Fortecortin® 4 | subkutan | tgl. 1x, 7x pro | 0,01 | |
| | (Dexamethason) | | Woche | | |
| 4 | EMD-Substanz | Oral per Sonde | tgl. 1x, 7x pro | 1 | |
| | | Ĩ | Woche | | |
| 5 | EMD-Substanz | Oral per Sonde | tgl 1x 7x pro | 125 | |
| J | | erm per sonae | Woche | | |
| | | | | | |

<u>Tab. 8</u>: Verwendete Prüfmaterialien, Applikationsarten, Applikationszeitpunkte und Dosis in den unterschiedlichen Behandlungsgruppen

3.1.4 BrdU-Applikation

Zur Anwendung kamen Minipumpen des Typs 2ML1 der Firma Alzet sowie BrdU der Firma Sigma Aldrich. Das Pumpenvolumen betrug 2ml, die verwendete BrdU-Konzentration lag bei 20mg/ml sterile isotone Kochsalzlösung (B.Braun). Die Pumpe gibt laut Hersteller konstant 10µl/h über 7 Tage hinweg ab. Die Implantation der Pumpe erfolgte 7 Tage vor der Tötung, für das erste Teilkollektiv jeder Hauptgruppe also zeitgleich mit dem ersten Behandlungstag, für das zweite Teilkollektiv jeder Hauptgruppe am 21. Behandlungstag.

3.1.4.1 Pumpenvorbereitung

Das pulverisierte BrdU wurde bei 45°C in einem Ultraschallgerät in steriler isotoner Kochsalzlösung gelöst. Das hierbei verwendete Gefäß war mit Alu-Folie umwickelt, da BrdU unter Lichteinfluß zerfällt. Alle zwei Minuten wurde die Lösung auf Flockenfreiheit hin überprüft. Nach vollständiger Lösung des BrdUs wurde dieses mit einem Mikrofilter (Schleicher&Schuell) steril filtriert. Anschließend wurden die Pumpen laut Herstellerangaben blasenfrei gefüllt und für 2 h bei 37°C in steriler isotoner Kochsalzlösung inkubiert, um eine sofortige BrdU-Exposition nach der Implantation zu gewährleisten.

3.1.4.2 Pumpenimplantation

Die Impantationsstelle (Übergangsbereich zwischen Lenden- und Kreuzwirbel) wurde geschoren. Die Betäubung erfolgte mittels einer Metofane® (Janssen-Cilag GmbH)-Inhalationsnarkose. Hierbei diente ein Exsikkatorgefäß als Inhalationskammer. Metofane® wurde mittels Zellgaze auf den Boden dieser Kammer verbracht. Nach ca. 2-3min wurde ein operationsfähiges Stadium exzitationslos erzielt. Die Weiterführung der Metofane®-Inhalationsnarkose außerhalb des Exsikkatorgefäßes erfolgte mit dem Stephens Narkosegerät (Eickemeyer).

Nach der Hautdesinfektion mit Jod wurde ein ca. 2-3cm langer Transversalschnitt im Bereich der Lendenwirbelsäule mit einer Schere angelegt. Weiterhin diente die Schere der stumpfen Bildung einer nach kranial verlaufenden Unterhauttasche entlang der Wirbelsäule. Mit dem Füllkopf voran wurde die Pumpe unter die Haut geschoben. Die Hautwunde wurde anschließend mit 3-4 Wundklammern verschlossen.

Die anschließende Aufwachphase war oftmals sehr kurz (wenige Sekunden nach Operationsende). Während der täglichen Kontrolle der Tiere wurde auch der ordnungsgemäße Sitz der Pumpe sowie die Wundheilung überprüft.

3.1.5 Blutentnahme

Unmittelbar vor der Tötung (24 Stunden nach der letzten Substanzgabe) wurden bei jeder Ratte unter Halothan-Narkose ca. 3ml Blut aus der Vena cava caudalis entnommen. Die Blutproben dienten der Konzentrationsbestimmung der Hormone ACTH und Kortikosteron. Kortikosteron wurde mittels des Ratten-Kortikosteron-RIA (Festphasen-Radioimmunoassay) der Firma Hermann Biermann GmbH bestimmt. Zur ACTH-Bestimmung wurde der immunradiometrische ACTH assay kit der Firma Beckmann Coulter GmbH verwendet.

3.1.6 Sektion

Nach der Blutentnahme für die endokrinologische Untersuchung wurden die Tiere durch vollständiges Entbluten getötet und sofort seziert. Folgende Gewichte wurden pro Tier ermittelt: Körpergewicht (nach Entbluten), Leber, Milz, Thymus sowie Hypophyse und Nebennieren. Die Ermittlung der Hypophysen- und Nebennierengewichte erfolgte in fixiertem Zustand einen Tag nach der Sektion, um Quetschartefakte zu vermeiden. Die Dauer der Nebennierenfixation betrug 24 Stunden.

3.1.7 Histotechnik

Nach der Fixation wurden die Organe gemäß den RITA (Registry of Industrial Toxicology Animal-data)-Empfehlungen (BAHNEMANN et al., 1995) aufgearbeitet.

Die Dehydrierung mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol erfolgte in dem Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomat TP1050 (Leica). Anschließend wurden pro Tier rechte und linke Nebenniere getrennt in Paraffinblöcke verbracht. In jeden dieser Blöcke wurde zusätzlich ein Darmstück plaziert.

Die Positionierung der Organe erfolgte derart, daß eine longitudinale Schnittführung durch die Nebenniere sowie eine transversale Schnittführung durch den beiliegenden Darmabschnitt bei dem anschließenden Zuschneiden der Blöcke erfolgen konnte. Von jedem Nebennierenblock wurden nach Kühlung auf –2°C mit dem Schlittenmikrotom HN 40 (Leica) zwischen 6 und 10 Schnitte angefertigt und anschließend auf Adhäsions-Objektträger (Histobond®) aufgezogen. Es wurden nur solche Präparate für die immunhistologische- bzw. HE-Färbung verwendet, welche sowohl Rinde als auch Mark aufwiesen. Die Schnittdicke betrug ca. 4 Mikrometer.

3.2 Untersuchungsmethoden

3.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Von jeder Nebenniere wurde ein nach H&E gefärbter Schnitt in dem Färbeautomat Auto-Stainer XL (Leica) angefertigt. <u>Protokoll für die H&E-Färbung:</u>

2x Xylol (à ca. 2min), Isopropanol (ca. 3min), Ethanol 96% (ca. 3min), Ethanol 80% (ca. 3min), Ethanol 70% (ca. 3min), entmineralisiertes Wasser (ca. 3min), Hämalaun (4min), 3x Leitungswasser (à ca. 2min), Eosin (1min), 2x Ethanol 96% (à 10sec), 2x Isopropanol (à 1min), Karbolxylol (ca. 2min), 2x Xylol (à ca. 2min)

Anschließend wurden die Präparate in dem Eindeckautomat CV5000 (Leica) mit Entellan® (Merck) eingedeckt.

3.2.2 BrdU-Nachweis

Zur Anwendung gelangte der Immunostainer der Firma BioGenex (OptiMax plus® – Automated Cell Staining System). Die von dem Apparat benötigten Lösungen (250µl/Schnitt und Arbeitsgang) wurden vor jedem Färbedurchlauf frisch angesetzt.

Außerdem wurde darauf geachtet, daß in jedem Färbedurchlauf Präparate aus unterschiedlichen Behandlungsgruppen Verwendung fanden. Datum, Präparatnummer sowie Chargenbezeichnung der verwendeten Reagenzien sind protokolliert worden.

3.2.2.1 Verwendete Reagenzien

Für den immunhistologischen Nachweis des in die DNA eingebauten BrdUs wurde ein monoklonaler Antikörper der Firma BioGenex (Ab No. M 247), gewonnen aus Mäuseaszites, verwendet. In der Produktbeschreibung des Antikörpers wird ausdrücklich eine Kreuzreaktivität mit anderen Nukleosiden ausgeschlossen.

An Nebennieren- und Darmpräparaten von Ratten, die 7 Tage lang BrdU über eine osmotische Minipumpe erhalten hatten, wurde die optimale Antikörperverdünnung von 1:100 ermittelt (Herstellerangabe 1:100-1:200).

Aus Tabelle 9 gehen die Reagenzien und Bezugsquellen für die BrdU-Färbung hervor. Weitere Reagentien sowie die verwendeten Lösungen für die immunhistologische Färbung

sind im Anhang aufgeführt.

| Reagentien | Bezugsquelle |
|---|------------------------|
| Primärer monoklonaler Antikörper: Maus Anti-BrdU | Fa. BioGenex M 247 |
| Lösung für die Verdünnung sowie Negativkontrolle: Streptavidin-Peroxidase-Verdünnungsmedium | Fa. BioGenex HK 157-5K |
| Waschlösung: OptiMax TM Wash Buffer | Fa. BioGenex HK 583-5K |
| Blockierserum, sek. Antikörper und ABC- | |
| Komplex: | |
| Normalkaninchenserum | Fa. Dako X 0902 |
| biotinyliertes Anti-Maus IgG vom Kaninchen | Fa. Dako E 0413 |
| StreptABComplex/HRP | Fa. Dako K 0377 |

<u>Tab. 9</u>: Reagentien und Bezugsquellen für die BrdU-Färbung

3.2.2.2 Biotin-Streptavidin Amplified (B-SA)-Technik

Die von GUESDON et al. (1979) und HSU et al. (1981) entwickelte immunhistologische ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex) wurde durch die Verwendung von Streptavidin statt Avidin modifiziert.

Da es sich bei Streptavidin im Gegensatz zum Avidin nicht um ein Glykoprotein handelt, wird eine unspezifische Bindungsreaktion an endogene Lektine vermieden. Zusätzlich liegt der isoelektrische Punkt von Streptavidin bei pI=5 und ist damit deutlich niedriger als der von Avidin (pI=10). Daher ist Streptavidin im neutralen Milieu weniger geladen als Avidin, was zu einer weiteren Reduktion unspezifischer Bindungen führt.

Zur Verhinderung unspezifischer Färbungen, zur Hemmung der endogenen Peroxidasen und bei der Auswahl der Kontrollen wurden die Ausführungen zur immunhistologischen Methodik von MAYERSBACH (1967) und FRITZ et al. (1985) berücksichtigt.

Färbeprotokoll

- 1. Entparaffinieren in Xylol, 2 x 5min
- 2. Rehydrieren in Iso-Propanol, 96% igem, 80% igem und 70% igem Ethanol, je 5min
- 3. Präparate in entmineralisiertem Wasser spülen, 2 x 3min
- 4. Überführen der Präparte in den Immunostainer (OptiMax plus®), Auftragen einer wasserabweisenden Linie ober-und unterhalb des Präparates mit Hilfe des Pap-Pens® (BioGenex)
- 5. Präparate mit 1% iger Proteaselösung inkubieren, 2min
- 6. Spülen mit Waschpuffer
- 7. Präparate mit 6% iger Wasserstoffperoxidlösung inkubieren, 5 min
- 8. Spülen mit Waschpuffer
- 9. Präparate mit 4N Salzsäure inkubieren, 10min
- 10. Spülen mit Waschpuffer
- 11. Präparate mit Normalserum (1:10) inkubieren, 15min
- 12. Objekte ohne Zwischenspülung dirket mit Primärantikörper bedecken und inkubieren, 30min
- 13. Spülen mit Waschpuffer
- Präparate mit biotinyliertem Sekundärantikörper (1:400) inkubieren, 20min
- 15. Spülen mit Waschpuffer
- 16. Streptavidin-Biotin-Komplex, 20min
- 17. Spülen mit Waschpuffer
- 18. Diaminobenzidinlösung, 5min
- 19. Spülen mit Waschpuffer
- 20. Überführen der Präparate aus dem Immunostainer in entmineralisiertes Wasser
- 21. Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun, 30-60sec
- 22. Bläuen in warmem Leitungswasser, 5min
- 23. Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe à 10sec, zweimal Xylol à 5min
- 24. Eindecken mit Entellan® (Merck) in dem Eindeckautomat CV5000 (Leica)

Ergebnis der Reaktion: BrdU-positive Zellkerne sind braungefärbt.

"Immunostainer"

3.2.2.3 Methodische Kontrollen

Jedes Nebennierenpräparat wies zusätzlich einen Darmabschnitt als Positivkontrolle auf. Da der Darmtrakt ein Organ mit einem sehr hohen Zellturnover ist, sollte nach einer 7-tägigen BrdU-Applikation jede Darmepithelzelle dieses Thymidinanalog aufweisen.

Parallel zu jeder gefärbten Serie wurde eine Negativkontrolle angefertigt, d.h. der BrdU-Antikörper wurde durch das Verdünnungsmedium ersetzt, um die Reaktionsspezifität in jeder Serie zu gewährleisten. In Vorversuchen wurde die spezifische Reaktion des Antikörpers detaillierter untersucht. Unspezifische Reaktionen können aufgrund von ungewünschter Antigen-Antikörperreaktion, Proteinbindung, Substratniederschlägen, avidin-bzw. biotinbindenden Gewebsbestandteilen oder durch Pigmente zustandekommen.

Daher wurden folgende Schritte zur Feststellung der Reaktionsspezifität unternommen:

- Ersatz des primären Antikörpers durch Normalserum der gleichen Tierart, aus der auch der primäre Antikörper gewonnen wurde
- Ersatz des sekundären Antikörpers durch "Non-Immunserum"
- Inkubation nur mit dem Streptavidin-Biotin-Komplex
- Inkubation nur mit der Substratlösung

3.2.3 TUNEL-Methodik

Von jeder Ratte wurde ein Präparat der linken Nebenniere verwendet. Die Durchführung des Färbeprotokolls erfolgte in dem Histo-Inkubator (Mikrom), da für zwei der Arbeitsschritte eine Inkubation bei 37°C vorgesehen ist.

Zur Anwendung gelangte der "In Situ Apoptosis Detection Kit, POD" von Boehringer Mannheim. Dieser Kit setzt sich zusammen aus der Enzymlösung ("Enzyme Solution"), welche die Terminale Desoxynucleotidyl Transferase (TdT) enthält, der Markierungslösung ("Label Solution") mit Fluoreszein-markierten Nukleotiden, sowie dem Anti-Fluoreszein Antikörper welcher mit Peroxidase konjugiert ist ("Converter-POD").

Die Enzymlösung wird kurz vor dem Aufbringen auf die Präparate mit der Markierungslösung gemischt und ergibt dann die sogenannte "TUNEL reaction mixture". Das TdT-Enzym katalysiert während der anschließenden Inkubation den Einbau der markierten Nukleotide an den 3'-OH Enden vorhandener DNA-Fragmente. Anschließend detektiert der mit POD gekoppelte Anti-Fluoreszein-Antikörper die gebundenen Nukleotide. 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) reagiert unter Peroxidase-Einfluss mit H₂O₂ zu einem braunen Präzipitat. In Vorversuchen wurde die optimale Verdünnung des TdT-Enzyms mit der Markierungslösung von 12,4µl zu 450µl ermittelt. Dies entspricht einem Viertel der Konzentration des TdT-Enzyms, welche in der Produktbeschreibung von Boehringer Mannheim (Instruction Manual; Version 4, May 1998) angegeben wird. Bei der empfohlenen Konzentration von 50µl TdT-Enzym in 450µl Markierungslösung ergab sich eine Anfärbung nahezu aller und insbesondere auch morphologisch unveränderter Zellen, welche bei der gewählten Konzentration von 12,4µl nicht mehr auftrat. Laut KOCKX et al. (1998) und WIJSMAN et al. (1993) können falsch positive Ergebnisse insbesondere auf einer zu hohen Konzentration des verwendeten TdT-Enzyms beruhen und daher durch entsprechende Verdünnungsreihen vermieden werden. Auch in der Produktbeschreibung von Boehringer Mannheim wird eine Verdünnung des TdT-Enzyms bei auftretenden falsch positiven Signalen vorgeschlagen.

Als methodische Positivkontrolle diente eine 10minütige Inkubation mit DNAse I (1mg/ml Aqua bidest). Da hierdurch in jeder Zelle DNA-Strangbrüche hervorgerufen werden, konnte anschließend die für eine Anfärbung aller Zellkerne notwendige Proteinase K-Konzentration ermittelt werden. Ein optimales Färberesultat war bei 20µg/ml PBS-Puffer (pH 7,2; 0,01M) festzustellen.

Von der "TUNEL reaction mixture" und dem Anti-Fluoreszein Antikörper wurden jeweils 42µl pro Schnitt verwendet. Aufgrund dieser geringen Menge und der Inkubation bei 37°C wurden die Präparate mit sogenannten "Plastic Coverslips" (Oncor Appligene) bedeckt. Zum einen ermöglicht die Verwendung dieser Schutzfolien eine gleichmäßige Verteilung der Reagenzien auf dem Präparat, zum anderen wird hierdurch ein Austrocknen der Schnitte verhindert.

Die Inkubation mit 3% iger H_20_2 -Lösung zur Blockierung der endogenene Peroxidase wurde nach der Inkubation mit der "TUNEL reaction mixture" vorgenommen, da hierduch eine Markierung der unter Umständen durch die H_20_2 -Behandlung entstehenden DNA-Strangbrüche umgangen wird.

Färbeprotokoll

- 1. Entparaffinieren in Xylol, 2 x 5min
- 2. Rehydrieren in Ispopropanol, 96% igem, 80% igem und 70% igem Ethanol, je 5min
- 3. Präparate in entmineralisiertem Wasser spülen, 2 x 3min
- 4. Präparate in PBS-Puffer spülen, 5min
- 5. Präpare in Proteinase K-Lösung (20µg/ml PBS-Puffer) bei Raumtemperatur inkubieren, 15min

"Histo-Inkubator"

- 6. Spülen mit entmineralisiertem Wasser und PBS-Puffer
- 7. Überführen der Präparte in den Histo-Inkubator (Mikrom), Auftragen einer wasserabweisenden Linie ober- und unterhalb des Präparates mit Hilfe des Pap-Pens® (BioGenex)
- 8. Inkubation mit TUNEL reaction mixture unter Verwendung von Schutzfolie ("Plastic Coverslips"), 1 Stunde bei 37°C
- 9. Absaugen der "TUNEL reaction mixture" und dreimaliges Spülen mit PBS-Puffer
- Inkubation mit 3%iger H₂0₂ (in PBS-Puffer) bei Raumtemperatur, 5min
- 11. Spülen mit entmineralisiertem Wasser und PBS-Puffer
- 12. Inkubation mit POD-gekoppeltem anti-Fluoreszein-Antikörper unter Verwendung von Schutzfolie ("Plastic Coverslips"), 30min bei 37°C
- 13. Absaugen des POD-gekoppeltem anti-Fluoreszein-Antikörpers und Spülen mit PBS-Puffer
- 14. Überführen in eine Küvette mit PBS-Puffer
- 15. Inkubation mit DAB-Lösung unter mikroskopischer Kontrolle, 2-4min
- 16. Spülen mit PBS-Puffer und entmineralisiertem Wasser
- Gegenfärbung mit Hämalaun, 30sec 1min; Bläuen in fließendem Leitungswasser, 5min
- 18. Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe à 10sec, zweimal Xylol à 5min
- 19. Eindecken mit Entellan® (Merck) in dem Eindeckautomat CV5000 (Leica)

3.2.3.1 Methodische Kontrollen

In Vorversuchen wurde die Spezifität der Reaktion an Milchdrüsengewebe der Ratte in der Involution getestet (Oncor Appligene S7115). Darüber hinaus wurden Thymus, Milz, Ovar und Leber von Ratten untersucht. Hierbei zeigten sich zum einen TUNEL-positive Zellen mit typischer, der Apoptose entsprechender Morphologie, zum anderen Zellen, welche ebenfalls TUNEL-positiv waren, aber keine für Apoptose typische Morphologie aufwiesen. Solche Zellen wurden nach GAVRIELI et al. (1992) als präapoptotische Stadien gewertet.

Im Hauptversuch wurde in jeder Färbereihe eine Negativkontrolle durch Aussparen der "TUNEL reaction mixture" angefertigt. Zusätzlich wurde eine Positivkontrolle durch Behandlung mit DNAse I (1mg/ml Aqua bidest, 10min bei Raumtemperatur) angefertigt. Für die Positivkontrolle wurden gesonderte Küvetten für die Waschschritte verwendet, um einen Kontakt der übrigen Schnitte mit DNAse I ausschließen zu können.

3.3 Histometrische Untersuchungen

3.3.1 Methodenetablierung (Vorversuch)

Archivmaterial der BASF sollte neben der Etablierung einer Auszählstrategie für die Nebennierenrinde vor allem Aufschluß darüber geben, wie lange die Tiere im Hauptversuch mit BrdU exponiert werden müssen, um für eine statistische Auswertung eine ausreichende Zellkernzahl zu markieren.

3.3.1.1 Material und Fragestellungen

Nebennieren von Ratten, denen über einen Zeitraum von 3 oder 7 Tagen BrdU mit Hilfe von osmotischen Minipumpen (Alzet, Model 2ML1) zugeführt wurde, wurden immunhistologisch und histometrisch untersucht (3 Weibchen und 5 Männchen des Stammes Wistar-Thomae erhielten über 3 Tage BrdU und waren zum Zeitpunkt der Tötung ca. 17 Wochen alt; 4 männliche Wistar-Ratten erhielten BrdU über 7 Tage und waren zum Tötungszeitpunkt ca. 11 Wochen alt).

Anhand dieses Matrials sollten folgende **Kernfragen** zur histometrischen Meßstrategie beantwortet werden:

- welche BrdU-Expositionszeit soll für die Nebenniere im Hauptversuch angewendet werden?
- wie viele Tiere sollen für eine möglichst genaue statistisch Aussage je Dosisgruppe eingesetzt werden?
- wie viele Präparate der Nebennieren sind pro Tier auszuwerten?
- wie viele unabhängige Zählungen ("wiederholte Auswertungen") sind in einem einzelnen Präparat notwendig?
- wie viele Zellkerne müssen in einem einzelnen Präparat ausgezählt werden, um einen Meßwert zu erhalten, der dem "wahren Meßwert" möglichst nahe kommt?
- wie sollen, unter Berücksichtigung des zonalen Aufbaus der Nebenniere, die Meßareale in einem Präparat verteilt werden?

3.3.1.2 Zonale Unterteilung der Nebennierenrinde

Es wurde eine getrennte Auszählung der Zellkerne der drei verschiedenen Zonen der Nebennierenrinde vorgenommen, da diese sich nicht nur morphologisch und funktionell, sondern auch hinsichtlich ihrer Zellteilungsaktivität grundsätzlich unterscheiden. Lediglich morphologische Kriterien wurden für die Zuordnung zu den verschiedenen Kompartimenten herangezogen, so daß sich insbesondere am Übergang zwischen Zona glomerulosa und Zona fasciculata ein nicht völlig auszuschließender "Zuordnungsfehler" ergibt. Durch die Einhaltung eines Sicherheitsabstandes zwischen diesen beiden Zonen wurde zumindest eine doppelte Auszählung von Zellkernen in diesem Bereich vermieden.

3.3.1.3 Ermittlung des "Labeling Index"

Der "Labeling Index" (LI) ist ein prozentuales Maß für den Anteil markierter Zellen (im Falle von BrdU immunhistologisch markierte Zellkerne) in einer Zellpopulation. Er errechnet sich nach der folgenden Formel (JONES und CLARKE, 1993):

$$LI(\%) = \frac{a}{a+b} x100$$

a = markierte Zellkerne

b = unmarkierte (gegengefärbte) Zellkerne

In Bezug auf BrdU ist der Labeling-Index auch ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, mit der eine Zelle in die S-Phase tritt, wenn dieses Thymidinanalog im Überschuß zur Verfügung steht (MORRIS, 1993).

Die Variabilität oder Streuung zwischen Meßergebnissen läßt sich am einfachsten dadurch verringern, daß die Anzahl der ausgezählten Zellkerne erhöht wird (MORRIS, 1993). Dies ist insbesondere dann zutreffend, wenn der LI des untersuchten Gewebes klein ist. Diese Regel folgt keiner linearen Funktion, d.h. eine Verdreifachung der ausgezählten Zellkerne bewirkt nicht eine dreifach niedrigere Streuung. Die anfangs deutliche Streuungsminderung durch die Auswertung vieler Zellkerne ist ab einer bestimmten Anzahl ausgezählter Zellkerne kaum noch feststellbar.

Wie von MORRIS (1993) im weiteren darstellt wird, kann dann eine weitere Reduzierung der Streuung nur noch durch eine Erhöhung der untersuchten Tierzahl bewirkt werden.

3.3.1.4 Art und Dauer der BrdU Exposition

GOLDSWORTHY et al. (1993) führen aus, daß der Einsatz einer osmotischen Minipumpe für Gewebe mit einer geringen "Turnover-Rate" die Methode der Wahl darstelle. Alle Zellen, die während der Pumpenimplantation in die S-Phase eintreten, werden markiert. Aufgrund dieser Summation über ein entsprechendes Zeitfenster wirken sich beispielsweise diurnale Variationen der Zellproliferation minimal auf den LI aus. Außerdem ist es durch diese kontinuierliche Applikation des Proliferationsmarkers möglich, auch geringe Veränderungen der Anzahl von Zellen in der S-Phase zu detektieren.

Eine einmalige Zufuhr von BrdU ("Pulse Labeling"), bzw. die wiederholte Einzelapplikation hat außerdem den Nachteil, daß mehr Zellen eine nur schwach positive Färbung aufweisen, da hierbei BrdU nur über einen kurzen Zeitraum für den Einbau in die DNA zur Verfügung steht (GOLDSWORTHY et al., 1991).

Der LI soll bei unbehandelten Tieren eine möglichst geringe Streuung aufweisen und darf daher, nicht zu klein sein (MORRIS, 1993). Weiterhin soll die Detektion einer geringen, ca. 7-10-fachen Proliferationssteigerung mit diesem System möglich sein. Dies führt zu einem angestrebten Kontrollwert von ca. 10-15% BrdU-positiven Zellkernen.

Zunächst wurden Präparate von Ratten, die 3 Tage lang BrdU erhalten hatten, ausgewertet. Der Prozentsatz markierter Zellen lag deutlich unterhalb des angestrebten Referenzwertes von 10-15% (ca. 5% für die Zona glomerulosa, bzw. 4% für die Zona fasciculata). Alle weiteren Vorversuchsmessungen wurden daher an den Präparaten der "7-Tage-Tiere" vorgenommen. Von diesen Nebennieren wurden je 2 Ebenen ausgewertet. Pro Präparat wurden jeweils 2 voneinander unabhängige Zählungen, das heißt Zählungen in unterschiedlichen Arealen vorgenommen.

3.3.1.5 Kriterien für die Zellkernzählung

Es wurden nur Zellkerne ausgezählt, die eine runde Kernkontur aufwiesen, und damit eindeutig als Parenchymzellkerne erkannt werden konnten (KATAOKA et al., 1996). Die schmaleren Fibroblasten- und Endothelzellkerne wurden somit nicht ausgezählt.

Nach GOLDSWORTHY et al. (1991) kann eine graduierte Anfärbung positiv markierter Zellkerne, eine eindeutige Entscheidung in Richtung positiv oder negativ in einigen Fällen erschweren, da Zellkerne unter Umständen nicht während ihrer gesamten S-Phase BrdU für den Einbau in ihre DNA zur Verfügung haben. Zu Beginn der Auszählung wurde daher festgelegt, daß schwach braun gefärbte Zellkerne, ungleichmäßig oder nur teilweise angefärbte Zellkerne und solche, die nur einen braunen Zellkernrand aufweisen, zu den BrdUpositiven Zellkernen gerechnet werden. Auch hier wurden nur solche Zellkerne ausgewertet, die eindeutig als Parenchymzellkerne identifiziert werden konnten.

3.3.1.6 Auszählung mit Hilfe eines Okularrasters

Mit dem Okularraster L4330, 19mm der Firma Plano wurden Zellkerne in dem Raster sowie diejenigen auf der rechten bzw. unteren Linienbegrenzung der einzelnen Rasterfelder gezählt. Solche, die auf der linken bzw. oberen Linienbegrenzung eines Rasters lagen, wurden nicht ausgezählt.

3.3.1.7 Wahl der auszuwertenden Rasterflächen

Als erstes wurden auf dem auszuwertenden Präparat mit einem feinschreibenden wasserfesten Stift fünf Punkte direkt an den Rand der Nebennierenkapsel aufgetragen, so daß diese dann mit möglichst gleichmäßigen Abständen verteilt lagen (Abb. 2).





(Glo = Zona glomerulosa; Fasc = Zona fasciculata; Ret = Zona reticularis; M = Medulla)

Nun wurde das Präparat unter dem Mikroskop mit 400facher Vergrößerung betrachtet und die erste Markierung aufgesucht. Von dem seitlichen Rand des Punktes wurde ein zum Kapselverlauf der Nebenniere gedachtes Lot (Abb. 2) gefällt und die Rasterfläche so in den Bereich der Zona glomerulosa plaziert, daß möglichst viele Glomerulosazellen in diesem lagen. Dieses Raster wurde als erstes ausgezählt, und zwar nur die Rasterfelder, die vollständig in der Zona glomerulosa lagen (in den meisten Fällen Reihen A-C).

Anschließend wurde das nächste Gesichtsfeld aufgesucht, das genau senkrecht zum Kapselverlauf unter dem ersten Gesichtsfeld lag. Dabei wurde ein "Sicherheitsabstand" von ca. einem Raster eingehalten. In diesem zweiten Gesichtsfeld wurden die Zellkerne im Bereich der (äußeren) Zona fasciculata in dem gesamten Raster ausgezählt.

Identisch wurde auf der anderen Seite des Punktes verfahren und ebenso an allen weiteren vier Punkten. Somit wurden für die Zona glomerulosa und die Zona fasciculata jeweils 10 Raster ausgewertet, wobei die Rasterfläche für die Zona glomerulosa meist nur die Reihen A-C umfaßte, während für die Zona fasciculata die gesamte Rasterfläche ausgewertet werden konnte.

Pro Teilraster fanden sich in der Zona glomerulosa (Reihen A-C; entspricht 30 Einzelrasterfeldern) ca. 100 Zellkerne, in der Zona fasciculata (Reihen A-J; entspricht 100 Einzelrasterfeldern) ca. 200 Zellkerne. Dies resultiert bei 10 ausgewerteten Arealen für die Zona glomerulosa in ca. 1000 ausgezählten Zellkernen bzw. ca. 2000 Zellkernen für die Zona fasciculata je Präparat.

3.3.1.8 Korrekturen

Die absoluten Zelldichten werden durch qualitative Unterschiede im untersuchten Gewebe beeinflußt. Beispielsweise können interstitielle Veränderungen wie Ödeme, Blutungen und Fibrosen, aber auch Artefakte (Schrumpfung, Zellvereinzelung etc.), die Anzahl der Zellkerne pro Quadratmillimeter schwanken lassen.

Durch die Ermittlung eines Quotienten aus markierten zu insgesamt ausgezählten Zellkernen je Präparat (LI) umgeht man die Notwendigkeit, die Vergleichbarkeit der tatsächlichen Zelldichten zu garantieren oder Korrekturen vornehmen zu müssen. Die Präparate sollten jedoch gleich dick geschnitten werden und zusätzlich eine möglichst geringe Schnittdicke aufweisen, damit nicht über den Holmes-Effekt (WEIBEL, 1979) eine falsch höhere Zelldichte ermittelt wird. Diese Fehlerquelle wurde dadurch umgangen, daß möglichst dünne Präparate mit einer Dicke von etwa 4µm geschnitten wurden und nur solche Zellkerne, die einen deutlichen Kernanschnitt aufwiesen, ausgezählt wurden. Durch diese Maßnahmen

wurde der Auswertungsfehler, der durch das Verhältnis Strukturgröße zu Schnittdicke bestimmt wird (HAUG, 1967), so weit reduziert, daß auf eine rechnerische Fehlerkorrektur verzichtet werden konnte. Es war also nicht notwendig, bei den hier gewonnenen Daten Korrekturen in Bezug auf die Schnittdicke, Schnittkompression und Gewebeschrumpfung vorzunehmen.

3.3.1.9 Statistische Analyse der Variabilitätsfaktoren

Die Meßwertvariabilität wird durch folgende Einflußgrößen bestimmt: die Tiere, die Präparate, die Auswertungen und die ausgewerteten Areale in einem Präparat.

Zur Quantifizierung der Variabilität der Einzelwerte wurde die Varianz als Streuungskenngröße berechnet. Um die Bedeutung des jeweiligen Einzelfaktors auf die gesamte Meßwertvariabilität mathematisch feststellen zu können, wurde für die Zona glomerulosa und die Zona fasciculata getrennt ein hierarchisches Varianzkomponentenmodell angewendet.

Die folgende Formel wurde zur Durchführung des hierarchischen Varianzkomponentenmodells eingesetzt:

> LI = y_{ijkl}= Tier_i + Präp (Tier)_{ij} + Ausw (Präp Tier)_{ijk} + Areal (Ausw Präp Tier)_{ijkl} Formel 3.3.1.9 a

| i=1,I=4 | Tiere |
|-----------|-----------------------------|
| j=1,J=2 | Präparate (= Schhnittebene) |
| k=1,K=2 | Auswertungen |
| l=1,L=10, | Areale je Auswertung |

Pro Tier wurden in diesem Versuch 2 Präparate (J=2) und pro Präparat wurden 2 Auswertungen (K=2) durchgeführt. Pro Auswertung wurden 10 zufällig ausgewählte Areale (L=10) ausgezählt. Mit dem Statistikprogramm SAS wurde die Varianzanalyse durchgeführt. Nach stastischer Berechnung der Schätzer für die Varianz jedes Einzelfaktors kann anhand der folgenden Formel der Schätzer für die Varianz des Mittelwertes (σ_x^2) berechnet werden. Dieser erlaubt eine Vorhersage der Varianz des Mittelwertes in der unbekannten Grundgesamtheit.

$$\sigma_X^2 = \frac{\sigma_{Tier}^2}{I} + \frac{\sigma_{Pr\,\ddot{a}p}^2}{I*J} + \frac{\sigma_{Ausw}^2}{I*J*K} + \frac{\sigma_{Areal}^2}{I*J*K*L}$$
 Formel 3.3.1.9 b

Für ein einzelnes Tier berechnet sich der Schätzer für die Varianz des Mittelwertes demnach folgendermaßen (I=1):

$$\sigma_X^2 = \frac{\sigma_{Tier}^2}{1} + \frac{\sigma_{Pr\,\ddot{a}p}^2}{J} + \frac{\sigma_{Ausw}^2}{J*K} + \frac{\sigma_{Areal}^2}{J*K*L}$$
 Formel 3.3.1.9 c

Nach der statistischen Ermittlung der Varianz jedes Einzelfaktors kann mit dieser Formel berechnet werden, welche Einflußgröße in ihrer Anzahl variiert werden sollte, um die Varianz des Mittelwertes bei vertretbarem Arbeitsaufwand möglichst gering zu halten.

3.3.2 Hauptversuch

Die Auszählung der immunhistologischen Präparate des Hauptversuches (BrdU-Immunhistologie und TUNEL-Methodik) erfolgte interaktiv mit dem Bildanalysesystem KS 400 der Firma Zeiss. Dieses setzt sich zusammen aus

- einem Mikroskop (Zeiss) mit Steuertisch und angeschlossener Kamera

- einem Rechner (Siemens) mit KS 400-Software, Monitor, Tastatur, Maus

Das Objekt wurde über Kamera und Rechner auf den Monitor projeziert. Die Auswertung erfolgte interaktiv durch Akzeptanz bzw. Korrektur der von dem Programm markierten Zellkerne bevor die Zellzahlen und Flächenangaben tabelliert gespeichert wurden.

Die Gesamtvergrößerung des Objektes errechnet sich aus dem Produkt des Objektives (40x) und des Tubulusfaktors (10x). Daraus ergibt sich eine 400fache Gesamtvergrößerung.

3.3.2.1 Auswertung der BrdU-Immunhistologie

Für die Kontrollgruppe sind linke und rechte Nebenniere ausgewertet worden, bei den übrigen Gruppen lediglich die linke Nebenniere. Die Auswertung erfolgte unter Berücksichtigung der zonalen Unterteilung der Nebennierenrinde. Zona glomerulosa, Zona fasciculata und Zona reticularis wurden daher getrennt ausgezählt. Für die Zona fasciculata wurde das gesamte, auf den Monitor übertragene Meßfeld, mit einer konstanten Flächengröße von 45240,24µm² ausgewertet. Das Meßfeld wurde an der Grenze zur Zona glomerulosa plaziert.

Die Zona glomerulosa wurde mit Hilfe der Markierungsfunktion umrandet, da sie nicht die gesamte Meßbildgröße ausmacht. Hierbei diente die unterschiedliche Morphologie im

Vergleich zu Zona fasciculata-Zellen als Kriterium für die innere Grenze, sowie der Übergang zur Kapsel als Kriterium für die äußere Grenze. Die Zona reticularis schließlich wurde von den benachbarten Markzellen mit Hilfe der Markierungsfunktion abgegrenzt.

Die Auswahl der Meßfelder erfolgte zufällig, unter "blinder" Bewegung des Objekttisches zum nächsten Areal.

Bereiche mit Gewebeartefakten wurden nicht ausgewertet, stattdessen die unmittelbar daran anschließende intakte Zone. Abwechselnd wurden jeweils 2 Messungen in der Zona glomerulosa (unmittelbar benachbart) sowie zwei Messungen in der Zona fasciculata (1. Messung an das letzte Meßfeld der Zona glomerulosa angrenzend, 2. Messung mit Abstand vom ersten Zona fasciculata-Meßfeld) vorgenommen, bis für jede dieser Zonen 1000 Zellkerne gezählt worden waren.

Anschließend wurde die Zona reticularis an der Mark-Rindengrenze ausgewertet, bis ebenfalls 1000 Zellen ausgezählt worden waren. Die Meßfelder wurden hierbei so gewählt, daß ein Meßfeldrand durchgehend von Markzellen gebildet wurde, um eine willkürliche Verschiebung des Meßfeldes Richtung Peripherie zu verhindern.

Dies erschien insbesondere deshalb sinnvoll, da viele positive Zellkerne unmittelbar an der Markgrenze vorgefunden wurden und nur wenige am Übergang zur Zona fasiculata. Eine nicht eindeutig definierte Plazierung des Meßfeldes führt daher bei Einbeziehung vieler zur Peripherie hin liegender, BrdU-negativer Zellen zu einer Verringerung des "Labeling Index".

3.3.2.2 Auswertung der TUNEL-Methodik

Entsprechend der Auswertung der BrdU-Immunhistologie wurde auch für die TUNEL-Methodik verfahren, d.h. es wurde eine getrennte Auswertung der Zona glomerulosa, Zona fasciculata und Zona reticularis durchgeführt.

Hilfe Gesamtfläche Mit der Umrandungsfunktion wurde die des jeweiligen Nebennierenpräparates bestimmt, anschließend die Fläche (in µm²) der Zona glomerulosa, Zona fasciculata und Zona reticularis. Anhand dieser Flächenangaben konnte mit Hilfe der Ergebnisse der BrdU-Immunhistologieauswertung die ungefähre Anzahl der Gesamtzellkerne in jeder Zone errechnet werden. Bei der Auswertung der BrdU-immunhistologischen Präparate wurden alle Zellkerne in einem definierten Areal ausgezählt und zusätzlich die Fläche dieses Areals automatisch vermessen. Da hierdurch die Zellkernanzahl in einem definierten Areal bekannt ist, kann nach Ermittlung der Gesamtfläche einer Zone auch die ungefähre Gesamtzellkernanzahl in dieser Zone errechnet werden (bei angenommener etwa gleicher Zellkerndichte in zwei verschiedenen Präparaten desselben Tieres).
Da insgesamt pro Präparat nur sehr wenig TUNEL-positive Zellen festgestellt wurden, ist die "wahre" Gesamtanzahl der Zellen pro Zone bei Berechnung des "Apoptotic Index" nicht unbedingt erfoderlich. Beispielsweise ergibt sich bei einer Gesamtanzahl von 10 TUNELpositiven Zellen in einem Präparat bei Berechnung des "Apoptotic Index" kaum ein Unterschied ob beispielsweise 10 000 oder 12 000 Zellen insgesamt vorhanden sind. Im ersten Fall resultierte ein Apoptotic Index von 0,001, im zweiten Fall von 0,00083 (Unterschied von 0,00017%).

3.3.2.3 Kriterien für die Zellkernzählung

BrdU-Immunhistologie: Nur Parenchymzellkerne wurden bei der Auswertung berücksichtigt, Endothelzellkerne wurden nicht mitgezählt. Bei nicht eindeutig möglicher Zuordnung zu einem dieser beiden Zellkerntypen wurden die Zellkerne als Parenchymzellkerne gewertet.

TUNEL-Methodik: Neben den eine typische apoptotische Morphologie aufweisenden Zellen (kondensierter, teilweise fragmentierter Zellkern), wurden auch "normal" geformte, intensiv TUNEL-positive Zellen mitgezählt. Solche Zellen befinden sich laut GAVRIELI et al. (1992) in einer präapoptotischen Phase, d.h. sie weisen bereits DNA-Strangbrüche auf, ohne daß die typische Morphologie apoptotischer Zellen erkennbar wäre. In einem immunhistologischen Präparat geht bei alleiniger Hämalaun-Kerngegenfärbung ein wichtiges Kriterium für apoptotische Zellen bei HE-Färbung verloren: die starke Eosinopilie des kondensierten Zytoplasmas. Andererseits wird gerade durch die Immunhistologie eine deutliche Erleichterung bei der Auffindung "mutmaßlich" apoptotischer Zellen erzielt. Da in Vorversuchen immer wieder auch TUNEL-positive Zellen ohne typische Morphologie zusammen mit TUNEL-positiven Zellen mit typischer Morphologie auffraten (soweit dies in einem nicht HE gefärbten Schnitt beurteilbar ist), in der Negativkontrolle dagegen keinerlei Signal festgestellt werden konnte, spricht dies für eine Spezifität der TUNEL-Reaktion.

Da die Apoptose ursprünglich anhand ihrer Morphologie definiert wurde (WYLLIE et al. 1973a,b), wird bei der Auswertung ausdrücklich lediglich von TUNEL-positiven Zellen gesprochen.

Bei dicht beieinander liegenden TUNEL-positiven apoptotischen Körperchen wurden diese als ursprünglich von einer Zelle abstammend betrachtet und daher nur als ein TUNELpositives "Ereignis" gezählt.

3.4 Statistische Auswertung

Die Datenhaltung und -auswertung erfolgte im Institut für Biometrie der Merck KGaA.

Zur statistischen Prüfung von Gruppenunterschieden (unterschiedliche Prüfsubstanzen, Dosierungen und Dauer der Exposition) sowie der Lokalisation der Meßfelder wurde eine dreifaktorielle Varianzanalyse durchgeführt. Da statistisch signifikante Unterschiede und Wechselwirkungen auftraten, wurden die verschiedenen Behandlungsgruppen mit den jeweiligen Kontrollen im Anschluß paarweise getrennt mit dem exakten 2-Stichproben Wilcoxon Test verglichen.

3.4.1 BrdU-Immunhistologie und TUNEL-Methodik

Für jedes Tier wurde die Anzahl BrdU-positiver sowie gegengefärbter Zellkerne pro Messfeld bestimmt. Aus diesen Werten wurde durch Aufsummation der **"Labeling Index"** pro Zone berechnet. Die **Anzahl der Kerne pro Fläche** (μ m²) wurde berechnet durch Gesamtanzahl Kerne/Summe der Messfeldflächen je Zone.

Für diese Variabeln wurden nach Gruppe, Zone, Meßtag und Seite getrennt die folgenden Parameter bestimmt:

| Ν | Anzahl Tiere |
|---------|--|
| Mean | Mittelwerte |
| Median | Median |
| GeoMean | geometrischer Mittelwert |
| SD | Standardabweichung |
| Wil | Signifikanzzeichen für den exakten 2-Stichproben Wilcoxon Test |
| | +++ signifikant ($p \le 0.001$) |
| | ++ signifikant ($p \le 0.01$) |
| | + signifikant ($p \le 0.05$) |

- nicht signifikant (p > 0.05)

Der Wilcoxon-Test ist ein nicht-parametrischer Test, mit dem die "Labeling-Indizes" einer Dosisgruppe mit denen der zugehörigen Kontrollgruppe verglichen und auf Signifikanzen überprüft wurden. Im zweiseitigen Test wurden sowohl Abweichungen nach oben als auch nach unten berücksichtigt.

Zusätzlich wurden die Ergebnisse des exakten 2-seitigen 2-Stichproben Wilcoxon Tests für den Vergleich von Woche 1 gegenüber Woche 4 jeder Gruppe berechnet.

Zum links/rechts Vergleich wurde der exakte 2-seitige Vorzeichen-Rang Test von Wilcoxon durchgeführt. Auf eine Adjustierung der p-Werte wurde verzichtet. Die Signifikanzzeichen entsprechen denen des exakten 2-Stichproben Wilcoxon Tests.

3.4.2 Klinische Parameter

Für den Vergleich der Organ- und Körpergewichte, des Futterverbrauchs sowie der ACTHund Kortikosteronblutkonzentrationen fand der Dunnett-Test Anwendung. Dies ist ein parametrischer Test, der einen simultanen Vergleich der Dosisgruppe mit der Kontrollgruppe auf Gleichheit der Mittelwerte durchführt. Im zweiseitigen Test wurden sowohl Abweichungen nach oben als auch nach unten berücksichtigt.

4. ERGEBNISSE

In dem nachfolgenden Ergebnisteil wird der Übersichtlichkeit halber die Gruppe mit niedriger Exposition mit der EMD-Substanz (1mg/kg) als "Low Dose" bezeichnet, diejenige mit hoher Exposition (125mg/kg) als "High Dose".

4.1 Körpergewichte

4.1.1 Körpergewichtsentwicklung und Futterverbrauch

Die Körpergewichtsentwicklung zeigt bereits nach einwöchiger Behandlung eine statistisch signifikante Reduktion ($p \le 0.001$; Dunnetts-Test, zweiseitig) in der ACTH-, Dexamethason-"High Dose"-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe. Diese verminderte und Gewichtszunahme wird mit der Zeit noch deutlicher und ist zum Versuchsende am ausgeprägtesten. Die "Low Dose"-Gruppe zeigt zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Abweichung gegenüber Kontrollwerten. In Abbildung 3 und Tabelle 10 wird die Körpergewichtsentwicklung anhand eines Punktdiagramms mit den Mittelwerten der jeweiligen Behandlungsgruppe dargestellt. An Tag 0 und an Tag 7 werden die Werte von allen Tieren zusammengefaßt, danach ermitteln sich die Werte aus den jeweils 10 Tieren der Woche 4-Gruppe.



Abb. 3: Körpergewichtsentwicklung, Mittelwerte in Gramm

• ● • • Kontrolle • • 🖬 • • ACTH • • △ • • Dexa • • ★ • • "Low Dose" • • ★ • • "High Dose"

Tab.10: Körpergewichtsentwicklung, Mittelwerte in Gramm ± Standardabweichung

| Gruppe | Tag 0 | Tag 7 | Tag 14 | Tag 21 | Tag 28 |
|-------------------|-------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Kontrolle | 256,6±8,5 | 291,6±11,9 | 318,8 ± 18,4 | 341,2 ± 17,9 | 365,3 ± 18,9 |
| АСТН | 252,6 ± 7,3 | 276,5*** ± 18,9 | 286,5*** ± 18,9 | 294,9*** ± 25,0 | 307,7*** ± 26,2 |
| Dexa- methason | 253,1 ± 8,6 | 270,5***±12,7 | 283,2*** ± 16,7 | 295,9***±15,7 | 311,7***±17,7 |
| Low Dose | 262,3 ± 8,5 | 291,1 ± 13,4 | 313,3 ± 22,0 | 334,8 ± 26,1 | 354,8 ± 30,7 |
| High Dose | 260,9 ± 8,2 | 268,1*** ± 10,0 | 280,1*** ± 12,3 | 292,5*** ± 17,8 | 313,8*** ± 17,6 |

Dunnetts Test (2-seitig), *** = $p \le 0,001$

Futterverbrauch

Abbildung 4 und Tabelle 11 zeigt die Mittelwerte des Futterverbrauchs der jeweiligen Behandlungsgruppen zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten. Die ACTH-Gruppe zeigt an Tag 14, 21 und 28 eine Reduktion des Futterverbrauchs, welche insbesondere in den ersten 14 Tagen weniger stark ausgeprägt ist (kein Effekt an Tag 7; $p \le 0,05$ an Tag 14; $p \le 0,01$ an Tag 21 und an Tag 28). Dexamethason reduziert zu allen Zeitpunkten deutlich den Futterverbrauch ($p \le 0,001$). Die "Low Dose" Gruppe zeigt keine Veränderung des Futterverbrauchs. In der "High Dose" Gruppe wird an Tag 7 die ausgeprägteste Reduktion des Futterverbrauches festgestellt. An Tag 14 und 21 entspricht sie in etwa den in der Dexamethason-Gruppe beobachteten Werten und weist an Tag 28 gegenüber der Kontrolle keine statistisch signifikante Abweichung mehr auf.





| Gruppe | Tag 7 | Tag 14 | Tag 21 | Tag 28 |
|-----------|-----------------|-----------------|----------------|------------------|
| Kontrolle | 23,30 ± 1,69 | 23,98 ± 1,94 | 23,47 ± 1,87 | 22,58 ± 1,22 |
| АСТН | 23,01 ± 1,72 | 21,32*±2,58 | 19,97**±2,63 | 19,79**±2,41 |
| Dexameth. | 21,31*** ± 1,36 | 20,55*** ± 1,01 | 19,73***±1,27 | 19,18*** ± 1,11 |
| Low Dose | 23,45 ± 2,08 | 23,17 ± 2,26 | 23,11 ± 2,29 | 22,87 ± 2,48 |
| High Dose | 18,16***±1,17 | 20,13*** ± 1,15 | 19,98** ± 1,74 | $21,17 \pm 1,70$ |

<u>Tab. 11</u>: Futterverbrauch, Mittelwerte in Gramm pro Tag \pm Standardabweichung

Dunnetts Test (2-seitig), $* = p \le 0.05$, $** = p \le 0.01$, $*** = p \le 0.001$

4.1.2 Terminale Körpergewichte, Woche 1

Die terminalen Körpergewichte der Kontrolltiere lagen nach einwöchiger Versuchsdauer bei $249g \pm 10g$. In der ACTH-Gruppe ($244g \pm 11g$) und der "Low Dose"-Gruppe ($252g \pm 10g$) wurde gegenüber den Kontrolltieren kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt. Eine statistisch signifikante Verminderung des Körpergewichts zeigt sich nach Dexamethason-Behandlung ($237g \pm 11g$) und in der "High Dose"-Gruppe ($233g \pm 7g$). In der Dexamethason-Gruppe beträgt diese ca. 5% und in der "High Dose"-Gruppe ca. 7%. In Abbildung 5 werden die Mittelwerte der terminalen Körpergewichte sowie deren Standardabweichung und Signifikanzniveau nach einwöchiger Behandlung aufgeführt.





* = $p \le 0.05$; ** = $p \le 0.01$ (Dunnett-Test, 2-seitig)

4.1.3 Terminale Körpergewichte, Woche 4

Das terminale Körpergewicht der Kontrollgruppe betrug $319g \pm 16g$. In der "Low Dose"-Gruppe waren mit $311g \pm 26g$ keine statistisch signifikanten Abweichungen zu beobachten.

ACTH (272g \pm 22g), Dexamethason (275g \pm 16g) und die hohe Dosierung der Testsubstanz (271g \pm 16g) führen zu einer statistisch signifikanten Verminderung des Körpergewichts. In der ACTH- und der "High Dose"-Gruppe beträgt diese ca. 15%, in der Dexamethason-Gruppe beläuft sie sich auf ca. 14%.

In Abbildung 6 werden die Mittelwerte der terminalen Körpergewichte sowie deren Standardabweichung und Signifikanzniveau nach vierwöchiger Behandlung aufgeführt.





*** = $p \le 0,001$ (Dunnett-Test, 2-seitig)

4.2 Nebennierengewichte

Aufgrund der besseren Übersichtlichkeit wird bei den Nebennierengewichten auf eine Darstellung der absoluten Werte verzichtet und stattdessen werden nur die relativen Gewichte aufgeführt.

4.2.1 Woche 1

In der Dexamethason- und der "Low Dose"-Gruppe wurden keine Veränderungen sowohl der absoluten als auch der relativen Nebennierengewichte gegenüber der Kontrolle festgestellt. ACTH führt sowohl bei den absoluten als auch den relativen Nebennierengewichten zu einer statistisch signifikanten Erhöhung. Absolut und relativ nehmen sie um ca. 40% zu.

In der "High Dose"-Gruppe nimmt das Nebennierengewicht absolut um ca. 14% ($p \le 0,05$) zu. Da diese Gruppe eine Körpergewichtsreduktion aufwies (Abb. 5), wird diese Gewichtserhöhung bei Betrachtung der relativen Nebennierengewichte deutlicher (Abb. 7). Hierbei läßt sich eine 23%ige ($p \le 0,001$) Gewichtszunahme beobachten.





*** = $p \le 0,001$ (Dunnett-Test, 2-seitig)

4.2.2 Woche 4

Wie schon nach einwöchiger Versuchsdauer ist auch nach vierwöchiger Behandlung keine Veränderung der absoluten oder relativen Nebennierengewichte in der Dexamethason- und der "Low Dose"-Gruppe festzustellen.

ACTH führt sowohl bei den absoluten als auch den relativen Nebennierengewichten zu einer statistisch signifikanten Erhöhung. Absolut nehmen die Nebennierengewichte um ca. 65% zu, die relativen Gewichte um 90%. Die bereits nach einer Woche festgestellte ACTH-Wirkung wird nach vier Wochen damit noch deutlicher.

Demgegenüber tritt in der "High Dose"-Gruppe die nach einer Behandlungswoche beobachtete Gewichtserhöhung nicht mehr auf (Abb. 8).





*** = $p \le 0,001$ (Dunnett-Test, 2-seitig)

4.3. Leber-, Milz-, Thymus- und Hypophysengewichte

Neben den Nebennierengewichten sind auch die Leber-, Milz-, Thymus- und Hypophysengewichte bestimmt worden. Deren relatives Gewicht wird nachfolgend tabellarisch aufgeführt.

4.3.1 Woche 1

Wie aus Tabelle 12 hervorgeht zeigen die Leber- oder Milzgewichte in keiner Behandlungsgruppe eine Abweichung gegenüber der Kontrolle.

Die relativen Thymusgewichte weisen in der ACTH-, der Dexamethason-und der "High Dose"-Gruppe eine statistisch signifikante Reduktion auf ($p \le 0,01$). Bei ACTH beträgt diese Reduktion 28%, bei Dexamethason 39% und in der "High Dose"-Gruppe 33%. Die relativen Hypophysengewichte werden lediglich unter Dexamethasongabe geringgradig beeinflusst. Hierbei ist eine relative Gewichtserhöhung von 17% feststellbar.

<u>Tab. 12</u>: Relative Leber-, Milz-, Thymus- und Hypophysengewichte in Prozent, Mittelwerte ± Standardabweichung; Gruppenvergleich nach einwöchiger Behandlung

| Gruppe | Relatives Gewicht (Prozent) (MW ± SD) | | | | | |
|--------------|--|-----------------|-----------------------|----------------------|--|--|
| | Labor | Mila | Thymus | Hupophyso | | |
| | | IVIIIZ | Tilyillus | | | |
| Kontrolle | 3.1 ± 0.1 | 0.20 ± 0.03 | 0.18 ± 0.04 | 0.0035 ± 0.0004 | | |
| | | | | | | |
| ACTH | 3.1 ± 0.1 | 0.19 ± 0.02 | $0.13^{***} \pm 0.02$ | 0.0038 ± 0.0004 | | |
| | | | | | | |
| Dexamethason | 3.2 ± 0.1 | 0.19 ± 0.02 | $0.11^{***} \pm 0.02$ | $0.0041* \pm 0.0006$ | | |
| | | | | | | |
| Low Dose | 3.2 ± 0.3 | 0.22 ± 0.02 | 0.18 ± 0.03 | 0.0039 ± 0.0004 | | |
| | | | | | | |
| High Dose | 3.2 ± 0.2 | 0.20 ± 0.03 | 0.12*** ± 0.02 | 0.0039 ± 0.0002 | | |

* = $p \le 0.05$; *** = $p \le 0.001$ (Dunnett-Test, 2-seitig)

Erläuterungen zu den Abkürzungen: MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung

4.3.2 Woche 4

Aus Tabelle 13 wird ersichtlich, daß die Lebergewichte wie schon nach einwöchiger Behandlung keinen Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe aufweisen.

Das relative Milzgewicht wird in der ACTH-Gruppe statistisch signifikant um 24% reduziert.

ACTH, Dexamethason und die "High Dose"-Gruppe bewirken eine statistisch signifikante Reduktion der relativen Thymusgewichte. Bei ACTH beträgt diese Reduktion 50%, bei Dexamethason 38% und in der "High Dose"-Gruppe 25%.

Das relative Hypophysengewicht wird lediglich unter Dexamethasongabe statistisch signifikant beeinflusst. Hierbei ist eine Gewichtserhöhung um 14% feststellbar.

| Gruppe | Relatives Gewicht (Prozent) (MW ± SD) | | | | | | | |
|--------------|--|-----------------------|-----------------------|----------------------|--|--|--|--|
| | Leber | Milz | Thymus | Hypophyse | | | | |
| Kontrolle | 32 + 02 | 0.21 ± 0.02 | 0.16 ± 0.02 | 0 0035 + 0 0003 | | | | |
| ACTU | | | | | | | | |
| ACIH | 3.2 ± 0.3 | $0.16^{***} \pm 0.02$ | $0.08^{***} \pm 0.01$ | 0.0038 ± 0.0003 | | | | |
| Dexamethason | 3.0 ± 0.1 | 0.18 ± 0.01 | 0.10*** ± 0.02 | $0.0040* \pm 0.0004$ | | | | |
| Low Dose | 3.2 ± 0.3 | 0.20 ± 0.03 | 0.14 ± 0.02 | 0.0035 ± 0.0002 | | | | |
| High Dose | 3.3 ± 0.2 | 0.19 ± 0.03 | $0.12^{***} \pm 0.02$ | 0.0036 ± 0.0005 | | | | |

<u>Tab. 13</u>: Relative Leber-, Milz-, Thymus- und Hypophysengewichte in Prozent, Mittelwerte ± Standardabweichung; Gruppenvergleich nach vierwöchiger Behandlung

 $* = p \le 0.05; *** = p \le 0.001$ (Dunnett-Test, 2-seitig)

Erläuterungen zu den Abkürzungen: MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung

4.4 Makroskopische und histologische Befunde

Makroskopie

Tier 13 wies eine massive subkutane Flüssigkeitsansammlung im Rückenbereich auf. Die Verschlußkappe der Minipumpe schloss bei diesem Tier nicht lückenlos mit dem Pumpenreservoir ab. Daher wurde dieses Tier nicht in die Auswertung der BrdU-Immunhistologie miteinbezogen.

Tier 10 wies in der rechten Niere eine ca. 3mm große Zyste auf. Bei Tier 87 wurde eine geringgradige Verklebung zwischen Magen und linkem Leberhauptlappen festgestellt.

Bei den übrigen Tieren konnten keinerlei maskroskopische Veränderungen festegestellt werden. Insbesondere wurde auf die Lage der Minipumpe, das umgebende Gewebe und den vollständigen Schluß zwischen Verschlußkappe und Pumpenreservoir geachtet.

Histologie

Bei allen Tieren wurde die linke Nebenniere mit Hilfe eines HE-gefärbten Präparates lichktmikroskopisch ausgewertet. Die Nebennieren der Kontrolltiere waren alle ohne besonderen Befund. In der ACTH-Gruppe zeigt sich nach <u>einwöchiger Behandlung</u> eine in ihrer Breite deutlich reduzierte Zona glomerulosa. Statt der bei den Kontrolltieren festgestellten Breite von ca. 8-10 Zellagen umfaßte die Zona glomerulosa in der ACTH-Gruppe nur noch ca. 3-5 Zellagen. Dieses Phänomen wurde bei neun von zehn Tieren festgestellt. Ein Tier dieser Gruppe wies zusätzlich eine geringgradige extramedulläre Hämatopoese in der Nebennierenrinde auf. Die Nebennieren der Dexamethason-Gruppe waren ohne besonderen Befund. In der "Low Dose"-Gruppe wiesen zwei der Tiere einen akzessorischen kortikalen Knoten auf, alle übrigen Tiere waren ohne besonderen Befund. In der "High Dose"-Gruppe zeigten zwei der Tiere eine geringgradig schmalere Zona glomerulosa.

Nach <u>vierwöchiger Behandlung</u> war die Zona glomerulosa in der ACTH-Gruppe bei allen Tieren vollständig durch Zellen des Zona fasciculata-Types ersetzt worden. Ein einzelnes Tier der "High Dose"-Gruppe wies einen akzessorischen kortikalen Knoten auf, alle übrigen Nebennieren der verschiedenen Behandlungsgruppen waren ohne besonderen Befund.

4.5 Ergebnisse der Blutuntersuchung

Bei der Bestimmung der ACTH-Plasmakonzentrationen 24h nach der letzen Substanzapplikation zeigte sich in <u>Woche 1</u> lediglich eine geringgradige aber statistisch signifikante Erniedrigung in der ACTH-Gruppe ($p \le 0,05$). In der Dexamethason-Gruppe wurden zwar auch tendenziell niedrigere Werte als in der Kontrollgruppe festgestellt, diese waren jedoch statistisch nicht signifikant. Entsprechend zeigen die Kortikosteronkonzentrationen nach einwöchiger Behandlung in der ACTH-Gruppe ($p \le 0,05$) sowie in der Dexamethason-Gruppe ($p \le 0,01$) gegenüber der Kontrolle statistisch signifikant niedrigere Werte. In der "Low Dose"- und "High Dose"-Gruppe konnten keine Änderungen beider Hormone gegenüber der Kontrolle festgestellt werden.

Nach <u>vierwöchiger</u> Behandlung wurden in der ACTH- und der Dexamethason-Gruppe statistisch signifikant niedrigere **ACTH-Plasmakonzentrationen** gegenüber der Kontrolle festgestellt. In den übrigen Gruppen trat wie schon nach einer Woche keine Änderung gegenüber Kontrollwerten auf. Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse der einzelnen ACTH-Messungen nach vierwöchiger Behandlung im Vergleich. Die waagerechte Linie zeigt den Median der jeweiligen Gruppe.





• Kontrolle \Box ACTH \blacktriangle Dexamethason \times "LowDose" \times "High Dose"

* $p \le 0.05$; ** $p \le 0.01$ — = Median

Die Kortikosteronblutplasmaspiegel ergaben nach vierwöchiger Behandlung aufgrund der sehr hohen Streuung der Einzelwerte in der Kontrollgruppe in keiner der Behandlungsgruppen eine statistisch siginifikante Änderung. Tendenziell wurden jedoch die niedrigsten Werte in der ACTH- und der Dexamethason-Gruppe festgestellt.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen der vorgenommenen Hormonmessungen nach ein- und vierwöchiger Behandlung sind in tabellarischer Form im Anhang aufgeführt (siehe Kap. 8.2).

4.6 Ergebnisse des Vorversuches

4.6.1 Varianzkomponenten für die Zona glomerulosa

Die Faktoren Präparation und Zählung haben nur einen geringen Einfluß auf die Gesamtvarianz, d.h. mehr Präparate und mehr Auswertungen je Präparat erhöhen die Genauigkeit der statistischen Aussage kaum (Tab. 14). Die die Gesamtvarianz am stärksten beeinflussende Komponente sind die ausgewählten Areale. Daher kann durch eine Erhöhung der Anzahl der Areale, also der auszuwertenden Zellkerne, die Varianz des Mittelwertes pro Tier am besten reduziert werden. Tabelle 14 zeigt die Ergebnisse der Varianzkomponentenanalyse für die Zona glomerulosa im Überblick:

| Varianz | Varianzkomponente | Prozent von Total |
|----------------------------|-------------------|-------------------|
| Total | 36,3 | 100 % |
| Tier | 3,8 | 10 % |
| Präparation | 1,7 | 5 % |
| Zählungen/ Auswertungen | -0,9 | 0 % |
| Areal | 30,8 | 85 % |

<u>Tab.14</u>: Varianzkomponenten für die Zona glomerulosa

Um den Einfluß der Anzahl der ausgewerteten Areale auf die Varianz darzustellen wird nachfolgend eine beispielhafte Berechnung der Schätzer für die Varianz des Mittelwertes pro Tier für 5 und 10 ausgewertete Areale durchgeführt.

Bei J=1 Präparaten, K=1 Zählungen und L=10 ausgezählten Arealen ergibt sich als Schätzer für die Varianz des Mittelwertes nach Formel 3.3.1.9 b:

$$3,8 + 1,7/J + 0/(J^*K) + 30,8/(J^*K^*L) =$$

 $3,8 + 1,7/1 + 0/(1^*1) + 30,8/(10^*1^*1) = 8,6$

Bei J = 1 Präparaten, K = 1 Zählungen und L = 5 ausgezählten Arealen ergibt sich als Schätzer für die Varianz des Mittelwertes nach Formel 3.3.1.9 b:

$$3,8 + 1,7/J + 0/(J^*K) + 30,8/(J^*K^*L) =$$

$$3,8 + 1,7/1 + 0/(1^*1) + 30,8/(5^*1^*1) = \underline{11,6}$$

Schlußfolgerung: Eine Halbierung der untersuchten Areale von 10 auf 5 bewirkt eine deutliche Erhöhung des Schätzers für die Varianz des Mittelwertes, so daß eine Auszählung von 10 Arealen für die Zona glomerulosa vorzuziehen ist (Abb. 10).

4.6.2 Varianzkomponenten für die Zona fasciculata

Auch bei der Zona fasciculata haben die Faktoren Präparation und Zählung nur einen geringen Einfluß auf die Streuung. Die die Varianz am stärksten beeinflussende Komponente stellt auch hier die Anzahl der ausgewerteten Areale dar. Die Ergebnisse der Varianzkomponentenanalyse werden in Tabelle 15 veranschaulicht.

| Varianz | Varianzkomponente | Prozent von Total |
|------------------------|-------------------|-------------------|
| Total | 16,2 | 100 % |
| Tier | 5,7 | 35 % |
| Präparation | -0,1 | 0 % |
| Zählung/ Auswertung | 0,4 | 3 % |
| Areal | 10,1 | 62 % |

Tab. 15: Varianzkomponenten für die Zona fasciculata

Um den Einfluß der Anzahl der ausgewerteten Areale auf die Varianz darzustellen wird nachfolgend eine beispielhafte Berechnung der Schätzer für die Varianz des Mittelwertes pro Tier für 5 und 10 ausgewertete Areale durchgeführt.

Bei J=1 Präparaten, K=1 Zählungen und L=10 ausgezählten Arealen ergibt sich als Schätzer für die Varianz des Mittelwertes nach Formel 3.3.1.9 b:

$$5,7 + 0/J + 0,4/(J*K) + 10,1/(J*K*L) =$$

 $5,7 + 0,4/1 + 10,1/(10*1*1) = 7,1$

Bei J= 1 Präparaten, K = 1 Zählungen und L = 5 ausgezählten Arealen ergibt sich als Schätzer für die Varianz des Mittelwertes nach Formel 3.3.1.9 b:

Schlußfolgerung: Bei der Zona fasciculata ändert sich der Schätzer für die Varianz des Mittelwertes pro Tier bei 5 statt 10 Meßarealen nur geringfügig. Für die Zona fasciculata ist es also ausreichend, nur 5 Areale auszuwerten (Abb. 10).





4.6.3 Statistische Aussagekraft

In dem Hauptversuch wurde die Kontrollgruppe mit den behandelten Tiergruppen verglichen. Um aussagen zu können, welcher Unterschied zwischen zwei Gruppen mit je n=10 Tieren mit 90%iger Wahrscheinlichkeit erkannt werden kann, wurde eine Fallzahl-Berechnung mit dem Programm nQuery (ELASHOFF, 1997) durchgeführt.

Unter Verwendung des Wilcoxon Rangsummen-Testes (2-seitig, 5% Signifikanzniveau), ist man in der Lage eine Differenz von ca. 2 Standardabweichungen zu erkennen, wenn jede Gruppe 10 Tiere umfaßt. Unter Zugrundelegung der oben genannten Werte ergibt sich für die Zona fasciculata bei einer Standardabweichung von 3, daß eine 6%ige Erhöhung der markierten Zellkerne mit einer Wahrscheinlichkeit von 90% erkannt werden kann. Für die Zona glomerulosa bedeutet dies bei einer Standardabweichung von 4, daß eine 8%ige Erhöhung der markierten Zellkerne mit einer Wahrscheinlichkeit von 90% erkannt werden kann.

4.6.4 Zusammenfassung der Auszählmethodik

Die Anzahl der ausgewerteten Meßfelder und damit die Anzahl der ausgezählten Zellkerne, beeinflußt die Meßwertvariabilität am stärksten. Je mehr Zellkerne gezählt werden, desto genauer wird die statistische Aussage. Ab etwa 10 ausgezählten Meßfeldern für die Zona glomerulosa bzw. 5 Meßfeldern für die Zona fasciculata verändert sich die Meßwertvariabilität durch eine weitere Erhöhung der ausgewerteten Meßfelder kaum, d.h. die noch zu erzielende Reduzierung der Varianz des Schätzers für den Mittelwert rechtfertigt nicht den zusätlichen Arbeitsaufwand. Bei beiden Zonen entspricht dies damit einer auszuwertetenden Zellkernzahl von ca. 1000.

Der zweitwichtigste Faktor wird durch die Unterschiede zwischen den Tieren bestimmt. Die resultierende Meßwertvariabilität kann durch eine ausreichende Anzahl von Tieren verringert werden. Bei einer Gruppengröße von 10 Tieren kann mit 90% iger Wahrscheinlichkeit eine Proliferationssteigerung ab ca. 10% detektiert werden (berechnet nach nQuery; ELASHOFF, 1997).

Unterschiede zwischen verschiedenen Ebenen derselben Nebenniere wirken sich kaum auf die Gesamtvarianz aus. Auch die Streuung zwischen zwei unabhängigen Auswertungen innerhalb der gleichen Ebene (also innerhalb des gleichen Präparates) ist gering, wenn jeweils 10 Areale pro Auswertung ausgezählt werden.

4.7 Morphometrie (BrdU-Hauptversuch)

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Auszählung zonal und zeitlich getrennt mit Hilfe der Box-and-Whisker-Box aufgeführt.

Aus der Box-and-Whisker-Box Darstellung können jeweils Mittelwert (Kreuz), Median (durchgezogene Linie in der Box), größter und kleinster Stichprobenwert (obere und untere Linienbegrenzung) sowie die Quartilsabstände x $_{0.75}$ und x $_{0.25}$ (obere und untere Begrenzung der Box) jeder Behandlungsgruppe abgelesen werden.

Aus den sich anschließenden Tabellen wird in % Kontrolle der Quotient des Mittelwertes der jeweiligen Behandlungsgruppe gegenüber der Kontrolle angegeben. Zusätzlich wird jeweils der Median der jeweiligen Behandlungsgruppen aufgeführt.

Die Einzelwerte der morphometrischen Messungen, der Mittelwert, Median und die Standardabweichung der jeweiligen Behandlungsgruppen sind zonal getrennt in tabellarischer Form im Anhang (siehe Kap. 8.3) aufgeführt.

4.7.1 Auswertung der Gruppen nach Zonen

4.7.1.1 Zona glomerulosa, Woche 1

Die ACTH- und "High Dose"-Gruppe zeigen eine Erhöhung des "Labeling Index" in der Zona glomerulosa im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Abb. 34, 35 und 36). Demgegenüber sind die Abweichungen in der Dexamethason- und der "Low Dose"-Gruppe im Vergleich zu der Kontrolle statistisch nicht signifikant (Abb. 11 und Tab. 16).





*** = $p \le 0,001$ + = Mittelwert - = Median

<u>Tab. 16</u>: Median der LIs der verschiedenen Behandlungsgruppen in der Zona glomerulosa nach einwöchiger Behandlung und relativer prozentualer Unterschied zur Kontrolle

| Gruppe | Kontrolle | АСТН | Dexamethason | "Low Dose" | "High Dose" |
|--------|-----------|-------|--------------|------------|-------------|
| Median | 14,61 | 28,04 | 14,83 | 19,36 | 27,91 |
| % Ko | | 192 | 102 | 133 | 191 |

4.7.1.2 Zona glomerulosa, Woche 4

In der ACTH-Gruppe kann eine deutliche Erhöhung des LI festgestellt werden (Tab. 17 und Abb.38). Selbst der kleinste Stichprobenwert in dieser Gruppe liegt über dem größten Wert der Kontrollgruppe. Aufgrund dieses starken ACTH-Effektes werden Abweichungen anderer Gruppen gegenüber der Kontrolle in der Box-and-Whisker-Darstellung (Abb. 12) nicht leicht erkennbar. Jedoch wird auch in der "Low Dose"- und der "High Dose"-Gruppe eine statistisch signifikante Änderung gegenüber der Kontrolle beobachtet ($p \le 0.05$). Diese ist jedoch nicht so ausgeprägt wie in der ACTH-Gruppe ($p \le 0,001$).



Abb.12: Zona glomerulosa nach vierwöchiger Behandlung "Labeling Index", Box-and-Whisker-Plot

= Mittelwert = Median

| Tab. 17: Median der LIs der verschiedenen Behandlus | ngsgruppen in der Zona glomerulosa |
|---|--|
| nach vierwöchiger Behandlung und relativer | prozentualer Unterschied zur Kontrolle |

| Gruppe | Kontrolle | ACTH | Dexamethason | "Low Dose" | "High Dose" |
|--------|-----------|-------|--------------|------------|-------------|
| Median | 12,90 | 33,90 | 12,87 | 16,65 | 16,01 |
| % Ko | | 263 | 100 | 129 | 124 |

4.7.1.3 Zona fasciculata, Woche 1

Die ACTH- und die "High Dose"-Gruppe zeigen eine deutliche Erhöhung des LI (Abb. 35 und 36). Die Mittelwerte liegen in beiden Gruppen sehr dicht beeinander, auch wenn der größte Stichprobenwert in der ACTH-Gruppe festgestellt werden kann. In der Dexamethason-Gruppe wird demgegenüber eine deutliche Erniedrigung des LI festgestellt. Der Median dieser Gruppe hat sich gegenüber der Kontrollgruppe nahezu halbiert (Tab.18). In der "Low Dose"-Gruppe kann keine Veränderung gegenüber der Kontrolle festgestellt werden (Abb.13).



Abb.13: Zona fasciculata nach einwöchiger Behandlung "Labeling Index", Box-and-Whisker-Plot

= Median

| Tab. 18: Median der LIs der verschiedenen Behandlu | Ingsgruppen in der Zona fasciculata |
|--|--|
| nach einwöchiger Behandlung und relativer | prozentualer Unterschied zur Kontrolle |

| Gruppe | Kontrolle | ACTH | Devamethason | Low Dose" | High Dose" |
|--------|-----------|-------|--------------|-----------|------------|
| Gruppe | Kondolle | ACTI1 | Denamethason | "LOW DOSC | "mgn D030 |
| | | | | | |
| Median | 17,18 | 31,66 | 9,45 | 15,10 | 29,97 |
| | | | | | |
| % Ko | | 184 | 55 | 88 | 174 |

4.7.1.4 Zona fasciculata, Woche 4

Wie aus Abbildung 14 und 38 sowie Tabelle 19 hervorgeht, wird in der ACTH-Gruppe eine deutliche Erhöhung der LIs erkennbar. Wie bereits in der Zona glomerulosa in Woche 4 (siehe Kap. 4.7.1.2) festgestellt wurde, liegt auch hier der kleinste Stichprobenwert der ACTH-Gruppe über dem größten Stichprobenwert der Kontrollgruppe. Dexamethason zeigt, wie schon nach einer Woche, auch nach vierwöchiger Applikation eine deutliche Reduktion der LIs in der Zona fasciculata. Demgegenüber ist in der "High Dose"-Gruppe kein Effekt mehr feststellbar (Abb. 37). Die "Low Dose"-Gruppe weist, wie schon nach einer Woche, keine statistisch signifikante Änderung der LIs gegenüber der Kontrollgruppe auf.





"Labeling Index", Box-and-Whisker-Plot

*** = $p \le 0,001$ + = Mittelwert - = Median

<u>Tab. 19</u>: Median der LIs der verschiedenen Behandlungsgruppen in der Zona fasciculata nach vierwöchiger Behandlung und relativer prozentualer Unterschied zur Kontrolle

| Gruppe | Kontrolle | АСТН | Dexamethason | "Low Dose" | "High Dose" |
|--------|-----------|-------|--------------|------------|-------------|
| Median | 15,09 | 26,13 | 8,73 | 12,37 | 12,58 |
| % Ko | | 173 | 58 | 82 | 83 |

4.7.1.5 Zona reticularis, Woche 1

In der Zona reticularis wurde in allen Gruppen die größte Streuung zwischen den Einzelwerten festgestellt. Dies wird auch in der Box-and-Whisker-Plot Darstellung durch die große Spannweite zwischen dem größten und kleinsten Stichprobenwert deutlich (Abb. 15), welche im Vergleich zu den übrigen Zonen deutlich höher ausfällt. Nach einer Woche kann in der ACTH-Gruppe eine Erhöhung der LIs ($p \le 0.01$) beobachtet werden. Dexamethason führt zu einer Erniedrigung ($p \le 0.05$). In der "Low Dose"- und der "High Dose"-Gruppe ist kein Effekt festzustellen.



Abb.15: Zona reticularis nach einwöchiger Behandlung "Labeling Index", Box-and-Whisker-Plot

= Median

Tab. 20: Median der LIs der verschiedenen Behandlungsgruppen in der Zona reticularis nach einwöchiger Behandlung und relativer prozentualer Unterschied zur Kontrolle

| Gruppe | Kontrolle | ACTH | Dexamethason | "Low Dose" | "High Dose" |
|--------|-----------|-------|--------------|------------|-------------|
| Median | 15,47 | 27,62 | 8,66 | 9,39 | 9,34 |
| % Ko | | 179 | 56 | 61 | 60 |

4.7.1.6 Zona reticularis, Woche 4

In keiner der vier Behandlungsgruppen ist eine statisitisch signifikante Änderung des LI gegenüber der Kontrolle aufgetreten (Abb.16).





--- = Median

<u>Tab. 21</u>: Median der LIs der verschiedenen Behandlungsgruppen in der Zona reticularis nach vierwöchiger Behandlung und relativer prozentualer Unterschied zur Kontrolle

| Gruppe | Kontrolle | АСТН | Dexamethason | "Low Dose" | "High Dose" |
|--------|-----------|-------|--------------|------------|-------------|
| Median | 9,49 | 13,63 | 8,10 | 10,96 | 8,18 |
| % Ko | | 144 | 85 | 115 | 86 |

4.7.2 Vergleich zwischen Woche 1 und Woche 4

Nachfolgend wird für jede Nebennierenrindenzone ein Vergleich zwischen den zwei Behandlungszeiträumen durchgeführt. Hierdurch soll zum einen festgestellt werden, ob zwischen diesen zwei Teilkollektiven jeder Hauptgruppe überhaupt ein Unterschied erkennbar wird, und damit die Behandlungsdauer einen Effekt ausübt. Zum anderen soll festgestellt werden, ob der "zeitliche Verlauf" mit der Kontrollgruppe vergleichbar ist.

4.7.2.1 Zona glomerulosa (Vergleich Woche 1 vs Woche 4)

Die Kontrollgruppe zeigt in Woche 1 im Vergleich zu Woche 4 einen um ca. 15% niedrigeren LI. In der ACTH-Gruppe ist eine Erhöhung um ca. 15% festzustellen. In der Dexamethason-Gruppe verringert sich der Mittelwert der LIs nur sehr geringfügig. Die "Low Dose"-Gruppe zeigt eine mit der Kontrollgruppe vergleichbare Reduktion der LIs über die Zeit (ca. 9%). Nur in der "High Dose"-Gruppe weisen die LIs der zwei Teilkollektive einen statistisch signifikanten Unterschied zueinander auf ($p \le 0,01$; exakter 2 Stichproben Wilcoxon Test; 2-seitig). Hierbei ist eine Verminderung des Mittelwertes um ca. 40% zu beobachten. Insgesamt kann man in der Zona glomerulosa bis auf die ACTH-Gruppe eine Reduktion der LIs in Woche 4 gegenüber Woche 1 feststellen. Hierbei traten jedoch keine statistischen Signifikanzen auf (Abb. 17).



Abb. 17: Zona glomerulosa: Mittelwerte der LIs in Woche 1 und Woche 4 post applicationem

• ● • · Kontrolle • · ⊡ · · ACTH · · ▲ · · Dexa. · · ★ · · "Low Dose" · · ★ · · "High Dose"

4.7.2.2 Zona fasciculata (Vergleich Woche 1 vs Woche 4)

Die Mittelwerte der LIs reduzieren sich im Vergleich von Woche 1 und Woche 4 in der Kontrollgruppe um ca. 18%, in der ACTH-Gruppe um ca. 16%, in der Dexamethason-Gruppe um ca. 10% und in der "Low Dose"-Gruppe um ca. 25%. Wie schon bei der Zona glomerulosa ist auch in der Zona fasciculata eine statistisch signifikante ($p \le 0,001$; exakter 2 Stichproben Wilcoxon Test; 2-seitig) Reduktion der LIs lediglich in der "High Dose"-Gruppe auszumachen (Abb. 18). Der Unterschied zwischen den beiden Mittelwerten in Woche 1 und Woche 4 beträgt ca. 58%.





· · ● · · Kontrolle · · □ · · ACTH · · ▲ · · Dexa. · · × · · "Low Dose" · · * · · "High Dose"

4.7.2.3 Zona reticularis (Vergleich Woche 1 vs Woche 4)

Bis auf die ACTH-Gruppe sind in keiner der verschiedenen Behandlungsgruppen statistisch signifikante Abweichungen zwischen den LIs in Woche 1 und Woche 4 auszumachen (Abb. 19). In der Kontrollgruppe vermindert sich der Mittelwert um ca. 21%, in der Dexamethason-Gruppe um ca. 9%, in der "Low Dose"-Gruppe um ca. 8% und in der "High Dose"-Gruppe um ca. 36%. In der ACTH-Gruppe zeigt sich eine statistisch signifikante Änderung der LIs (p $\leq 0,01$; exakter 2 Stichproben Wilcoxon-Test; 2-seitig). Der Mittelwert ist in dieser Gruppe in Woche 4 um ca. 49% niedriger als in Woche 1.





 $\cdots \blacklozenge \cdots$ Kontrolle $\cdots \boxdot \cdots \land ACTH \cdots \blacktriangle \cdots$ Dexa. $\cdots \nvDash \cdots$ "Low Dose" $\cdots \divideontimes \cdots$ "High Dose"

4.7.3 Vergleich zwischen rechter und linker Nebenniere

In der Kontrollgruppe wurden sowohl die rechte als auch die linke Nebenniere ausgewertet. Zum links/rechts Vergleich wurde der exakte 2-seitige Vorzeichen-Rang Test von Wilcoxon durchgeführt.

Die Zona glomerulosa weist rechtsseitig höhere LIs auf als linksseitig. Dies ist sowohl nach einwöchiger als auch nach vierwöchiger Behandlungsdauer zu beobachten. Nach einer Woche ist rechtsseitig der Mittelwert der LIs ca. 16% größer als linksseitig. Diese Differenz ist statistisch signifikant ($p \le 0.05$) (Abb.20).





4.7.3.2 Zona glomerulosa, Kontrollgruppe, Woche 4 (Vergleich rechts vs links)

Nach vierwöchiger Behandlung wird der Unterschied zwischen rechter und linker Nebenniere deutlicher (Abb. 21). Rechtsseitig ist der Mittelwert der Einzelmessungen um ca. 39% größer als linksseitig. Auch diese Abweichung ist statistisch signifikant ($p \le 0,01$).







4.7.3.3 Zona fasciculata, Kontrollgruppe, Woche 1 (Vergleich rechts vs links)

In der Zona fasciculata ergibt sich ein ähnliches Bild wie in der Zona glomerulosa. Zu beiden Untersuchungszeitpunkten ist rechtsseitig ein höherer LI zu beobachten als linksseitig. In Woche 1 beträgt die Abweichung zwischen den Mittelwerten der linken und rechten Nebenniere ca. 15%. Rechtsseitig ist der LI statistisch signifikant größer ($p \le 0.01$) (Abb. 22).





 $** = p \le 0.01$

4.7.3.4 Zona fasciculata, Kontrollgruppe, Woche 4 (Vergleich rechts vs links)

Im Gegensatz zur Zona glomerulosa ist nach vierwöchiger Behandlung der Unterschied zwischen rechter und linker Nebenniere in der Zona fasciculata weniger stark ausgeprägt. Es ergibt sich eine Abweichung zwischen den Mittelwerten von ca. 11%. Rechtsseitig können die größeren LIs festgestellt werden. Der Unterschied zwischen rechter und linker Nebenniere ist statistisch signifikant ($p \le 0.05$) (Abb. 23).

<u>Abb.23</u>: Zona fasciculata der Kontrollgruppe an Tag 29, Vergleich zwischen linker und rechter Seite, "Labeling Index", Box-and-Whisker-Plot





4.7.3.5 Zona reticularis, Kontrollgruppe, Woche 1 (Vergleich rechts vs links)

In der Zona reticularis werden im Gegensatz zu der Zona glomerulosa und der Zona fasciculata linksseitig zu beiden Zeitpunkten die größeren LIs festgestellt. Der Mittelwert der Einzelmessungen aus der linken Nebenniere liegt in Woche 1 um ca. 41% über dem der rechten Nebenniere. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant ($p \le 0.05$) (Abb. 24).





4.7.3.6 Zona reticularis, Kontrollgruppe, Woche 4 (Vergleich rechts vs links)

Der Mittelwert der Einzelmessungen der linken Nebenniere liegt um ca. 42% über denen der rechten Nebenniere. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant ($p \le 0,01$) und deutlicher als in Woche 1 (Abb. 25).





 $** = p \le 0.01$
4.8 Kombinierte Betrachtung der Nebennierengewichte und "Labeling-Indizes"

Eine veränderte Zellteilungsaktivität resultiert in einer veränderten Zellzahl, welche sich in einem veränderten Organgewicht widerspiegeln kann. Darüber hinaus wird das Organgewicht von weiteren Größen beeinflußt, beispielsweise Zellhypertrophie oder verstärkte bzw. verminderte Organdurchblutung. Außerdem besteht die Nebenniere aus den zwei Hauptkompartimenten Rinde und Mark und daher wird das Gewicht des Gesamtorgans durch beide Kompartimente determiniert. Einflußgrößen auf Rinde und/oder Mark können daher eine Gewichtsveränderung verursachen.

Nachfolgend wird für die Zona fasciculata eine kombinierte Betrachtung der relativen Nebennierengewichte und der ermittelten "Labeling-Indizes" für jedes Einzeltier durchgeführt.

In den Abbildungen 26 und 27 werden die Nebennierengewichte den LIs gegenübergestellt. Die Einzelwerte jeder Gruppe sind durch einen Kreis unterlegt, um die Gruppenunterschiede besser zu visualisieren.

4.8.1 Zona fasciculata, Woche 1

Statistisch signifikante Erhöhungen der "Labeling-Indizes" werden, wie in Kapitel 4.7.1.3 dargestellt, in der ACTH-, der "High Dose"- und der Dexamethason-Gruppe gegenüber der Kontrolle festgestellt. In der ACTH- und "High Dose"-Gruppe ist die Erhöhung der LIs in den meisten Fällen auch mit einer Erhöhung des relativen Organgewichtes verbunden (Abb. 26). In der ACTH-Gruppe ist dies ausgeprägter als in der "High Dose"-Gruppe. Die Dexamethason-Gruppe zeigt trotz einer statistisch signifikanten Erniedrigung der LIs in der Zona fasciculata keine Abweichung der relativen Nebennierengewichte gegenüber der Kontrolle (Abb. 26).



Abb. 26: Relative Nebennierengewichte und LIs, Zona fasciculata, Woche 1

4.8.2 Zona fasciculata, Woche 4

Wie in Kapitel 4.7.1.4 dargestellt weisen in Woche 4 nur die ACTH- und die Dexamethason-Gruppe statistisch signifikante Abweichungen der LIs gegenüber der Kontrolle auf. In der ACTH-Gruppe wird erneut eine gleichzeitige deutliche Erhöhung der relativen Nebennierengewichte sichtbar (Abb. 27); die Dexamethason-Gruppe zeigt demgegenüber auch in Woche 4 keine Gewichtsveränderung. Die "High Dose"-Gruppe weist keine Unterschiede der LIs gegenüber der Kontrolle auf, die relativen Gewichte sind geringgradig erhöht, dies jedoch ohne statistische Signifikanz (siehe Kap. 4.2.2).



Abb. 27: Relative Nebennierengewichte und LIs, Zona fasciculata, Woche 4

4.9 Morphometrie (TUNEL-Methodik)

Die Ergebnisse der TUNEL-Methodik werden nachfolgend mit Hilfe der Box-and-Whisker-Plot-Darstellung sowie tabellarisch aufgeführt. Für die Box-and-Whisker-Plot Darstellung gelten die in Kapitel 4.7 gemachten Anmerkungen.

Der Median und die Quotienten des Anteils TUNEL-positiver Zellen (pro 10 000) der verschiedenen Behandlungsgruppen sind zusätzlich in tabellarischer Form aufgeführt. Aufgrund der sehr geringen Anzahl TUNEL-positiver Zellen in den untersuchten Präparaten wird als Maßeinheit der Anteil TUNEL-positiver Zellen pro 10 000 Zellen verwendet.

4.9.1 Auswertung der Gruppen nach Zonen

4.9.1.1 Zona glomerulosa, Woche 1

In der Zona glomerulosa konnten nahezu keine TUNEL-positiven Zellen vorgefunden werden. Dies trifft auf alle Behandlungsgruppen zu.

Nach einwöchiger Behandlung ist in der Kontrollgruppe bei allen 10 untersuchten Tieren in der Zona glomerulosa keine Zelle TUNEL-positiv. Auch in den anderen Behandlungsgruppen kann oftmals keine TUNEL-positive Zelle in der Zona glomerulosa festgestellt werden, so daß in allen Gruppen der Median bei 0 liegt (Abb. 28). Alle Behandlungsgruppen weisen keine statisitisch signifikanten Abweichungen gegenüber der Kontrolle auf.

<u>Abb. 28</u>: Zona glomerulosa nach einwöchiger Behandlung, Anteil TUNEL-positiver Zellen (pro 10 000), Box-and-Whisker-Plot



^{+ =} Mittelwert

4.9.1.2 Zona glomerulosa, Woche 4

Nach vierwöchiger Behandlung zeigt sich ein ähnliches Bild wie nach einwöchiger Behandlung (Abb. 29). Es sind keine statisitisch signifikanten Änderungen in den verschiedenen Behandlungsgruppen gegenüber der Kontrolle festzustellen.





+ = Mittelwert

4.9.1.3 Zona fasciculata, Woche 1

In der Zona fasciculata sind insgesamt deutlich mehr Zellen TUNEL-positiv als in der Zona glomerulosa. Die positiven Zellen finden sich fast ausschließlich in dem inneren Anteil der Zona fasciculata an der Grenze zur Zona reticularis. Einzelne Zellen, die der Zona fasciculata zugerechnet wurden könnten daher auch der Zona reticularis angehören (geringer Zuordnungsfehler). Nach einwöchiger Behandlung tritt in der ACTH- ($p \le 0,05$) und der "High Dose"-Gruppe ($p \le 0,01$) eine Erhöhung der Anzahl TUNEL-positiver Zellen auf (Abb. 30). In der Dexamethason- und der "Low Dose"-Gruppe ist keine statistisch signifikante Änderung gegenüber der Kontrolle feststellbar.

Abb. 30: Zona fasciculata nach einwöchiger Behandlung, Anteil TUNEL-positiver Zellen



(pro 10 000), Box-and-Whisker-Plot

** = $p \le 0.01$, * = $p \le 0.05$ + = Mittelwert ---- = Median

<u>Tab. 22</u>: Median des Anteils TUNEL-positiver Zellen (pro 10 000) in der Zona fasciculata nach einwöchiger Behandlung und relativer prozentualer Unterschied zur Kontrolle

| Gruppe | Kontrolle | ACTH | Dexamethason | "Low Dose" | "High Dose" |
|--------|-----------|------|--------------|------------|-------------|
| Median | 3,02 | 3,86 | 1,57 | 3,52 | 6,89 |
| % Ko | | 128 | 52 | 117 | 228 |

4.9.1.4 Zona fasciculata, Woche 4

Nach vierwöchiger Behandlung ergibt sich ein ähnliches Bild wie nach einwöchiger Behandlung. Die Erhöhung der Anzahl TUNEL-positiver Zellen ist in der ACTH-Gruppe deutlicher als nach einer Woche ($p \le 0,01$). Auch die "High Dose"-Gruppe zeigt eine statistisch signifikante Erhöhung ($p \le 0,01$) der Anzahl TUNEL-positiver Zellen. Insgesamt werden aber in der ACTH-Gruppe die höchsten Werte festgestellt (Abb. 31). Die Dexamethason- und die "Low Dose"-Gruppe weisen keine statistisch signifikanten Änderungen gegenüber der Kontrolle auf.







<u>Tab. 23</u>: Median des Anteils TUNEL-positiver Zellen (pro 10 000) in der Zona fasciculata nach vierwöchiger Behandlung und relativer prozentualer Unterschied zur Kontrolle

| Gruppe | Kontrolle | ACTH | Dexamethason | "Low Dose" | "High Dose" |
|--------|-----------|-------|--------------|------------|-------------|
| Median | 4,92 | 11,75 | 5,07 | 3,25 | 6,96 |
| % Ko | | 239 | 103 | 66 | 141 |

4.9.1.5 Zona reticularis, Woche 1

In der Zona reticularis treten in allen Gruppen die meisten TUNEL-positiven Zellen auf. An Tag 7 zeigt sich ein ähnliches Resultat wie in der Zona fasciculata nach einwöchiger Behandlung. In der ACTH- und der "High Dose"-Gruppe zeigt sich eine Erhöhung der Anzahl TUNEL-positiver Zellen ($p \le 0,05$). Kein statistisch signifikanter Effekt wird in der Dexamethason- sowie der "Low Dose"-Gruppe festgestellt (Abb. 32).





— = Median

<u>Tab. 24</u>: Median des Anteils TUNEL-positiver Zellen (pro 10 000) in der Zona reticularis nach einrwöchiger Behandlung und relativer prozentualer Unterschied zur Kontrolle

| Gruppe | Kontrolle | АСТН | Dexamethason | "Low Dose" | "High Dose" |
|--------|-----------|-------|--------------|------------|-------------|
| Median | 8,86 | 19,71 | 17,00 | 6,58 | 20,01 |
| % Ko | | 222 | 192 | 74 | 226 |

4.9.1.6 Zona reticularis, Woche 4

Nur in der ACTH-Gruppe wird eine statistisch signifikante ($p \le 0,01$) Erhöhung TUNELpositiver Zellen beobachtet (Abb. 39). Im Gegensatz zur Zona fasciculata zeigt sich in der Zona reticularis der "High Dose"-Gruppe nach vierwöchiger Behandlung keine statistisch siginifikante Erhöhung TUNEL-positiver Zellen gegenüber der Kontrolle (Abb. 33). Wie schon nach einer Woche weisen auch die Dexamethason- und die "Low Dose"-Gruppe keine Änderungen gegenüber der Kontrolle auf.





— = Median

<u>Tab. 27</u>: Median des Anteils TUNEL-positiver Zellen (pro 10 000) in der Zona reticularis nach vierwöchiger Behandlung und relativer prozentualer Unterschied zur Kontrolle

| Gruppe | Kontrolle | АСТН | Dexamethason | Low Dose" | High Dose" |
|--------|-----------|-------|--------------|-----------|------------|
| Median | 7,02 | 26,74 | 8,15 | 9,38 | 10,21 |
| % Ko | | 381 | 116 | 134 | 145 |

5. **DISKUSSION**

Der experimentelle Teil dieser Arbeit umfaßt die Messung der Zellproliferation in der Nebennierenrinde der Ratte mit Hilfe des immunhistologischen BrdU-Nachweises. In einem Vorversuch wurde anhand von Archivmaterial die morphometrische Methodik zur Quantifizierung BrdU-positiver Zellkerne in der Nebennierenrinde etabliert. Anhand der hierbei festgestellten Bedeutung verschiedener Einflußgrößen auf die Genauigkeit des ermittelten Anteils BrdU-positiver Zellkerne, wurde die Hauptstudie geplant und ausgewertet. Neben dem immunhistologischen BrdU-Nachweis wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Nebennieren angefertigt und die histologischen Präparate wurden lichtmikroskopisch ausgewertet. Darüber hinaus wurde mit Hilfe der TUNEL-Methodik eine Quantifizierung apoptotischer Zellen in der Nebennierenrinde vorgenommen. Verschiedene Behandlungsgruppen wurden geprüft: ACTH wurde als physiologisches Stimulans gewählt, Dexamethason als Inhibitor. Geprüft wurden weiterhin zwei verschiedene Dosisgruppen eines Aminomethylchroman-Derivats. Für diese Substanz war bekannt, daß sie *in vitro* hemmend auf P450abhängige Enzyme der Steroidsynthese wirkt, unbekannt war jedoch, ob diese Wirkung *in vivo* in der Ratte nach länger andauernder Exposition kompensiert werden kann.

Ein einzelner Untersuchungszeitpunkt erlaubt keine Aussagen dahingehend, ob ein festgestellter Effekt auf die Zellproliferation oder die übrigen untersuchten Parameter vorübergehend oder anhaltend auftritt. Daher wurden Untersuchungen nach einwöchiger sowie nach vierwöchiger Substanzexposition vorgenommen.

5.1 Körper- und Organgewichte

Bis auf die "Low Dose"-Gruppe, welche auch in toxikologischen Prüfungen keine Effekte aufwies ("no adverse effect level"), zeigte sich in allen Behandlungsgruppen eine statistisch signifikante Reduktion der <u>Körpergewichte</u> an Tag 7, 14, 21 und 28 gegenüber der Kontrollgruppe. Die Gewichtsabnahme zeigte in der ACTH- und Dexamethason-Gruppe eine deutliche Korrelation mit dem Futterverbrauch, welcher in der Dexamethason-Gruppe zu allen Beobachtungszeitpunkten, und in der ACTH-Gruppe an Tag 14, 21 und 28 erniedrigt war. In der "High Dose"-Gruppe normalisierte sich die Futteraufnahme über den Zeitraum von 4 Wochen. Anfangs (an Tag 7 und an Tag 14) zeigte sich eine deutliche und an Tag 21 eine weniger deutliche Futterverbrauchsreduktion, während an Tag 28 keine Abweichung mehr gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt wurde.

Die negative Wirkung von ACTH auf die Körpergewichtsentwicklung der Ratte konnte schon mehrfach nachgewiesen werden (WHITWORTH et al., 1990; VAZIR et al., 1981). Dies steht im Kontrast zu Beobachtungen beim Schaf, wo das Gewicht nach ACTH-Behandlung unbeeinflusst bleibt (SCOGGINS et al., 1984) sowie beim Menschen, wo eine Erhöhung beobachtet wurde (WHITWORTH et al., 1981). Vermutlich reflektiert der Körpergewichtsverlust nach **ACTH-Behandlung** eine Steroid-induzierte katabole Stoffwechsellage. Auch der Appetit wird nach dauerhafter ACTH-Applikation negativ beeinflusst. Die Körpergewichtsreduktion unter ACTH-Behandlung beruht also auf einer indirekten Wirkung über die induzierte erhöhte Steroidsekretion. Dexamethason als synthetisches Glukokortikoid entfaltet seine Wirkung auf direktem Weg und führt ebenfalls zu einer katabolen Stoffwechsellage. Die Reduktion der Futteraufnahme ist bei dieser Substanz deutlicher als bei ACTH und stellt eine überraschende Beobachtung dar, da Glukokortikoide eigentlich appetitsteigernd wirken. Andererseits wird von MICHEL und CABANAC (1999) diskutiert, daß Dexamethason ab einer Dosierung von 10µg/kg/Tag zu einer erhöhten Leptin-Produktion führt. Leptin wiederum steigert die "corticotropin releasing hormone" (CRH) -Produktion. CRH selbst soll bei der Festlegung des endogenen Körpergewicht-Sollwertes beteiligt sein, und diesen reduzieren. Niedrige Dexamethason-Dosen inhibieren die CRH-Sekretion und erhöhen den Körpergewicht-Sollwert mit dem Resultat, daß Futteraufnahme, Körpergewicht und Fettreserven zunehmen. Hohe Dexamethason-Dosen resultieren dagegen in einem reduzierten Körpergewicht-Sollwert, welcher vermutlich durch die erhöhte Leptin-Ausschüttung mit anschließender erhöhter CRH-Produktion zustande kommt (MICHEL und CABANAC, 1999). Bei der hier applizierten Dosis von 10µg/kg/Tag ist ein solcher Effekt daher möglich.

Die <u>terminalen Körpergewichte</u> nach einwöchiger Behandlung spiegeln die Wirkungen der verschiedenen Substanzen weniger deutlich wider. Dies kann auf die geringere Stichprobengröße zurückgeführt werden, da die Körpergewichtsentwicklung jeweils bei allen 20 Tieren einer Behandlungsgruppe bestimmt wurde, die terminalen Körpergewichte an Tag 7 jedoch nur aus den 10 zu diesem Zeitpunkt getöteten Tieren. Daher wird in der ACTH-Gruppe zwar eine tendenzielle Erniedrigung der Körpergewichte beobachtet, diese ist jedoch nicht statistisch signifikant. Dexamethason und die "High Dose"-Gruppe zeigen statistisch signifikant niedrigere Werte gegenüber der Kontrollgruppe. Nach vier Wochen sind dagegen in der ACTH-, Dexamethason- und "High Dose"-Gruppe deutliche, statistisch signifikante Körpergewichtsreduktionen feststellbar.

Unter Dexamethason-Behandlung sind die relativen Hypophysengewichte nach einwöchiger und nach vierwöchiger Substanzexposition erhöht ($p \le 0.05$). Eine Erklärung für dieses Phänomen ist nicht ohne weiteres möglich. NOLAN et al. (1998) stellen bei adrenalektomierten Ratten unter Dexamethasonbehandlung eine Verringerung der Zellzahl in der Hypophyse fest; eine Gewichtserhöhung aufgrund einer Hyperplasie erscheint daher unwahrscheinlich. Andererseits wird der Stoffwechsel hypophysealer Zellen durch Glukokortikoide nicht unwesentlich beeinflusst. So führen Kortikosteron-Gaben beispielsweise zu erhöhten "Growth hormone releasing hormone" (GHRH) Rezeptor-mRNA Spiegeln in den hypophysealen Zellen (MILLER und MAYO, 1997). Die beobachtete geringgradige Gewichtserhöhung der Hypophyse unter Dexamethason-Behandlung wird also vermutlich aufgrund einer veränderten Expression von Proteinen bzw. deren Vorstufen zustande kommen. ACTH zeigte keinen Effekt auf die Hypophysengewichte.

Die relativen <u>Thymusgewichte</u> sind in der ACTH-, Dexamethason- und "High Dose"-Gruppe statistisch signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Dies kann sowohl nach einwöchiger als auch nach vierwöchiger Behandlungsdauer festgestellt werden. Die Reduktion der Thymusgewichte unter Dexamethason-Behandlung beruht auf der immunsuppressiven Wirkung dieses Glukokortikoids. Letzlich spiegelt der Gewichtsverlust des Thymus einen Verlust an Lymphozyten wieder. Die ACTH-Wirkung beruht auf dem gleichen Prinzip, da hierbei über die erhöhte endogene Glukokortikoidsekretion eine immunsuppressive Wirkung entfaltet wird. Die Gewichtsreduktion des Thymus in der "High Dose"-Gruppe beruht dagegen auf einer stressinduzierenden Wirkung, die sich sowohl in klinischen Befunden wie Salivation, reduzierte Körpertemperatur und herabgesetzter Spontanaktivität als auch in der Körpergewichtsreduktion widerspiegelt.

Die <u>Milzgewichte</u> waren lediglich in der ACTH-Gruppe nach vierwöchiger Behandlung statistisch signifikant reduziert. Die Milz scheint also gegenüber der immunsuppressiven Wirkung von Glukokortikoiden resistenter zu sein, und erst nach längerdauernder Glukokortikoidwirkung mit einer Gewichtsreduktion zu reagieren. Trotz der komplexen Wechselwirkung zwischen Milzgewicht und vaskulären bzw. zellulären Veränderungen ist dieses beim Nagetier aussagekräftiger als beispielsweise beim Hund, da dieser über eine Speichermilz verfügt und Gewichtsveränderungen unter Umständen nur durch einen veränderten Blutgehalt zustande kommen können. Nagetiere verfügen, so wie der Mensch, jedoch über eine sogenannte Stoffwechselmilz, welche kaum Blutspeicherkapazitäten besitzt, und bei der Gewichtsveränderungen daher in erster Linie das Gewebsparenchym betreffen. In der Dexamethason-Gruppe wurde zwar tendenziell ein niedrigeres Milzgewichte festgestellt,

dies war jedoch ohne statistische Signifikanz. Vermutlich ist bei entsprechend höherer Dosierung auch unter Dexamethason-Behandlung eine Verringerung der Milzgewichte zu erzielen.

Die Nebennieren zeigen in der ACTH-Gruppe eine deutliche, statistisch signifikante Erhöhung sowohl der relativen als auch der absoluten Gewichte nach ein- und vierwöchiger Behandlung im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Dies spiegelt die bei der gewählten Dosis erwartete stimulierende Wirkung von ACTH auf die Nebennierenrinde wider. Mit 0,05mg/kg entspricht die gewählte Dosis laut ABAYESEKARA et al. (1989) der Erhaltungsdosis nach Hypophysektomie und liegt damit deutlich unter der von STACHOWIAK et al. (1990) verwendeten Dosis von 0,1mg/Tier und Tag. STACHOWIAK et al. (1990) haben nach siebentägiger Behandlung in ihrem Versuch eine Verdreifachung des absoluten Nebennierengewichtes beobachten können. Bei der hier gewählten Dosis von 0,05mg/kg konnte nach einwöchiger ACTH-Gabe eine absolute Gewichtserhöhung von ca. 37% sowie nach vierwöchiger Exposition von ca. 65% festgestellt werden. Auf das Körpergewicht bezogen entspricht dies 40% nach einer Woche bzw. 90% nach vier Wochen. Die relativen Nebennierengewichte nehmen also aufgrund der Tatsache, daß die Tiere eine Körpergewichtsreduktion aufwiesen, deutlicher zu. Sowohl anhand der relativen als auch der absoluten Werte wird deutlich, daß ACTH seine stimulierende Wirkung über den gesamten Versuchszeitraum hinweg entfaltet und dieser über die Zeit hin sogar zunimmt. Neben ACTH konnte sonst nur in der "High Dose"-Gruppe eine Änderung der Nebennierengewichte gegenüber der Kontrolle festgestellt werden. Die relativen Gewichte waren nach einwöchiger Behandlung signifikant erhöht. Absolut gesehen war dieser Effekt dagegen weniger deutlich. Nach vierwöchiger Substanzexposition konnte keine Änderung gegenüber der Kontrolle mehr festgestellt werden.

5.2

Plasmahormonspiegel

Bei der Bestimmung der ACTH- und Kortikosteronplasmaspiegel konnte an Tag 8 (Woche 1) in der ACTH-Gruppe eine geringgradige Erniedrigung der ACTHund Blutkortikosteronspiegel sowie in der Dexamethason-Gruppe eine Erniedrigung der Kortikosteronblutspiegel festgestellt werden. Hierbei muß beachtet werden, daß die Blutproben zum Tötungszeitpunkt, also 24 Stunden nach der letzten Substanzapplikation gewonnen wurden. Für ACTH ist eine Halbwertszeit von 1 Stunde nach i.v.-Gabe beim Menschen bekannt, daher waren bei der Ratte 24 Stunden nach der letzten s.c.-Gabe von ACTH keine durch die exogene Zufuhr bedingten erhöhten ACTH-Werte mehr zu erwarten. Eine Erniedrigung der ACTH-Blutspiegel in dieser Gruppe deutet dagegen darauf hin, daß die endogene ACTH-Ausschüttung im Rahmen eines "Rebound"-Phänomens erniedrigt ist. Aufgrund der niedrigeren ACTH-Blutspiegel in dieser Gruppe sind auch die Kortikosteronblutspiegel erniedrigt.

Die Dexamethason-Gruppe zeigt an Tag 8 signifikant erniedrigte Blutkortikosteronspiegel, wohingegegen die ACTH-Ausschüttung nicht signifikant suprimiert ist. Mit der verwendeten Dosis von 0,01mg/kg Dexamethason wurde eine relativ geringe Exposition gewählt. Für Dexamethason ist beim Menschen eine Plasmahalbwertszeit von 190 Minuten bekannt, die biologische Halbwertszeit beträgt dosisabhängig 36-72 Stunden. Daher sind vermutlich die Kontrollwerten statistisch nicht sifnifikant gegenüber den veränderte ACTH-Plasmakonzentration dieser Tiere ein Hinweis für die abklingende Dexamethason-Wirkung. Die deutlich reduzierten Kortikosteronblutspiegel zeigen jedoch, daß die Nebennierenrindenhormonausschüttung eine längere Refraktärzeit nach der durch Dexamethason verursachten Steroidhormonsynthesehemmung zeigt, bis ihre normale Synthese- und Sekretionsleistung wieder hergestellt ist.

An **Tag 29 (Woche 4)** sind die Kortikosteronkonzentrationen der <u>Kontrollgruppe</u> mit einer sehr hohen Standardabweichung behaftet. Daher konnte in keiner der Behandlungsgruppen eine statistisch signifkante Abweichung festgestellt werden. In der Dexamethason- und der ACTH-Gruppe zeigen sich aber die tendenziell niedrigsten Werte.

Die ACTH-Blutspiegel am Tag 29 zeigen erneut in der <u>ACTH-Gruppe</u> eine signifikante Erniedrigung. Die erniedrigten ACTH-Blutspiegel der ACTH-Gruppe erklären sich durch das gleiche Phänomen wie schon an Tag 8 (24h Wert).

Zu diesem Zeitpunkt ist auch in der <u>Dexamethason-Gruppe</u> eine statistisch signifikante Reduzierung der ACTH-Blutplasmaspiegel auszumachen. Für Dexamethason wird deutlich, daß die relativ lange Substanzexposition dazu führt, daß die hypophyseale ACTH-Ausschüttung auch 24 Stunden nach der letzten Dexamethasongabe keine Kontrollwerte mehr erreicht. Dies deutet auf eine nachlassende Sensitivität des Feedbackmechanismus der Hypothalamo-Hypophysealen-Nebennierenachse hin.

Weder an Tag 8 noch an Tag 29 ist ist in der <u>"Low Dose"- oder "High Dose"-Gruppe</u> eine Änderung der ACTH- oder Kortikosteronblutplasmaspiegel im Vergleich mit der Kontrolle aufgetreten.

Generell unterliegen die bestimmten Hormonwerte einer großen individuellen Streuung. Die ACTH-Konzentration ist bei einzelnen Tieren oftmals zwei- oder dreifach höher als bei den übrigen Tieren der gleichen Gruppe. Solche Werte kommen durch die akute Stressituation zustande, welche die Tiere kurz vor und eventuell auch während der Halothan-Narkose erfahren. Trotz bewußt ruhigen Handlings der Tiere wurden so insgesamt bei 6 der 100 Ratten sehr hohe ACTH-Werte festgestellt.

Die Kortikosteronblutplasmaspiegel werden weniger stark durch eine akute Stressituation kurz vor der Tötung beeinflusst. Trotzdem wiesen die Tiere der Kontrollgruppe an Tag 29 eine sehr große Streuung zwischen den Einzelwerten auf, so daß im Vergleich zu den übrigen Behandlungsgruppen keine statistischen Signifikanzen aufgezeigt werden konnten.

Insgesamt spiegeln die bestimmten Plasmahormonspiegel nur tendenziell die Wirkung der einzelnen Substanzen auf die Hypothalamo-Hypophyseale-Nebennierenachse wieder. Eine Interpretation der ermittelten Werte wird durch Feedbackmechanismen erschwert, durch die eine Homöostase aufrecht erhalten wird. 24 Stunden nach der letzten Substanzexposition ist davon auszugehen, daß eine Gegenregulation auf die primär vorhandene Wirkung eingesetzt hat. Für eine genaue mechanistische Abklärung der Wirkung der einzelnen Substanzen auf die bestimmten Blutparameter wären daher mehrere Untersuchungszeitpunkte notwendig gewesen.

5.3 Methodik der Zellproliferationsmessung

5.3.1 Wahl des Markers

BrdU besitzt den großen Vorteil, daß mittels dieses Markers Zellen in der S-Phase kumulativ gemessen werden können (JONES und CLARKE, 1993). Zumindest ein Teil der S-Phase markierten Zellen durchlaufen anschließend auch die Mitose (MELNICK et al., 1996), so daß zwei Tochterzellen entstehen, und die S-Phase daher mit der eigentlichen Mitose korreliert (BURKHARDT, 2001; WRIGHT et al., 1973). Gerade Gewebe mit einer niedrigen proliferativen Aktivität können mittels der kumulativen S-Phase-Detektion untersucht werden. BrdU muß intravital zugeführt werden, d.h. retrospektive Studien an Archivmaterial können nicht durchgeführt werden. Für Studien mit Archivmaterial werden endogen exprimierte Marker wie PCNA oder Ki-67 verwendet, die allerdings nur Zellen in einer bestimmten Phase des Zellzyklus erfassen, d.h. das beobachtete Zeitfenster der Zellproliferation ist sehr eng (ALISON, 1995). Bei Organen mit niedriger proliferativer Aktivität resultiert aus solchen Messungen daher ein niedriger prozentualer Anteil positiver Zellen, welcher mit einem großen statistischen Fehler (STÖCKER und SCHMID, 1973) behaftet sein kann. Außerdem bleibt weiterhin fraglich, ob die Exprimierung endogener Proteine wie PCNA und Ki-67 ausschließlich während des Zellzyklus erfolgt und nicht auch beispielsweise im Rahmen von Zellreparaturmechanismen (YU et al., 1992).

Für die BrdU-Applikation wurde in unserem Versuch die Verwendung von osmotischen Minipumpen gewählt. Trotz des Zeit- und Kostenaufwandes wird hierbei eine durch keine anderen Applikationsart (Injektion, Trinkwasser, subkutan implantierte "Slow release pellets") erzielbare gleichmäßige Zufuhr des Markers über den Versuchszeitraum hinweg gewährleistet.

Ob und welcher direkte Effekt von BrdU auf die Nebennierenrinde und deren Proliferation besteht, wird von MALENDOWICZ et al. (1997a, 1997b) sowie MALENDOWICZ und NUSSDORFER (1996) untersucht.

Nach einmaliger i.p. Injektion von 5mg/kg BrdU stellen MALENDOWICZ und NUSSDORFER (1996) einen deutlichen Anstieg der Kortikosteron-, Aldosteron- und ACTH-Blutspiegel fest. Die minimale effektive Dosis liegt bei 1,25mg/kg für einen Aldosteronanstieg und bei 2,5mg/kg für ACTH und Kortikosteron (MALENDOWICZ et al. 1997b).

MALENDOWICZ et al. (1997a) stellen fest, daß BrdU keinen Einfluß auf die mitotische Aktivität der Nebennierenrinde adulter Tiere ausübt, bei induzierter erhöhter mitotischer Aktivität nach Enukleation (d.h. Entfernung der Nebenniere bis auf das Kapselgeewebe) diese jedoch mindert. Dies führen sie auf einen differenzierungs-fördernden Effekt von BrdU zurück, der mit der Proliferationsrate invers korreliert.

Wiederholt wird von den oben aufgeführten Autoren daher Vorsicht bei der Interpretation von kinetischen Studien über die Nebennierenrinde mittels BrdU gefordert. Andererseits beruhen ihre beobachteten Ergebnisse lediglich auf Bolus-Injektionen von BrdU; nicht untersucht wurde der Effekt einer kontinuierlichen Applikation geringer BrdU-Mengen über osmotische Minipumpen. Für eine Proliferationsstudie, deren Ziel die Detektion eines Substanzeffektes darstellt, und deren Tiergruppen alle mit BrdU behandelt werden, ist von einer gleichartigen Beeinflussung der Meßergebnisse aller Tiergruppen auszugehen.

5.3.2 Immunhistologischer BrdU-Nachweis

Das verwendete Färbeprotokoll ist ein entscheidender Faktor für das Färbeergebnis und damit für die Anzahl positiv gefärbter Zellen. Der auf jedem Präparat vorhandene Darmabschnitt dient als Positivkontrolle und soll nach 7-tägiger BrdU-Exposition ein deutliches positives Signal aller Darmepithelzellen aufweisen. Für eine automatisierte morphometrische Auswertung muß ein optimaler Kontrast zwischen positiven und negativen Zellen sowie dem Interstitium, eine minimale unspezifische Hintergrundfärbung und ein optimaler Kontrast zu dem DAB-Präzipitat bei gleichzeitiger guter Erkennbarkeit der Zellkerne erzielt werden.

Entscheidende Faktoren für das Färberesultat sind der Proteinvorverdau sowie die verwendete Konzentration des Primärantikörpers. In einer Verdünnungsreihe wurde die optimale Antikörperverdünnung von 1:100 ermittelt.

Der Effekt des Proteinvorverdaus beruht auf einer Erleichterung der anschließenden DNA-Denaturierung mit Salzsäure. Neben der Aufspaltung von durch die Formalinfixation entstandenen Aldehydvernetzungen erfolgt ein Verdau der Chromatin-assoziierten Proteine. Die Verwendung einer Proteaselösung erbrachte hierbei die besten Ergebnisse. Der anfangs verwendete Trypsinverdau resultierte in einer deutlich schwächeren Braunfärbung positiver Kerne und war wesentlich arbeitsaufwendiger und "störanfälliger". Von Vorteil war die Nutzung eines Immunostainers, da dieser 40 Präparate gleichzeitig mit exakt dem gleichen Zeitfenster für die einzelnen Inkubationsschritte bearbeiten kann; eine Genauigkeit welche bei Durchführung "per Hand" nicht möglich ist.

5.3.3 Morphometrische Auswertestrategie

Die im Vorversuch durchgeführte Varianzkomponentenanalyse zeigte, daß die Varianz der Meßwerte hauptsächlich durch die Anzahl der ausgewerteten Zellkerne und durch die Tiere selbst determiniert wird. Bei 1000 Zellkernen pro Zone wird eine Varianzreduktion erzielt, die einen höheren Arbeitsaufwand nicht mehr rechtfertigt. MORRIS (1993) beschreibt den Einfluß der ausgewerteten Anzahl der Zellkerne auf das Meßresultat und kommt ebenfalls zu dem Schluss, daß die Varianz der Meßergebnisse nicht beliebig durch eine Erhöhung der ausgewerteten Zellkernzahl reduziert werden kann. Im Hinblick auf individuelle Unterschiede ergab sich, daß eine Gruppengröße von 10 Tieren für die Untersuchung der Nebennierenproliferation optimal ist. GOLDSWORTHY et al. (1991) empfehlen für Zellproliferationsmessungen eine Gruppengröße von mindestens 5 Tieren.

In der Literatur wird bei der morphometrischen Methodik oftmals ohne nähere Begründung die Auswertestrategie dargelegt. Ob und wie diese Methodik jeweils etabliert und auf ihre Sensitivität geprüft wurde, ist dabei meist nicht nachzuvollziehen. In der Literatur wird der Wert 1000 Zellkerne pro Zone sehr häufig aufgeführt (z.B. LAKE et al., 1997; JONES et al., 1994; LARSON et al., 1994). Ob dies eine rein zufällige Festlegung ist, oder ob dieser Wert auch für andere Organe für die Ermittlung eines möglichst genauen Meßergebnisses optimal ist, bleibt unklar.

Pro Tier ist es ausreichend nur ein Nebennieren-Präparat auszuwerten, d.h. unterschiedliche Schnittebenen unterscheiden sich kaum in ihrer proliferativen Aktivität. Auch der Auswerter selbst beeinflußt das Meßergebnis. Jedoch ist dieser Faktor bei entsprechend sorgfältiger Vorgehensweise zu vernachlässigen. So waren auch mit der im Vorversuch verwendeten einfachen Meßapparatur (Standardmikroskop mit Okularraster) reproduzierbare Messungen zu erzielen.

5.3.4 Vergleich des "Labeling Index" mit Literaturangaben

Die in Kapitel 2.3.3 aufgeführten Werte zum "Labeling Index" von Kontrolltieren variieren aufgrund der sehr unterschiedlichen Versuchsmethoden deutlich. Es unterscheiden sich Marker (³H-Thymidin, BrdU), Expositionszeit ("pulse labeling" oder "continuous labeling"), Applikationsweg (Injektion, Trinkwasser, Pellets, Minipumpe) sowie Alter der Ratten und Rattenstamm. Daher sind Vergleiche mit den von uns ermittelten Werten nur bedingt möglich. Neuere Arbeiten wie JONES und CLARKE (1993) sowie McEWAN et al. (1996) verwendeten BrdU-Minipumpen. JONES und CLARKE (1993) verwendeten eine 2 Tage-

Minipumpe und ermitteln trotz der Verwendung von jüngeren Tieren (6 und 7 Wochen alt) kleinere "Labeling-Indizes" als bei den hier verwendeten 9 und 12 Wochen alten Tieren. McEWAN et al. (1996) setzen in ihrem Versuch adulte Tiere ein. Durch eine vierzehntägige Markerapplikation werden relativ große Werte erzielt. Sie ermitteln so einen LI von 12 in der Zona fasciculata, welcher mit dem hier festgestellten LI von 14,74 bei den 12 Wochen alten Tieren vergleichbar ist.

Sowohl bei den 9 Wochen als auch bei den 12 Wochen alten Tieren unserer Studie wurde der jeweils größte "Labeling Index" in der Zona fasciculata festgestellt. Dies berichten auch REITER und PIZZARELLO (1966), welche den größten "Labeling Index" in der äußeren Zona fasciculata bei den 16 Wochen alten Tieren feststellen und JONES und CLARKE (1993) bei 6 Wochen alten Tieren. In der übrigen Literatur werden die größten "Labeling-Indizes" jeweils in der Zona glomerulosa gemessen. Dies hängt entscheidend mit der verwendeten Meßmethodik zusammen. Da die Zona fasciculata nahezu 70% des Gesamtkortex umfaßt und insbesondere der rindennahe Anteil eine deutlich höhere proliferative Aktivität aufweist, wird die Platzierung von Meßfeldern das Ergebnis je Zone beeinflussen. Die gleiche Feststellung kann für die Zona reticularis getroffen werden, deren von uns ermittelte LIs nahezu denen der Zona glomerulosa entsprachen. Dies widerspricht der Annahme, daß die Zona reticularis eine wenig teilungsaktive Schicht mit Rekrutierung von Zona fasciculata-Zellen für die Aufrechterhaltung ihres Zellbedarfes darstellt (WRIGHT et al., 1973; FORD und YOUNG, 1963; GOTTSCHAU, 1883). In der Literatur werden zwar ebenfalls nicht unerhebliche LIs in der Zona reticularis beobachtet, allerdings ist regelmäßig der niedrigste LI in dieser Zone festgestellt worden. Eine Ausnahme hiervon stellen die16 Wochen alten Tiere bei REITER und PIZZARELLO (1966) dar.

Aus den hier aufgeführten Unterschieden zwischen Literaturangaben unseren Werten wird deutlich, wie stark die jeweiligen Werte mit dem verwendeten Material und den jeweiligen Meßbedingungen schwanken. Die eigene Kontrollgruppe jeder Zellproliferationsmessung wird daher das Maß zur Detektion von Behandlungseffekten sein.

5.4 BrdU-immunhistologische Auswertung

Nach Ermittlung der Nebennierengewichte sollte in der vorliegenden Arbeit über die Proliferationsmessung geklärt werden, ob in der ACTH-Gruppe die zu erwartende Erhöhung der Zellproliferation auftritt, oder ob lediglich eine Hypertrophie und Hyperämisierung für die Gewichtserhöhung veranwortlich ist. Anhand der Nebennierengewichte ist in der "High Dose"-Gruppe zumindest nach einwöchiger Behandlung ein Effekt auf die Zellproliferation möglich, während in der Dexamethason- und "Low Dose"-Gruppe kein Effekt zu erwarten ist. Anders als der BrdU-Nachweis kann eine reine Gewichtsmessung jedoch keine Aussage darüber machen, wo das entsprechende morphologische Korrelat lokalisiert ist, d.h. welche Zone mit einer Hyperplasie bzw. Hypertrophie reagiert. Da eine hohe Zellproliferation bei gleichzeitig hohem Zellverlust zu keiner Gewichtsveränderung führen muss, soll in diesem Zusammenhang auch die Messung der Apoptoserate bei den entpechenden Behandlungsgruppen Aufschluß über zellkinetische Veränderungen liefern (siehe Kap. 5.6.).

5.4.1 Proliferationsdaten der einzelnen Behandlungsgruppen

Die ACTH-Gruppe zeigt nach einwöchiger Behandlung eine statistisch signifikante Erhöhung der LIs in der Zona glomerulosa und der Zona fasciculata. Die LIs haben sich mit einem Mittelwert von 29 für die Zona glomerulosa im Vergleich mit dem Kontroll-LI von 15 fast verdoppelt. Nach 4 Wochen zeigt sich nahezu eine Verdreifachung. Der Unterschied zwischen Wochen 1 (LI=29) und Woche 4 (LI=33) ist nicht sehr ausgeprägt, zeigt aber im Gegensatz zu den Kontrolltieren (Abnahme von 15 auf 13) einen Anstieg. Die ACTH-Behandlung resultiert also über den gesamten Versuchszeitraum hinweg in einer anhaltenden proliferationsfördernden Wirkung auf die Zona glomerulosa, welche mit der Behandlungsdauer noch ausgeprägter wird. Die Reduktion der Zellproliferation mit zunehmendem Alter wird unter ACTH-Behandlung aufgehoben, da die 12 Wochen alten Tiere keine Abnahme der LIs gegenüber den 9 Wochen alten Tieren zeigen.

Auch in der Zona fasciculata wird unter ACTH-Behandlung eine deutliche, statistisch siginifikante Erhöhung der LIs in Woche 1 und Woche 4 sichtbar. Nach einer Woche ist der Mittelwert der LIs in der Zona fasciculata größer als in der Zona glomerulosa. Nach 4 Wochen liegt der LI unter dem Ein-Wochenwert, während in der Zona glomerulosa der LI mit der Zeit weiter zunimmt. Dies könnte damit zusammenhängen, daß das Teilungspotential der Zona fasciculata bereits nach einer Woche maximal ausgeschöpft ist. ACTH bewirkt sowohl Hypertrophie als auch nachfolgende Hyperplasie (ANDREIS et al., 1989) der Zona

fasciculata, so daß je nach Beobachtungszeitpunkt der eine oder andere Vorgang überwiegt. Laut ANDREIS et al. (1989) ist ein erster Übergang von Hypertrophie zu Hyperplasie nach 5-7 Behandlungstagen festzustellen. Dies würde also für unsere Studie zu dem hohen Anteil von S-Phase Zelle nach einwöchiger ACTH-Behandlung passen. Die etwas niedrigeren LIs nach vierwöchiger Behandlung sprechen für ein Nachlassen hyperplastischer Vorgänge in der Zona fasciuclata. Da zu diesem Zeitpunkt in der Zona glomerulosa die größten LIs festgestellt werden können, scheint diese Zone für den Zellbedarf der Zona fasciculata mehr und mehr aufzukommen, während die Zona fasciculata den erhöhten funktionellen Anforderungen nachkommt. Im Vergleich mit den Kontrolltieren ist die Erhöhung der LIs deutlich, so daß die Ansicht, daß ACTH eine kontinuierliche stimulierende Wirkung auf die Zellproliferation der Nebennierenrinde ausübt (MALENDOWICZ, 1986; VAZIR et al., 1981; PAYET et al., 1980) durch unsere Ergebnisse bestätigt wird.

Eine statistisch signifikante Erhöhung gegenüber den Kontrollwerten wird auch in der Zona reticularis nach einwöchiger Behandlung sichtbar. Für dieses Phänomen gibt es, wie unten noch näher aufgeführt wird, mehrere Erklärungsansätze. Zum einen ist aufgrund der kontinuierlichen Markerapplikation über 7 Tage eine Migration von markierten Zona fasciculata-Zellen in die Zona reticularis möglich. Zum anderen finden sich in der Zona reticularis auch sogenannte Zona fasciculata-Inseln, und schließlich ist auch eine direkte proliferationsfördernde Wirkung von ACTH auf Zona reticularis-Zellen möglich.

In der "High Dose"-Gruppe wurde in der Zona glomerulosa in Woche 1 ein LI von 28 festgestellt, welcher in etwa dem der ACTH-Gruppe entspricht und damit statistisch signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht ist. Dieser Wert liegt um ca. 40% über dem in Woche 4 (LI=17). Daraus folgt, daß nach anfänglicher Proliferationsstimulation unter Substanzgabe schon nach 4 Wochen adaptative Phänomene einer weiteren Proliferationssteigerung entgegenwirken. Somit ist die anfängliche Proliferationssteigerung ausreichend, den unter Substanzgabe auftretenden gesteigerten funktionellen Anforderungen zu entsprechen. Nach vier Wochen ist eine Homöostase eingetreten, bei der unter Substanzgabe kein erhöhter Zellbedarf mehr augelöst wird.

In der Zona fasciculata zeigt sich ein ähnliches Bild wie in der Zona glomerulosa. Nach einwöchiger Behandlung sind die LIs gegenüber der Kontrolle statistisch signifikant erhöht, nach vierwöchiger Behandlung ist jedoch kein Unterschied mehr feststellbar. Eine Erklärung für dieses Phänomen liefern *in vitro* Beobachtungen an Schweinenebennierenzellen, mittels derer belegt werden konnte, daß die untersuchte EMD-Substanz die 11β-Hydroxylase und

damit die Synthese von Kortikosteron in hohen Dosierungen hemmt. Die gehemmte Syntheseleistung der Zona fasciculata-Zellen wird *in vivo*, zumindest vorübergehend zu einer gesteigerten ACTH-Ausschüttung führen, um die normale Syntheseleistung der Nebenniere wieder herzustellen. ACTH wiederum steigert die Zellproliferationsrate in der Zona fasciculata. Jedoch kann auch eine direkte temporäre mitogene Wirkung der untersuchten Substanz nicht vollständig ausgeschlossen werden. Diese wäre dann jedoch nur ein initiales Phänomen, daß am besten durch adaptative Phänomene aufgrund einer Enzymhemmung als durch direkte, rezeptorvermittelte Stimulation erklärt werden kann.

In der Zona reticularis ist kein Effekt gegenüber der Kontrollgruppe auszumachen.

Die "Low Dose"-Gruppe zeigt in der Zona glomerulosa ausschließlich in Woche 4 eine statistisch siginifkante Erhöhung der LIs, welche mit einem Mittelwert von 17 identisch zu dem der "High Dose"-Gruppe ist, und um ca. 30% über dem Kontrollwert liegt. Ein möglicher Effekt niedriger Dosierungen auf die Zona glomerulosa nach chronischer Applikation kann nicht vollständig ausgeschlossen werden. Da sich aber in ansonsten keiner Nebennierenrindenzone ein Effekt in der "Low Dose"-Gruppe zeigte, besitzt diese Dosierung der Testsubstanz vermutlich eine in Bezug auf das Gesamtorgan zu vernachlässigende proliferationsstimulierende Wirkung.

Die "Low Dose"-Gruppe weist zu beiden Untersuchungszeitpunkten keinen Effekt in der Zona fasciculata und in der Zona reticularis gegenüber der Kontrolle auf.

Die **Dexamethason-Gruppe** zeigt in der <u>Zona glomerulosa</u> keine statistisch signifikanten Abweichungen gegenüber den Kontrollwerten nach einwöchiger und vierwöchiger Behandlung. Dexamethason besitzt keine direkte hemmende Wirkung auf Zellen vom Zona glomerulosa-Typ, da die Aldosteronsynthese nicht beeinflusst wird. Dennoch wird laut LESNIEWSKA et al. (1992) unter Dexamethason-Behandlung gerade in der Zona glomerulosa die Zellproliferation gehemmt, dies jedoch bei Dosierungen von 150µg/kg/Tag, welche um das 15fache über der hier gewählten Dosierung von 10µg/kg/Tag liegt.

Demgegenüber zeigt sich zu beiden Untersuchungszeitpunkten eine deutliche, statistisch signifikante Erniedrigung der LIs in der Zona fasciculata. Diese Zone stellt die Zielzone für die hemmende Wirkung von Dexamethason dar. Wie von LESNIEWSKA et al. (1992), MALENDOWICZ et al. (1992) und STACHOWIAK et al. (1990) ausgeführt, betrifft die durch Dexamethason induzierte Atrophie die inneren Nebennierenrindenanteile. Auch eine Hemmung der Zellproliferation konnte bereits mehrfach bestätigt werden (LESNIEWSKA et al., 1992; MALENDOWICZ et al. 1992; STACHOWIAK et al., 1990; WRIGHT et al., 1974).

Der genaue Mechanismus für diese Proliferationshemmung ist jedoch nicht geklärt. Zum einen spielen vermutlich die erniedrigten CRH und ACTH-Konzentrationen eine wichtige Rolle, zum anderen wirkt Dexamethason auch direkt auf die Nebennierenrindenzellen (DeKLOET und REUL, 1987; WRIGHT et al., 1974) und induziert eine Hemmung der Proteinbiosynthese (NUSSDORFER, 1986). Die Kortikosteronproduktion wird inhibiert. Diese hemmende Wirkung auf die normale Syntheseleistung resultiert in einem reduzierten Zellbedarf und somit in einer verminderten Zellproliferation.

In der <u>Zona reticularis</u> wird wie in der Zona fasciculata eine Abnahme der LIs in Woche 1 festgestellt. Dieses Ergebnis korreliert mit den Beobachtungen in der ACTH-Gruppe, welche eine Erhöhung der LIs in Woche 1 aufweist. Die Erniedrigung der LIs in der Zona reticularis spiegelt also die zu ACTH gegensätzliche Wirkung wieder.

5.4.2 Proliferationsdaten der einzelnen Zonen

Zona glomerulosa

Die Ergebnisse in der ACTH- und "High Dose"-Gruppe zeigen das proliferationsfördernde Potential beider Substanzen und bestärken die Ansicht, daß die Zona glomerulosa eine Art "Reserveschicht" für Zellen des Zona fasciculata-Types darstellt, da für beide Substanzen aufgrund ihres Wirkprofiles eine direkte stimulierende Wirkung auf Zellen der Zona glomerulosa ausgeschlossen werden kann. Auch die lichtmikroskopische Untersuchung zeigt, daß sowohl unter ACTH-Behandlung als auch in der "High Dose"-Gruppe typische Zona glomerulosa Zellen nach und nach verschwinden, und durch solche vom Zona fasciculata-Typ ersetzt werden. Diese Ergebnisse entsprechen denen von MAZZOCCHI et al. (1986), PUDNEY et al. (1984), VAZIR et al. (1981) sowie McDOUGALL et al. (1980) unter ACTH-Behandlung.

Zona fasciculata

In der Zona fasciculata der Kontrollgruppe fanden sich sowohl nach einer Woche als auch nach vier Wochen höhere LIs als in der Zona glomerulosa und reticularis. Dies ist ein in der Literatur selten beschriebenes Resultat. Meist wird die Zona glomerulosa als die proliferationsaktivste Nebennierenrindenzone beschrieben (McEWAN at al., 1996; WRIGHT und VONCINA, 1977). Hierbei spielt die Plazierung und Zuordnung der Meßfelder eine entscheidende Rolle, da die äußere Zona fasciculata mehr BrdU-positive Zellkerne aufweist, als innere Anteile. Weiterhin muß der Tatsache Rechnung getragen werden, daß die BrdU-Methodik nicht nur Zellen detektiert, die sich aktuell in der S-Phase befinden, sondern auch

solche, die während der Marker-Applikation (in diesem Fall 7 Tage) eine S-Phase durchlaufen haben. Ein "Verdünnungseffekt" der BrdU-Markierung tritt im Gegensatz zur Einmalapplikation nicht auf, denn nach einer stattfindenden Zellteilung wird das für die DNA-Verdopplung benötigte Thymidin erneut durch BrdU ersetzt, da dieses über den gesamten Versuchszeitraum hinweg im Überschuß vorliegt. Es ist durchaus vorstellbar, daß Zellen, welche im Bereich der Zona glomerulosa eine S-Phase durchlaufen haben, anschließend im Rahmen einer zentripetalen Migration in die Zona fasciculata gelangt sind. Daß eine solche Migration bei noch nicht ausgewachsenen Tieren stattfindet, ist eine heute gängige These (NUSSDORFER, 1986; BERTHOLET, 1980; WRIGHT und VONCINA, 1977; WRIGHT at al., 1973; WRIGHT, 1971; FORD und YOUNG, 1963; DIDERHOLM und HELLMAN, 1960a, b). Diese Migration erklärt ihrerseits die höheren LIs in der Zona fasciculata nach BrdU-Langzeitapplikation.

Zona reticularis

Die Zona reticularis hat sich in allen Gruppen als diejenige Zone mit der größten Streuung zwischen den Einzelmessungen herausgestellt. Auch zeigten sich in dieser Zone erstaunlich hohe LIs, welche nur geringfügig niedriger als in der Zona glomerulosa ausfielen. Dies ist, wie bereits oben ausgeführt (siehe Kap. 5.3.4) ein selten beschriebenes Phänomen. Unsere Ergebnisse lassen sich zum einen darauf zurückführen, daß die untersuchten Tiere noch relativ jung waren (8 bzw. 11 Wochen alt), und in diesem Alter vermutlich jede Zone für ihren Zellbedarf zumindest teilweise selbst aufkommt. Andererseits sind auch Migrationsphänomene, wie bereits für die Zona fasciculata dargestellt, nicht auszuschließen. Dies bedeutet, daß ein gewisser Anteil der BrdU positiven Zellen der Zona reticularis ursprünglich aus einer anderen Zone stammen könnte. Ein weiterer Faktor, welcher das Zählergebnis beeinflusst haben könnte, beruht auf der Tatsache, daß häufig sogenannte Zona fasciculata-Inseln unmittelbar an der Markgrenze zu finden sind. Hierbei handelt es sich um Zellanhäufungen, die in ihrer Morphologie, ihrem Enzymmuster und womöglich ihrem Teilungspotential "normalen" Zona fasciculata Zellen entsprechen, aber in der Zona reticularis liegen. Solche Zellen wurden als Zona reticularis-Zellen ausgewertet, da ansonsten bei einzelnen Tieren eine Zellzahl von 1000 für die Zona reticularis nicht hätte erzielt werden können. Im allgemeinen traten diese Inseln bei allen Tieren jedoch in einer vergleichbaren Inzidenz auf, so daß das Meßergebnis bei allen Tieren in gleicher Weise beeinflusst wurde.

5.4.3 Proliferationsdaten der rechten und linken Nebenniere

In allen Zonen werden zu den beiden untersuchten Zeitpunkten statistisch signifikante Unterschiede zwischen rechter und linker Nebenniere deutlich.

Rechtsseitig wird ein höherer "Labeling Index" in der Zona glomerulosa und in der Zona fasciculata beobachtet. In der Zona glomerulosa ist dieser Unterschied nach vierwöchiger Behandlungsdauer deutlicher als in Woche 1. In der Zona fasciculata ist er dagegen in Woche 4 nicht so deutlich wie nach einwöchiger Behandlung.

Für die Zona reticularis ergibt sich demgegenüber ein anderes Bild. Hier werden zu beiden Untersuchungszeitpunkten in der linken Nebenniere höhere LIs im Vergleich zu der rechten Nebenniere beobachtet. Nach vierwöchiger Behandlung ist dieser Unterschied ausgeprägter.

In der Aufsummation aller Zonen ergibt sich kein stastitisch signifikanter Unterschied mehr zwischen rechter und linker Nebenniere, so daß die proliferative Aktivität des Gesamtorgans unabhängig von der jeweiligen anatomischen Lage ist.

Die Beobachtung, daß ein Unterschied in der proliferativen Aktivität der rechten und linken Nebenniere der Kontrollgruppe besteht, stellt einen überraschenden Befund dar und wurde bisher noch nicht in der Literatur beschrieben. Eine Erklärung für diese zonal unterschiedliche proliferative Aktivität der rechten bzw. linken Nebenniere wäre rein spekulativ. Eine unterschiedliche Blutversorgung könnte eine Rolle spielen. In der Humanmedizin werden einseitige Nebennierenhyperplasien beschrieben, deren Ätiologie ebenfalls unklar ist (HAENEL und HERMAYER, 2000). Als Konsequenz ergibt sich hieraus, daß in Proliferationsstudien eine entsprechende Kennzeichnung der entnommenen Nebennieren bzw.

5.5 Nebennierengewichte und "Labeling-Indizes"

Bei gleichzeitiger Betrachtung der LIs der unterschiedlichen Nebennierenrindenzonen und der relativen Gewichte des Gesamtorgans zeigt sich, daß in den meisten Fällen ein deutlicher Zusammenhang zwischen beiden besteht. Dies gilt insbesondere für die ACTH-Gruppe, bei der die deutliche Erhöhung der LIs in allen Rindenzonen (bis auf die Zona reticularis in Woche 4) sich in einer Gewichtserhöhung sowohl absolut als auch relativ wiederspiegelt. Wie bereits in in Kapitel 2.3.5.1 dargestellt wurde, führt ACTH initial zu einer Hypertrophie der Rindenzellen aufgrund erhöhter Steroidsekretion, welche dann in eine erhöhte proliferative Aktivität übergeht (STACHOWIAK et al., 1990; MALENDOWICZ, 1986; NUSSDORFER, 1986; VAZIR et al., 1981; BELLONI et al., 1978). Die Nebennierengewichtserhöhung

spiegelt also beide Phänomene wieder, sowohl die Hypertrophie als auch die Hyperplasie. Lediglich die Zona reticularis in Woche 4 zeigte unveränderte LIs, doch dies hatte keinen Einfluß auf die signifikant höheren absoluten und relativen Nebennierengewichte.

Auch in der **"High Dose"-Gruppe** zeigt sich ein Zusammenhang zwischen Gewichten und LIs. Die signifkante Erhöhung der LIs in der Zona glomerulosa und der Zona fasciculata spiegelt sich in einem deutlich erhöhten relativen Organggewicht ($p \le 0,001$) und in einem weniger deutlich erhöhten absoluten Organgewicht ($p \le 0,05$) wieder. In Woche 4 weisen sowohl die absoluten als auch die relativen Gewichte keine signifikanten Abweichungen gegenüber der Kontrolle mehr auf, und ebenso bewegen sich die LIs nunmehr im Bereich der Kontrollgruppenwerte. Hier zeigt sich zum einen, daß bei der untersuchten Substanz in der hohen Dosierung eine initiale und deutliche relative Gewichtserhöhung aufgrund einer gesteigerten proliferativen Aktivität induziert wird und zum anderen, daß dieser Effekt nach vierwöchiger Behandlung vollständig reversibel ist. Die **"Low Dose"-Gruppe** zeigt erwartungsgemäß keine Behandlungseffekte.

Die **Dexamethason-Gruppe** zeigt in Bezug auf die proliferative Aktivität nur in der Zona fasciculata eine signifikante Erniedrigung gegenüber der Kontrolle. Allerdings waren die absoluten und relativen Nebennierengewichte sowohl in Woche 1 als auch in Woche 4 gegenüber Kontrollwerten unverändert. Die zwar deutliche, aber auf die Zona fasciculata begrenzte Proliferationsminderung führt demnach nicht zu einer Verminderung des Organgewichtes. Daher ist eine Proliferationsmessung insbesondere bei subtilen bzw. zonal unterschiedlichen Effekten auf die Nebennierenrinde im Vergleich zu einer reinen Gewichtsbestimmung die sensitivere Methode.

5.6 Apoptose der Nebennierenrinde

KERR (1971a) beschreibt als erster das Auftreten von Apoptosen ("shrinkage necrosis") in der Nebennierenrinde der Ratte und stellt fest, daß die Morphologie apoptotischer Zellen mit derjenigen apoptotischer Zellen in der Leber vergleichbar ist (KERR, 1971b). Darüber hinaus beobachtet er ein gehäuftes Auftreten von Apoptosen in der Zona reticularis und in dem inneren Anteil der Zona fasciculata.

WYLLIE et al. (1973a) untersuchen die Häufigkeit von Apoptosen in der Nebennierenrinde der Sprague-Dawley Ratte bei fetalen und adulten Tieren. Eine Auswertung nehmen sie sowohl lichtmikroskopisch als auch elektronenmikroskopisch vor. Darüber hinaus wird der Einfluß einer Prednisolon- sowie einer ACTH-Behandlung von ihnen untersucht. Die von ihnen beobachtete Morphologie der apoptotischen Zellen stimmt weitgehend mit den auch für andere Zelltypen beschriebenen Veränderungen überein. Da die Nebenniere von einem sinusoidalen Maschenwerk durchzogen wird, finden sich die apoptotischen Körperchen insbesondere perisinusoidal und in den Sinusoiden selbst. Oftmals ist dabei lichtmikroskopisch nicht feststellbar, ob apoptotische Körperchen phagozytiert worden sind oder extrazellulär liegen.

Laut WYLLIE et al. (1973a) wurden sehr wenig Apoptosen in adulten Sprague-Dawley Ratten der Kontrollgruppe beobachtet und in fetalen Nebennieren der Kontrollgruppe nahezu überhaupt nicht. Wenn Apoptosen vorgefunden werden konnten, dann waren sie fast ausschließlich auf den inneren Anteil der Nebennierenrinde beschränkt, also auf die Zona reticularis bzw. den Übergang zwischen Zona reticularis und Zona fasciculata. In fetalen Nebennieren war diese zonale Distribution jedoch weniger deutlich ausgeprägt, obwohl auch hier in der Zona glomerulosa nahezu niemals Apoptosen vorgefunden werden konnten.

Demgegenüber stehen Untersuchungen von WOLKERSDÖRFER at al. (1996a und b) an menschlichen Nebennieren. Mit Hilfe der TUNEL-Methode wird von ihnen der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen bestimmt. Überraschenderweise stellen sie in der Zona glomerulosa mit über 50% positiven Zellen die höchste Anzahl apoptotischer Zellen fest, welche zur Zona reticularis hin (knapp 4% positive Zellen) kontinuierlich abnimmt. Die unterschiedlichen Ergebnisse gegenüber anderen Forschern (SASANO et al. 1995) führen sie auf eine unterschiedliche technische Methodik zurück. Trotzdem erscheint ein durchschnittlicher apoptotischer Index von 20% ungewöhnlich hoch gegenüber Messungen anderer Forscher, sowohl in der Nebenniere als auch in anderen Geweben.

5.6.1 TUNEL-Methodik

Die Spezifität der TUNEL-Methodik wurde in Vorversuchen intensiv untersucht. Trotz technisch einwandfreier Präparate bleibt zu berücksichtigen, daß auch Artefakte zu DNA-Strangbrüchen führen können. Daher ist es weiterhin umstritten, ob der Nachweis TUNEL-positiver, morphologisch jedoch unveränderter Zellen, ein Artefakt darstellt oder ein frühes Stadium der Apoptose.

Um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, ist insbesondere die verwendete Konzentration des TdT-Enzyms und die Konzentration des proteolytischen Enzyms (meist Proteinase K) sorgfältig auszuwählen (KOCKX et al., 1998; WIJSMAN et al., 1993).

Eine proteolytische Behandlung ist notwendig, da die DNA-Hyperkondensation während der Apoptose und die Proteinumgebung der DNA eine Interaktion des TdT-Enzyms mit den DNA-Brüchen erschwert oder verhindert. Zur Freilegung der DNA-Brüche wird neben einer Proteinase-K Anwendung auch eine Mikrowellenvorbehandlung durchgeführt (LABAT-MOLEUR et al., 1998).

Auch die Gewebefixation beeinflusst die Interaktion der TUNEL-Reagentien mit der DNA negativ (LABAT-MOLEUR et al., 1998). Somit stellen Art und Dauer der Fixation sowie die Gewebegröße Einflußfaktoren auf das Färbeergebnis dar.

Zu berücksichtigen ist, daß alle Methoden, die der Freilegung von DNA-Brüchen dienen, auch deren Entstehung bewirken können, so daß eine generelle Färbung morphologisch unauffälliger Zellkerne resultiert (LABAT-MOLEUR et al., 1998).

Für die Spezifität der angewandten Technik spricht bei unseren Ergebnissen, daß bei allen untersuchten Nebennieren die höchste Anzahl TUNEL-positiver Zellen in der Zona reticularis festgestellt wurde. Für die Apoptose der Nebennierenrinde gilt generell die Meinung, daß in der Zona reticularis die höchste Inzidenz im Vergleich zu den übrigen Rindenzonen vorzufinden sei (CECCATELLI et al., 1995; WYLLIE et al. 1973a,b; KERR et al., 1972). In diesem wichtigen Punkt stimmen also unsere Ergebnisse der TUNEL-Methodik mit der Literatur zur Apoptose der Nebennierenrinde überein. Für die Zona fasciculata wurde aus unseren Messungen ersichtlich, daß die meisten TUNEL-positiven Zellen an der Grenze zur Zona reticularis lagen, was in der Literatur auch für apoptotische Zellen beschrieben wird (WYLLIE et al. 1973a,b). In der Zona glomerulosa werden in der Literatur demgegenüber nahezu keine Apoptosen beobachtet (CECCATELLI et al., 1995; WYLLIE et al. 1973a,b; KERR et al., 1973a,b; KERR et al., 1972), und ebenso konnten auch wir nahezu keine TUNEL-positiven Zellen in der Zona glomerulosa feststellen.

Eine Ausnahme hiervon stellen die Ergebnisse von WOLKERSDÖRFER et al. (1995, 1996) dar, die mit 50% TUNEL-positive Zellen den höchsten Wert in der Zona glomerulosa festgestellt haben. Es ist ungewöhnlich, daß die Zona glomerulosa den höchsten Anteil TUNEL-positiver Zellen aufweist und auch ein solch hoher Wert findet sich sonst in keiner Literaturangabe. WOLKERSDÖRFER et al. (1995, 1996) diskutieren, daß ihre Ergebnisse aufgrund der technischen Methodik und/oder einer unspezifischen positiven Reaktion von Zellen in der S-Phase zustande kommen könnten.

Insgesamt ist es ein wichtiger Hinweis für die Spezifität der von uns angewandten Methodik, daß das Verteilungsmuster TUNEL-positiver Zellen in der Nebennierenrinde mit dem in der Literatur (bis auf WOLKERSDÖRFER et al. 1995, 1996) beschriebenen Verteilungsmuster apoptotischer Zellen übereinstimmt.

5.6.2 TUNEL-positive Zellen in den einzelnen Behandlungsgruppen

In allen Gruppen steigt die Anzahl TUNEL-positiver Zellen von der äußeren Zona glomerulosa hin zur inneren Zona reticularis.

In der ACTH-Gruppe wird zu beiden Zeitpunkten in der Zona fasciculata und in der Zona reticularis eine statistisch signifikante Erhöhung gegenüber Kontrollwerten beobachtet. Diese sind jeweils in Woche 1 weniger stark ausgeprägt als in Woche 4. Auch in der "High Dose"-Gruppe zeigen sich statistisch signifikante Abweichungen gegenüber der Kontrollgruppe in den beiden inneren Nebennierenrindenzonen, dies jedoch nur nach einwöchiger Behandlungsdauer. In der Zona fasciculata sind diese deutlicher als in der Zona reticularis. In der Dexamethason- und der "Low Dose"-Gruppe konnte in keiner der drei untersuchten Zonen und zu keinem der zwei Beobachtungszeitpunkte eine statistisch signifikante Abweichung gegenüber den Kontrollwerten festgestellt werden.

Für die ACTH-Gruppe erscheint die Erhöhung der Anzahl TUNEL-positiver Zellen in der Zona fasciculata und der Zona reticularis sowohl in Woche 1 als auch in Woche 4 ungewöhnlich, da ACTH eine trophische, also lebenserhaltende Wirkung auf die Nebennierenrindenzellen ausüben soll (CECCATELLI et al., 1995; ARENDS und WYLLIE, 1991; WYLLIE et al., 1973a,b). Dies hängt jedoch sehr stark von dem jeweiligen Versuchsaufbau ab. So stellten CECCATELLI et al. (1995) fest, daß unter ACTH-Behandlung die Apoptose von Nebennierenrindenzellen hypophysektomierter Tiere verhindert wird. WYLLIE et al. (1973a) folgern aus ihren Ergebnissen, daß eine

Verminderung der endogenen ACTH-Sekretion (welche bespielsweise zwischen dem 3. und 5. Lebenstag physiologischerweise auftritt), die Anzahl der Apoptosen in der Nebennierenrinde steigert. Somit ist der ACTH-Entzug ("ACTH withdrawal") ein Auslöser für vermehrte Apoptosen. Eine niedrige basale Apoptoseinzidenz wird unter ACTH-Behandlung dagegen nicht weiter vermindert.

Die Wirkungen von ACTH hängen also von der Dauer der Behandlung, der verwendeten Dosis und dem jeweiligen Untersuchungszeitpunkt ab. Wie schon bei der Interpretation der Plasmahormonspiegel (siehe Kap. 5.2) aufgeführt, spielen vermutlich in der vorliegenden Studie "Rebound"-Phänomene eine Rolle. 24 Stunden nach der letzten ACTH-Gabe ist ein zu der primären Wirkung gegensätzlicher Effekt möglich, zumal die verwendete Dosis von 5IU/kg/d zu einer deutlichen Hypertrophie und Hyperplasie des Organs führte. Die Apoptose wiederum dient der Aufrechterhaltung der Homöostase von Geweben und Organen (WOLKERSDÖRFER et al., 1996; CECCATELLI et al., 1995; ARENDS und WYLLIE, 1991; WYLLIE et al., 1973a,b; KERR, 1971a,b). Eine erhöhte Apoptoseinzidenz nach ACTH-Behandlung spiegelt also eine Gegenregulation auf die primäre trophische ACTH-Wirkung wider, und muß daher keine primäre ACTH-Wirkung darstellen.

Ähnliche Überlegungen gelten für die **"High-Dose"-Gruppe**. In dieser Gruppe wurde 24h nach der letzten Substanzgabe eine erhöhte Inzidenz TUNEL-positiver Zellen in der Zona fasciculata in Woche 1 und 4 und in der Zona reticularis in Woche 1 beobachtet. Die Anzahl BrdU-positiver Zellen und damit die Zellproliferation war in Woche 1 in der Zona glomerulosa und der Zona fasciculata erhöht. Ein vermehrtes Auftreten TUNEL-positiver Zellen dient daher auch hier der Gegenregulation und somit der Aufrechterhaltung einer Homöostase. Da die Zellproliferation und die Nebennierengewichte nur in Woche 1 aber nicht in Woche 4 deutlich über den Kontrollwerten lagen, ist auch die Anzahl TUNEL-positiver Zellen in der Zona reticularis bereits in Woche 4 nicht mehr erhöht.

Die **"Low-Dose"-Gruppe** und die **Dexamethason-Gruppe** weisen keine statistisch signifikante Änderung der Anzahl TUNEL-positiver Zellen zu beiden Untersuchungszeitpunkten auf. Für die "Low Dose"-Gruppe war dies zu erwarten, da auch die übrigen Parameter unbeeinflusst blieben.

In der Dexamethason-Gruppe dagegen ist das Ergebnis auf die relativ niedrige gewählte Behandlungsdosis und "Rebound"-Phänomene zurückzuführen. Bei entsprechend höheren Dosierungen (1,5mg/Tag) beobachten WYLLIE et al. (1973a) einen Anstieg der Apoptose, die sie auf eine ACTH-Suppression zurückführen, da bei gleichzeitiger ACTH-Applikation

Apoptoseinzidenz auftrat. keine erhöhte Die zusätzlich ihnen beobachtete von Thymusatrophie zeigt laut WYLLIE et daß al. (1973a), supraphysiologische Glukokortikoidmengen zugeführt wurden, welche ausreichen, die endogene ACTH-Sekretion zu suprimieren. Auch in unserem Versuch lagen die Thymusgewichte zu beiden Untersuchungszeitpunkten deutlich unterhalb der Kontrollwerte. Andererseits waren die ACTH-Blutplasmaspiegel 24h nach der letzten Dexamethasongabe nicht unter Kontrollniveau und deuten daher auf eine bereits abgeklungene Dexamethason-Wirkung hin. Da die Apoptose schon innerhalb von 1-3 Stunden vollständig abgelaufen ist, kann also selbst bei initialer erhöhter Apoptoseinzidenz eine "Normalisierung" 24 Stunden nach Substanzgabe eingetreten sein.

6. ZUSAMMENFASSUNG

- Im ersten Teil der Literaturübersicht werden Zusammenhänge zwischen Zellproliferation und Kanzerogenese, die verschiedenen Methoden zur Proliferationsmessung sowie Methoden und Schwierigkeiten der Apoptosemessung dargestellt. Im zweiten Teil wird die Nebennierenrinde der Ratte im Hinblick auf ihre Physiologie, Zellproliferation, Apoptose und Steroidsynthese, sowie der Einfluß verschiedener inhibitorischer und stimulierender Substanzen auf diese Parameter dargestellt.
- 2. In einem Vorversuch wurde eine Meßstrategie für BrdU-markierte Nebennierenrindenzellen etabliert. Für jede der drei morphologisch und funktionell unabhängigen Rindenzonen wurde getrennt der prozentuale Anteil BrdU-positiver Zellen, der sogenannte "Labeling Index" (LI), ermittelt. Die gewählte Tierzahl, die Dauer der Markerapplikation, die Schnittebenen, unabhängige Zählungen, Wiederholungszählungen und die Anzahl jeweils ausgewerteter Zellkerne beeinflussen das Meßresultat. Mit Hilfe der statistischen Varianzkomponentenanalyse wurde ermittelt, wie ein möglichst genauer Meßwert bei vertretbarem Arbeitsaufwand erzielt werden kann.
- 3. Eine kontinuierliche BrdU-Applikation über 7 Tage mittels einer subkutan implantierten Minipumpe erwies sich als optimal für die Untersuchung der Nebennierenrindenproliferation der Ratte. Eine Gruppengröße von 10 Tieren pro Behandlungsgruppe liefert eine Sensitivität, mit der Unterschiede zwischen Gruppen von ca. 10% mit 90%iger Wahrscheinlichkeit erkannt werden können. Die einmalige Auszählung in einer Präparatebene liefert einen ausreichend genauen Meßwert, wenn für jede der drei Zonen mindestens 1000 Zellkerne ausgewertet werden.
- 4. Es wurden die Wirkungen des physiologischen Nebennierenrindenstimulans ACTH, des synthetischen Glukokortikoids Dexamethason als inhibierende Substanz, sowie eines Aminomethyl-Chroman-Derivats auf die Proliferation und Apoptose der Nebennierenrinde, das absolute und relative Nebennierengewicht sowie die ACTHund Kortikosteronblutplasmaspiegel überprüft. Zwei Untersuchungszeitpunkte, nach einer und nach vier Wochen Behandlungsdauer, sollten Aufschluß über den zeitlichen Verlauf einer möglichen Wirkung liefern. Die Messung der Apoptoserate erfolgte mittels der TUNEL-Methodik.

- 5. Die Kontrollgruppe wies die höchsten LIs in der Zona fasciculata auf. Die Zona glomerulosa und die Zona reticularis waren vergleichbar und zeigten eine niedrigere proliferative Aktivität. Dies spricht gegen die sogenannte Migrationstheorie, laut welcher nur Zellen im Bereich der Zona glomerulosa neue Zellen bilden, welche dann kontinuierlich Richtung Mark weitergeschoben werden.
- 6. In der Kontrollgruppe wurden die rechte und linke Nebenniere ausgewertet und sie wiesen eine unterschiedliche proliferative Aktivität auf. Daher sollten in Proliferationsstudien immer seitengleiche Nebennieren der Gruppen miteinander verglichen werden.
- 7. ACTH rief zu beiden Untersuchungszeitpunkten eine deutliche Nebennierengewichtserhöhung sowie eine gesteigerte Zellproliferation in den beiden äußeren Zonen hervor. Die Zona glomerulosa wurde zu Zellen vom Zona fasciculata Typ transformiert, ein Phänomen, daß auch in der Literatur beschrieben wird. Die Anzahl der apoptotischen Zellen nahm 24 Stunden nach der letzten ACTH-Applikation zu. Dies wurde als Gegenregulation auf die primäre trophische ACTH-Wirkung gewertet. Diese Interpretation wird durch die 24 Stunden nach der letzten Substanzapplikation gewonnenen Kortikosteron- und ACTH-Blutplasmaspiegel bestärkt, da hier ebenfalls "Rebound-Phänomene" sichtbar werden.
- 8. Dexamethason führte zu keinen Nebennierengewichtsveränderungen, zeigt aber zu beiden Untersuchungzeitpunkten eine erniedrigte Zellproliferation in der Zona fasciculata. Hier erweist sich die Proliferationsmessung als die sensitivere Methode und es wird deutlich, daß eine zonal getrennte Messung für die Detektion eines subtilen Effektes unbedingt erforderlich ist, insbesondere, wenn Organkompartimente unterschiedliche Funktionen wahrnehmen.
- 9. Das Aminomethyl-Chroman wurde in einer niedrigen und hohen Dosis geprüft. Die niedrige Dosis zeigt keinerlei Effekte, während in der hohen Dosisgruppe nach einwöchiger Behandlung eine deutliche Nebennierengewichtserhöhung und Proliferationssteigerung sichtbar wurde. Bereits nach 4 Wochen war eine Homöostase eingetreten, da nun keine Unterschiede zu der Kontrollgruppe mehr auszumachen waren. Die Ergebnisse der Proliferationsmessungen lassen keine erhöhte Inzidenz von Nebennierenrindentumoren in einer Kanzerogenitätsstudie erwarten.

7. SUMMARY

- 1. The first part of the bibliographical review describes relations between cell proliferation and carcinogenesis, different methods for measuring cell proliferation as well as the methods and difficulties of measuring apoptosis. The second part deals with the rat adrenal cortex and its physiology, cell proliferation, apoptosis and steroid synthesis, as well as the effect of various inhibitory and stimulatory substances on these parameters.
- 2. In a preliminary study a measurement strategy for BrdU-labeled adrenocortical cells was established. For each of the three morphologically and functionally independent cortical zones the percentage of BrdU positive cells, the so called Labeling Index (LI), was determined. The animal number chosen, the duration of label administration, different cutting planes, independent countings, repeated countings, and the number of evaluated cell nuclei influence the result of the measurements. Using the statistical variance component analysis, it was determined how a high degree of measurement accuracy can be achieved with a feasible workload.
- 3. A continuous BrdU-administration for 7 days using a subcutaneously implanted osmotic minipump proved to be the best method for investigating rat adrenal cortex proliferation. A group size of 10 animals per treatment group provides a sensitivity which detects deviations between groups of approximately 10% with a likelihood of 90%. A single counting in one cutting plane yields a sufficiently precise measurement value, if at least 1000 cell nuclei are counted in each of the three zones.
- 4. The effects of the physiologic adrenocortical stimulant ACTH, the synthetic glucocorticoid dexamethasone as an inhibiting substance, and an aminomethyl chroman were examined with regard to proliferation and apoptosis of adrenal cortex, absolute and relative adrenal weights, and ACTH- and corticosterone-blood plasma levels. Two investigation timepoints, after one and four weeks of drug exposure, were expected to yield information on the time course of a possible effect. Measurement of apoptotic cells was performed using the TUNEL-method.
- 5. The control group showed the highest LIs in the zona fasciculata. The zona glomerulosa and zona reticularis were comparable and showed a lower proliferative activity. This contradicts the so called migration theory, according to which cells

originate in the Zona glomerulosa and newly formed cells migrate towards the medulla.

- 6. For the control group, the right and left adrenal glands were evaluated, and they showed a different proliferative acitivity. Therefore, in proliferation studies, always adrenal glands of the same side should be compared between treatment groups.
- 7. At both investigation timepoints, ACTH caused a pronounced increase of adrenal weights and of cell proliferation in the outer two zones. The zona glomerulosa was transformed to cells of the zona fasciculata type, a phenomenon which is also described in the literature. The number of apoptotic cells showed an increase 24 hours after the last ACTH administration. This was interpreted as to reflect a counter-regulation to the primary trophic ACTH effect. This interpretation is confirmed by the corticosterone- and ACTH- blood plasma levels determined 24 hours after the last substance administration, which also showed rebound phenomena.
- 8. Dexamethasone did not induce adrenal weight alterations, but a lower cell proliferation was observed in the zona fasciculata at both investigation time points. It turns out that proliferation measurement is more sensitive and that a separate measurement by zones is absolutely necessary for the detection of a subtle effect, especially when different organ compartments are responsible for different functions.
- 9. The aminomethyl chroman was tested as a low and a high dose. The low dose showed no effects, whereas the high dose exhibited increased adrenal weights and enhanced proliferation after one week of treatment. After four weeks a homeostasis was already achieved, as differences to the control group were no longer visible. Concerning the results of the proliferation measurement, an increased incidence of adrenal cortex tumors is not expected to occur in a carcinogenicity study.
8. ANHANG

8.1 Abbildungen



<u>Abb. 34</u>: Nebennierenrinde eines Tieres der Kontrollgruppe 1 Woche nach Versuchsbeginn, 7 Tage BrdU-Pumpe, Labeled Streptavidin-Biotin-Methode, Hämalaun-Gegenfärbung, x 400. BrdU-positive Zellen sind besonders in der Zona glomerulosa und der äußeren Zona fasciculata zu finden.



<u>Abb. 35</u>: Nebennierenrinde eines Tieres der ACTH-Gruppe 1 Woche nach Versuchsbeginn, 7 Tage BrdU-Pumpe, Labeled Streptavidin-Biotin-Methode, Hämalaun-Gegenfärbung, x 400. BrdU-positive Zellen sind besonders in der Zona glomerulosa und vermehrt in der äußeren Zona fasciculata zu finden. Gegenüber der Kontrollgruppe sind deutlich mehr Zellen BrdUpositiv und eine Verschmälerung der Zona glomerulosa ist festzustellen.



<u>Abb. 36</u>: Nebennierenrinde der "High Dose"-Gruppe 1 Woche nach Versuchsbeginn, 7 Tage BrdU-Pumpe, Labeled Streptavidin-Biotin-Methode, Hämalaun-Gegenfärbung, x 400. Gegenüber der Kontrollgruppe sind mehr BrdU-positive Zellen in der Zona glomerulosa und der äußeren Zona fasciculata zu finden.



<u>Abb. 37</u>: Nebennierenrinde der "High Dose"-Gruppe 4 Wochen nach Versuchsbeginn, 7 Tage BrdU-Pumpe, Labeled Streptavidin-Biotin-Methode, Hämalaun-Gegenfärbung, x 400. Es sind nur noch wenige BrdU-positive Zellen in der Zona glomerulosa und der äußeren Zona fasciculata vorhanden. In der Kontrollgruppe sind zu diesem Zeitpunkt vergleichbar viele Zellen BrdU-positiv.



<u>Abb. 38</u>: Nebennierenrinde eines Tieres der ACTH-Gruppe 4 Wochen nach Versuchsbeginn, 7 Tage BrdU-Pumpe, Labeled Streptavidin-Biotin-Methode, Hämalaun-Gegenfärbung, x 400. Es ist eine gleichbleibend hohe Anzahl BrdU-positiver Zellen wie nach einwöchiger ACTH-Behandlung festzustellen. Die Zona glomerulosa ist nicht mehr deutlich abgrenzbar.



<u>Abb. 39</u>: TUNEL-Färbung in der Nebennierenrinde eines Tieres der ACTH-Gruppe 4 Wochen nach Versuchsbeginn, x 400. Die TUNEL-positiven "Körperchen" werden als ursprünglich von einer Zelle stammende apoptotische Körperchen interpretiert.

8.2 Vorversuch ("Labeling-Indizes")

| Zone/Tier | ZK (neg.+pos.) | BrdU-pos. ZK | LI | MW | SD |
|---|-------------------|--------------|-------|-------|------|
| zG 1 | 1173 | 246 | 20,97 | | |
| zG 2 | 882 | 193 | 21,88 | | |
| zG 3 | 1090 | 159 | 14,59 | | |
| zG 4 | 881 | 149 | 16,91 | 18,59 | 3,43 |
| zF 1 | 1905 | 224 | 11,76 | | |
| zF 2 | 2002 | 144 | 7,19 | | |
| zF 3 | 1873 | 144 | 7,69 | | |
| zF 4 | 2377 | 141 | 5,93 | 8,14 | 2,52 |
| ZK = Zellkerneneg. =negativpos. = positivLI = ,,Labeling Index"MW = MittelwertSD = StandardabweichungzG = Zona glomerulosazF = Zona fasciculata | | | | | |

Tab. 26: Ergebnisse der ersten Zählung im ersten Präparat

Tab. 27: Ergebnisse der zweiten Zählung im ersten Präparat

| Zone/Tier | ZK (neg.+pos.) | BrdU-pos. ZK | LI | MW | SD |
|-----------|-------------------|--------------|-------|-------|------|
| zG 1 | 930 | 167 | 17,96 | | |
| zG 2 | 753 | 150 | 19,92 | | |
| zG 3 | 840 | 137 | 16,31 | | |
| zG 4 | 793 | 102 | 12,86 | 16,67 | 2,99 |
| zF 1 | 1644 | 157 | 9,55 | | |
| zF 2 | 1654 | 123 | 7,44 | | |
| zF 3 | 1500 | 117 | 7,8 | | |
| zF 4 | 1892 | 115 | 6,08 | 7,72 | 1,43 |

ZK = Zellkerne pos. = positiv MW = Mittelwert

zG = Zona glomerulosa

neg. =negativ

LI = "Labeling Index"

SD = Standardabweichung

zF = Zona fasciculata

| Zone/Tier | ZK (neg.+pos.) | BrdU-pos. ZK | LI | MW | SD |
|--|-------------------|---|-------|-------|------|
| zG 1 | 887 | 187 | 21,08 | | |
| zG 2 | 715 | 119 | 16,64 | | |
| zG 3 | 1068 | 166 | 15,54 | | |
| zG 4 | 938 | 144 | 15,35 | 17,15 | 2,68 |
| zF 1 | 1723 | 238 | 13,81 | | |
| zF 2 | 1450 | 81 | 5,59 | | |
| zF 3 | 1670 | 156 | 9,34 | | |
| zF 4 | 2294 | 162 | 7,06 | 8,95 | 3,59 |
| ZK = Zellkerne pos. = positiv MW = Mittelwert zG = Zona glomerulosa | | neg. =negativ LI = ,,Labeling Index" SD = Standardabweichung zF = Zona fasciculata | | | |

Tab. 28: Ergebnisse der ersten Zählung im zweiten Präparat

<u>Tab. 29</u>: Ergebnisse der zweiten Zählung im zweiten Präparat

| Zone/Tier | ZK (neg.+pos.) | BrdU-pos. ZK | LI | MW | St.Abw. |
|-----------|-------------------|--------------|-------|-------|---------|
| zG 1 | 743 | 153 | 20,59 | | |
| zG 2 | 767 | 133 | 17,34 | | |
| zG 3 | 830 | 142 | 17,12 | | |
| zG 4 | 802 | 124 | 15,46 | 17,15 | 2,68 |
| zF 1 | 1442 | 154 | 10,68 | | |
| zF 2 | 1450 | 103 | 7,1 | | |
| zF 3 | 1283 | 117 | 9,12 | | |
| zF 4 | 1828 | 84 | 4,6 | 8,95 | 3,59 |

ZK = Zellkernepos. = positiv MW = Mittelwert

zG = Zona glomerulosa

neg. =negativ

LI = "Labeling Index" SD = Standardabweichung

zF = Zona fasciculata

8.3 ACTH- und Kortikosteronblutplasmakonzentrationen

| | Gruppe | | | | |
|-----------------------------|------------|--------------|-------------------|-------------|------------|
| | Kontrolle | ACTH | Dexa- methason | Low Dose | High Dose |
| Mittelwert ± SD | 32,3 ± 9,3 | 31,2* ± 51,0 | 10,3** ± 11,0 | 21,9 ± 18,0 | 21,7 ± 9,8 |
| Median | 31,9 | 18,1 | 8,3 | 24,3 | 22,4 |
| Geometrischer Mittelwert | 31,1 | NB | NB | NB | NB |
| Quartils- abstand | 13,5 | 11,2 | 20,2 | 33,0 | 8,2 |

Tab. 30: Kortikosteron-Plasmakonzentrationen nach einwöchiger Behandlung

Wilcoxon-Test, 2-seitig, Bonferroni-Holm: *: $p \le 0.05$; **: $p \le 0.01$

SD = Standardabweichung

NB = nicht berechenbar, da einzelne Werte = 0

| Tab. 31: ACTH-Plasma | konzentrationen na | ch einwöchiger | Behandlung |
|----------------------|--------------------|----------------|------------|
| <u></u> ,,,, | | | |

| | Gruppe | | | | |
|---------------|---------------|----------|-------------------|---------------|---------------|
| | Kontrolle | ACTH | Dexa- methason | Low Dose | High Dose |
| Mittelwert ± | 489,6 ± 235,2 | 225,4* ± | $265,7 \pm 194,4$ | 827,6 ± 761,5 | 584,0 ± 396,7 |
| SD | | 121,1 | | | |
| Median | 500,7 | 167,6 | 241,4 | 616,9 | 602,8 |
| Geometrischer | 420,2 | 198,2 | 173,6 | 596,5 | 441,3 |
| Mittelwert | | | | | |
| Quartils- | 409,4 | 247,4 | 295,8 | 520,7 | 611,2 |
| abstand | | | | | |

Wilcoxon-Test, 2-seitig, Bonferroni-Holm: *: $p \le 0.05$ SD = Standardabweichung

| | Gruppe | | | | |
|-----------------------------|------------|-------------|-------------------|-------------|-------------|
| | Kontrolle | АСТН | Dexa- methason | Low Dose | High Dose |
| Mittelwert ± SD | 84,0±111,9 | 12,4 ± 14,4 | 16,4 ± 27,4 | 38,6 ± 44,0 | 37,1 ± 93,4 |
| Median | 25,9 | 7,3 | 0,0 | 24,5 | 0,0 |
| Geometrischer Mittelwert | NB | NB | NB | NB | NB |
| Quartils- abstand | 126,4 | 22,9 | 19,1 | 20,4 | 27,5 |

Tab. 32: Kortikosteron-Plasmakonzentrationen nach vierwöchiger Behandlung

Wilcoxon-Test, 2-seitig, Bonferroni-Holm

SD = Standardabweichung

NB = nicht berechenbar, da einzelne Werte = 0

| Tab 33. ACTH Plasma | konzentrationen | nach vierwi | öchiger R | ahandlung |
|---|-----------------|-------------|-----------|-----------|
| <u>$1a0.55$</u> . ACTI-I lasilla | KOHZCHITATIOHCH | | Junger D | chandlung |

| | Gruppe | | | | |
|---------------|---------------|----------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | Kontrolle | ACTH | Dexa- methason | Low Dose | High Dose |
| Mittelwert ± | 874,5 ± 491,0 | 266,4**± | 358,2*± | $649,4 \pm 310,1$ | $664,8 \pm 587,9$ |
| SD | | 346,1 | 271,2 | | |
| Median | 775,9 | 114,5 | 348,6 | 720,0 | 470,0 |
| Geometrischer | 790,9 | 127,2 | 253,0 | 568,2 | 532,3 |
| Mittelwert | | | | | |
| Quartils- | 327,7 | 255,6 | 352,1 | 400,0 | 302,9 |
| abstand | | | | | |

Wilcoxon-Test, 2-seitig, Bonferroni-Holm: *: $p \le 0.05$; **: $p \le 0.01$

SD = Standardabweichung

8.4 Hauptversuch ("Labeling-Indizes")

| Kontroll- | LI | | | | |
|--------------------|------------------|------------------|------------------|--|--|
| Gruppe | | | | | |
| | Zona glomerulosa | Zona fasciculata | Zona reticularis | | |
| Tiernummer | | | | | |
| 1 | 14,67 | 17,88 | 6,73 | | |
| 2 | 22,95 | 23,73 | 15,35 | | |
| 3 | 14,7 | 15,3 | 9,18 | | |
| 4 | 10,21 | 15,62 | 16,19 | | |
| 5 | 14,23 | 17,4 | 11,16 | | |
| 6 | 20,08 | 15,57 | 21,94 | | |
| 7 | 11,9 | 23,45 | 10,99 | | |
| 8 | 12,37 | 9,79 | 23,06 | | |
| 9 | 14,56 | 16,97 | 16,23 | | |
| 10 | 17,22 | 24,43 | 15,6 | | |
| | | | | | |
| Mittelwert | 15,29 | 18,01 | 14,64 | | |
| Median | 14,61 | 17,18 | 15,47 | | |
| Standardabweichung | 3.85 | 4.61 | 5.25 | | |

Tab. 34: LI-Einzelwerte, Woche 1, linke Nebenniere, Kontrollgruppe

LI = ,,Labeling Index"

| Kontroll- | LI | | | | |
|--------------------|------------------|------------------|------------------|--|--|
| Gruppe | | | | | |
| | Zona glomerulosa | Zona fasciculata | Zona reticularis | | |
| Tiernummer | | | | | |
| 1 | 13,92 | 21,34 | 4,1 | | |
| 2 | 26,84 | 27,4 | 7,73 | | |
| 3 | 17,35 | 18,65 | 8,54 | | |
| 4 | 18,48 | 19,19 | 10,93 | | |
| 5 | 13,1 | 19,01 | 7,28 | | |
| 6 | 19,54 | 15,24 | 10,16 | | |
| 7 | 19 | 28,23 | 15,21 | | |
| 8 | 13,57 | 11,22 | 10,6 | | |
| 9 | 16,09 | 19,66 | 8,2 | | |
| 10 | 20,18 | 27,08 | 4,4 | | |
| | | | | | |
| Mittelwert | 17,80 | 20,70 | 8,71 | | |
| Median | 17,91 | 19,43 | 8,37 | | |
| Standardabweichung | 4,09 | 5,51 | 3,27 | | |

Tab. 35: LI-Einzelwerte, Woche 1, rechte Nebenniere, Kontrollgruppe

LI = ,,Labeling Index"

| ACTH- | LI | | | |
|--------------------|------------------|------------------|------------------|--|
| Gruppe | | | | |
| | Zona glomerulosa | Zona fasciculata | Zona reticularis | |
| Tiernummer | | | | |
| 21 | 22,57 | 31,74 | 24,54 | |
| 22 | 22,73 | 29,56 | 34,46 | |
| 23 | 38,18 | 27,82 | 27,09 | |
| 24 | 18,55 | 41,33 | 32,53 | |
| 25 | 27 | 24,9 | 36,73 | |
| 26 | 26,67 | 22,76 | 32,02 | |
| 27 | 29,08 | 34,14 | 28,16 | |
| 28 | 36,2 | 32,65 | 9,16 | |
| 29 | 38,78 | 31,57 | 17,73 | |
| 30 | 30,68 | 52,42 | 18,41 | |
| | · · | <u>.</u> . | | |
| Mittelwert | 29,05 | 32,89 | 26,08 | |
| Median | 28,04 | 31,66 | 27,62 | |
| Standardabweichung | 6 94 | 8 57 | 8 71 | |

Tab. 36: LI-Einzelwerte, Woche 1, linke Nebenniere, ACTH-Gruppe

LI = ,,Labeling Index"

| Tab. 37: LI-Einzelwe | erte, Woche 1 | , linke Nebenniere, | Dexamethason-Gruppe |
|----------------------|---------------|---|---------------------|
| | , | , | |

| Dexamethason- | LI | | |
|--------------------|------------------|------------------|------------------|
| gruppe | | | |
| | Zona glomerulosa | Zona fasciculata | Zona reticularis |
| Tiernummer | | | |
| 41 | 17,86 | 11,88 | 7,7 |
| 42 | 14,98 | 12,41 | 8,06 |
| 43 | 13,61 | 11,97 | 16,32 |
| 44 | 15,07 | 8,73 | 11,02 |
| 45 | 14,45 | 10,13 | 9,03 |
| 46 | 11,01 | 9,03 | 7,31 |
| 47 | 14,68 | 9,87 | 14,14 |
| 48 | 15,23 | 6,32 | 8,29 |
| 49 | 15,15 | 7,02 | 5,53 |
| 50 | 12,78 | 5,39 | 10,28 |
| | | | |
| Mittelwert | 14,48 | 9,28 | 9,77 |
| Median | 14,83 | 9,45 | 8,66 |
| Standardabweichung | 1,79 | 2,46 | 3,30 |

LI = "Labeling Index"

| "Low Dose"- Gruppe | LI | | | |
|-----------------------|------------------|------------------|------------------|--|
| | Zona glomerulosa | Zona fasciculata | Zona reticularis | |
| Tiernummer | | | | |
| 61 | 19,21 | 12,87 | 13,68 | |
| 62 | 20 | 23,75 | 7,47 | |
| 63 | 19,51 | 26,46 | 7,63 | |
| 64 | 22,47 | 16,14 | 8,98 | |
| 65 | 25,41 | 15,85 | 7,77 | |
| 66 | 17,32 | 13,18 | 7,25 | |
| 67 | 21,17 | 14,24 | 12,56 | |
| 68 | 13,49 | 22,43 | 13,49 | |
| 69 | 8,82 | 13,47 | 9,79 | |
| 70 | 15 | 14,35 | 22,19 | |
| | | | | |
| Mittelwert | 18,24 | 17,27 | 11,08 | |
| Median | 19,36 | 15,10 | 9,39 | |
| Standardabweichung | 4,79 | 4,99 | 4,65 | |

Tab. 38: LI-Einzelwerte, Woche 1, linke Nebenniere, "Low Dose"-Gruppe

LI = "Labeling Index"

| Tab. | 39: LI-Einzelwerte. | Woche 1 | L linke Nebenr | iereHigh] | Dose"-Gruppe |
|------|---------------------|---------|----------------|------------|--------------|
| | <u> </u> | | -, | | |

| "High Dose"- | LI | | |
|--------------------|------------------|------------------|------------------|
| Gruppe | | | |
| | Zona glomerulosa | Zona fasciculata | Zona reticularis |
| Tiernummer | | | |
| 81 | 26,27 | 29,1 | 5,17 |
| 82 | 21,79 | 30,83 | 7,66 |
| 83 | 20,36 | 21,07 | 13,15 |
| 84 | 33,5 | 23,98 | 21,42 |
| 85 | 29,55 | 26,59 | 10,36 |
| 86 | 17,4 | 33,4 | 6,12 |
| 87 | 26,15 | 28,53 | 22,94 |
| 88 | 37,31 | 39,16 | 11,26 |
| 89 | 36,8 | 35,83 | 4,36 |
| 90 | 30,42 | 32,68 | 8,33 |
| | | | |
| Mittelwert | 27,95 | 30,12 | 11,08 |
| Median | 27,91 | 29,97 | 9,34 |
| Standardabweichung | 6,82 | 5,45 | 6,47 |

LI = "Labeling Index"

| Kontroll- | LI | | | |
|--------------------|------------------|------------------|------------------|--|
| Gruppe | | | | |
| | Zona glomerulosa | Zona fasciculata | Zona reticularis | |
| Tiernummer | | | | |
| 11 | 11,11 | 17,27 | 7,14 | |
| 12 | 17,58 | 15,09 | 6,61 | |
| 13 | n.d. | n.d. | n.d. | |
| 14 | 10,08 | 12,29 | 14,13 | |
| 15 | 10,28 | 16,15 | 19,09 | |
| 16 | 15,69 | 10,19 | 7,96 | |
| 17 | 10,02 | 13,14 | 9,49 | |
| 18 | 14,56 | 13,83 | 8,55 | |
| 19 | 14,22 | 19,39 | 19,57 | |
| 20 | 12,9 | 15,34 | 11,33 | |
| | | | | |
| Mittelwert | 12,94 | 14,74 | 11,54 | |
| Median | 12,90 | 15,09 | 9,49 | |
| Standardabweichung | 2,75 | 2,75 | 4,97 | |

| Tab 40: LI-Einzelwerte, | Woche 4, | linke Nebenniere, | Kontrollgruppe |
|-------------------------|----------|-------------------|----------------|
| | | | <u>0</u> |

LI = "Labeling Index"

n.d. = nicht durchgeführt

| | | | - | |
|--------------------|------------------|------------------|------------------|--|
| Kontroll- | LI | | | |
| Gruppe | Zona glomerulosa | Zona fasciculata | Zona reticularis | |
| Tiernummer | | | | |
| 11 | 14,55 | 19,18 | 3,08 | |
| 12 | 18,82 | 15,42 | 4,76 | |
| 13 | n.d. | n.d. | n.d. | |
| 14 | 17,84 | 18,4 | 10,04 | |
| 15 | 17,26 | 16,96 | 5,98 | |
| 16 | 23,25 | 11,7 | 5,77 | |
| 17 | 14,2 | 12,58 | 3,44 | |
| 18 | 21,44 | 18,4 | 8,63 | |
| 19 | 22,07 | 19,85 | 9,41 | |
| 20 | 12,77 | 15,31 | 8,76 | |
| | - | | | |
| Mittelwert | 18,02 | 16,42 | 6,65 | |
| Median | 17,84 | 16,96 | 5,98 | |
| Standardabweichung | 3,72 | 2,89 | 2,63 | |

Tab. 41: LI-Einzelwerte, Woche 4, rechte Nebenniere, Kontrollgruppe

LI = ,,Labeling Index"

n.d. = nicht durchgeführt

| ACTH- | LI | | |
|--------------------|------------------|------------------|------------------|
| Gruppe | | | |
| | Zona glomerulosa | Zona fasciculata | Zona reticularis |
| Tiernummer | | | |
| 31 | 18,92 | 22,56 | 7,29 |
| 32 | 34,62 | 24,13 | 12,59 |
| 33 | 28,67 | 25,69 | 14,47 |
| 34 | 35,98 | 28,03 | 20,19 |
| 35 | 22,59 | 34 | 10,58 |
| 36 | 26 | 25,49 | 15,02 |
| 37 | 34,82 | 27,16 | 12,8 |
| 38 | 33,17 | 21,06 | 14,69 |
| 39 | 53,55 | 40,06 | 16,62 |
| 40 | 44,59 | 26,57 | 8,54 |
| | | | |
| Mittelwert | 33,29 | 27,47 | 13,28 |
| Median | 33,90 | 26,13 | 13,63 |
| Standardabweichung | 10.25 | 5.64 | 3.83 |

Tab. 42: LI-Einzelwerte, Woche 4, linke Nebenniere, ACTH-Gruppe

LI = ,,Labeling Index"

| Tab. 43: LI-Einze | lwerte, Woche 4 | , linke Nebenniere, | Dexamethason-Gruppe |
|-------------------|-----------------|---|---------------------|
| | , | , | |

| Dexamethason- | LI | | |
|--------------------|------------------|------------------|------------------|
| gruppe | | | |
| | Zona glomerulosa | Zona fasciculata | Zona reticularis |
| Tiernummer | | | |
| 51 | 11,4 | 11,4 | 6,69 |
| 52 | 11,55 | 7,16 | 11 |
| 53 | 13,61 | 10,97 | 12,5 |
| 54 | 18,74 | 2,3 | 7,91 |
| 55 | 15,27 | 5,49 | 6,43 |
| 56 | 12,13 | 6,81 | 2,9 |
| 57 | 11,85 | 11,43 | 8,29 |
| 58 | 9,89 | 6,87 | 10,4 |
| 59 | 17,5 | 11,02 | 15,41 |
| 60 | 18,14 | 10,29 | 7,58 |
| | | | |
| Mittelwert | 14,01 | 8,37 | 8,91 |
| Median | 12,87 | 8,73 | 8,10 |
| Standardabweichung | 3,19 | 3,11 | 3,53 |

LI = "Labeling Index"

| "Low Dose"- | LI | | |
|--------------------|------------------|------------------|------------------|
| Gruppe | Zona glomerulosa | Zona fasciculata | Zona reticularis |
| Tiernummer | | | |
| 71 | 17,55 | 16,03 | 14,8 |
| 72 | 13,13 | 6,86 | 5,56 |
| 73 | 16 | 9,63 | 4,59 |
| 74 | 22,48 | 9,4 | 9,62 |
| 75 | 17,65 | 17,93 | 11,72 |
| 76 | 20,27 | 10,25 | 5,62 |
| 77 | 13,06 | 19,4 | 10,79 |
| 78 | 13,72 | 14,49 | 16,5 |
| 79 | 14,47 | 9,38 | 11,12 |
| 80 | 17,29 | 15,98 | 12,09 |
| | | | |
| Mittelwert | 16,56 | 12,93 | 10,24 |
| Median | 16,65 | 12,37 | 10,96 |
| Standardabweichung | 3,13 | 4,32 | 3,98 |

| Tab. 44: LI-Einzelwerte, | Woche 4, lin | ke Nebenniere. | "Low Dose" | -Gruppe |
|--------------------------|--------------|----------------|------------|---------|
| | | | ,, | |

LI = "Labeling Index"

| Tab. 45: LI-Einzelwerte | Woche 4. | linke Nebenniere. | High Dose' | -Gruppe |
|-------------------------|----------|-------------------|--|---------|
| | , | | <i>,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,</i> | |

| "High Dose"- | LI | | |
|--------------------|------------------|------------------|------------------|
| Gruppe | | | |
| | Zona glomerulosa | Zona fasciculata | Zona reticularis |
| Tiernummer | | | |
| 91 | 19,6 | 8,02 | 7,87 |
| 92 | 13,76 | 15,69 | 8,5 |
| 93 | 14,66 | 5,12 | 5,48 |
| 94 | 19,9 | 12,67 | 8,51 |
| 95 | 13,85 | 7,61 | 4,15 |
| 96 | 20,88 | 11,65 | 9,25 |
| 97 | 16,14 | 16,71 | 8,66 |
| 98 | 20,54 | 17,38 | 10,1 |
| 99 | 13,17 | 18,02 | 5,79 |
| 100 | 15,88 | 12,49 | 2,15 |
| | | | |
| Mittelwert | 16,84 | 12,54 | 7,05 |
| Median | 16,01 | 12,58 | 8,18 |
| Standardabweichung | 3,07 | 4,49 | 2,54 |

LI = "Labeling Index"

8.5 Lösungen, Puffer, Bezugsquellen

8.5.1 Lösungen für die H&E-Färbung

Haemalaun nach P. Mayer

Die Ausgangslösung 1:3 mit entmineralisiertem Wasser verdünnen und anschließend filtrieren. Die Farblösung ist 4 Wochen haltbar.

Eosin, gelblich

3,5g Eosin, gelblich in 700ml 70Vol.% Ethanol lösen und 1 ml konzentrierte Essigsäure hinzugeben. Die Farblösung ist 4 Wochen haltbar.

8.5.2 Lösungen und Puffer für die immunhistologische BrdU-Färbung

1%ige Proteaselösung in PBS-Puffer

Verwendet wurde eine 0,01M auf pH 7,2 eingestellte Phosphatsalz -Gebrauchslösung. In einem Liter entmineralisiertem Wasser wurden dafür 1,48g Dinatriumhydrogenphosphat, 0,43g Kaliumhydrogenphosphat und 7,2g Natriumchlorid gelöst. Die Protease-Lösung wurde in diesem Puffer 1%ig angesetzt.

4N-Salzsäurelösung

Zur Herstellung von 750ml 4N-Salzsäurelösung wurden zu 315ml entmineralisiertem Wasser 435ml 25%ige Salzsäure hinzugefügt.

6%ige Wasserstoffperoxidlösung

Diese Lösung wurde aus 30% iger Wasserstoffperoxidlösung durch eine Verdünnung von 1:5 mit entmineralisiertem Wasser hergestellt.

DAB-Pufferlösung

Verwendung fand das "Liquid DAB Substrate Pack, Concentrated" der Firma BioGenex® (HK 153-5K). Zur Herstellung von 5ml Gebrauchslösung wurden laut Herstellerangaben die in der Substratpackung enthaltenen Reagenzien folgendermaßen gemischt: 0,5ml Substratpuffer wurden in 4,5ml entmineralisiertem Wasser gelöst, anschließend 4 Tropfen Chromogenlösung und dann 2 Tropfen Wasserstoffperoxidlösung hinzugefügt.

Diese Gebrauchslösung ist laut Herstellerangaben bei Zimmertemperatur 6 Stunden haltbar.

Gebrauchslösung des Normalserums

Als Blockierungsreagenz diente eine Verdünnung von Kaninchenserum:

Verdünnungsmedium von 1:10.

8.5.3 Bezugsquellen

ALZA Corporation, Palo Alto, CA, USA Alzet Osmotic Pump; 2ML1 (10 microliter per hour, 7 days)

Beckmann Coulter GmbH, Krefeld Immunoradiometric (IRMA) ACTH assay kit

BioGenex, San Ramon, CA, USA Monoclonal Antibody to BrdU (Mouse IgG1); M 247 Streptavidin Peroxidase Diluent, containing phosphate buffered saline with carrier protein, 0,01% thimerosal, and antibiotics; HK 157-5K OptiMaxTMWash Buffer (20x); HK 583-5K OptiMax plus® (Automated Staining System) Liquid DAB Substrate Pack, Concentrated; HK 153-5K Pap Pen®, hydrophobic slide marker; XT 001 PP

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim DNAse I; Art. 104 159 In Situ Apoptosis Detection Kit, POD; Art. 1684817

B.Braun, Melsungen Isotone Kochsalzlösung 0,9% Braun; Art. 0951 0095

DAKO Diagnostica, Hamburg Rabbit Serum (Normal); X 0902 Biotinylated F(ab^c)2 Fragment of Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins; E 0413 StreptABComplex/HRP; K 0377

Eickemeyer, Tuttlingen Stephens-Narkosegerät; Art. 212700

Hermann Biermann GmbH, Bad Nauheim Ratten-Corticosteron-RIA

Janssen-Cilag GmbH, Neuss Metofane®; Wirkstoff: Methoxyfluran; Art. 37360

Leica, Bensheim Auto Stainer XL Eindeckautomat CV 5000 Schlittenmikrotom HN 40 Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomat TP1050

Marienfeld, Lauder-Königshofen Histobond® Adhäsionsobjektträger

Merck KGaA, Darmstadt Dinatriumhydrogenphosphat; Art. 6580 Entellan®; Art. 1.07961 Eosin G gelblich; Art. 1.15935 Essigsäure (100%); Art. 1.00056 Ethanol AE techn. mit Ethylmethylketon vergällt; Art. 1.08057 Formaldehydlösung min. 37%, Art. 1.03999 Fortecortin® Inject 4mg; Wirkstoff: Dexamethason-21-dihydrogenphosphat, Dinatriumsalz; Art. 1353 Kaliumdihydrogenphosphat; Art. 4873 Kalziumchlorid, wasserfrei; Art. 2083 Karbolxylol; Art. 1.09220 Mayers Hämalaun, Art. 1.09249 Natriumchlorid; Art. 6400 Iso-Propanol; Art. 1.00995 Salzsäure, 25%; Art. 1.00316 Wasserstoffperoxid, 30%; Art. 1.08597 Xylol; Art. 28973363

Mikrom, Walldorf Histo-Inkubator

Novartis Pharma GmbH, Nürnberg Synacthen® Depot 1mg; Wirkstoff: Tetracosactid-hexaacetat

Oncor Appligene, Heidelberg Apop Tag® Plastic Coverslips; S 1370-14 Apop Tag® Control Slides; S 7115

Plano, Marburg Okularraster L4330, 19mm

Roche, Mannheim Proteinase K from Tritirachium album; Art. 161519

Schleicher&Schuell GmbH, Einbeck Einmal-Filterhalter; 0,2µm, 7bar max; sterile/pyrogen-free; FP 030/3

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, St. Louis, MO, USA Protease from Streptomyces griseus; P 6911 5-Bromo-2'-Deoxyuridine (BrdU); B 5002

Carl Zeiss Vision GmbH, Hallbergmoos KS 400 Imaging System, Release 3.0

9. LITERATURVERZEICHNIS

- Abayasekara, D.R.E.; H. Vazir; B.J. Whitehouse; G.M. Price; J.P. Hinson; G.P. Vinson (1989). Studies on the mechanism of ACTH-induced inhibition of aldosterone biosynthesis in the rat adrenal cortex. J. Endocrinol. <u>122</u>: 625-632
- Aguilera, G.; K. Fujita; K.J. Catt (1981). Mechanisms of inhibition of aldosterone secretion by adrenocorticotropin. Endocrinology <u>108</u>: 522-528

Alison, M.R. (1995). Assessing cellular proliferation: what's worth measuring? Hum. Exp. Toxicol. <u>14</u>: 935-944

Alison, M.; Z. Chaudry; J. Baker; I. Lauder; H. Pringle (1994).
 Liver regeneration: a comparison of in situ hybridization for histone mRNA with bromodeoxyuridine labeling for the detection of S-phase cells.
 J. Histochem. Cytochem. <u>42</u>: 1603-1608

Ames, B.N.; M.K. Shigenaga; L.S. Gold (1993).
 DNA lesions, inducible DNA repair, and cell division: three key factors in mutagenesis and carcinogenesis. Environ. Health Perspect. <u>101</u>: 35-44

- Ames, B.N.; L.S. Gold (1996).
 - Letters to the editor- Correspondence re: E. Farber, Cell proliferation as a major risk factor for cancer: a concept of doubtful validity. Cancer Res. <u>55</u>: 3759-3762, 1995. Cancer Res. <u>56</u>: 4267-4268
- Ames, B.N.; L.S. Gold (1990a). Chemical carcinogenesis: too many rodent carcinogens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA <u>87</u>: 7772-7776

Ames, B.N.; L.S. Gold (1990b). Too many rodent carcinogens: mitogenesis increases mutagenesis. Science <u>249</u>: 970-971

Ames, B.N.; W.E. Durston; E. Yamasaki; F. D. Lee (1973). Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA <u>70</u>: 2281-2288

Andreis, P.G.; P. Rebuffat; A.S. Belloni; G. Neri; L. Cavallini, G. Gottardo; G. Mazzocchi; A. Coi; L.K. Malendowicz; G.G. Nussdorfer (1989).

Stereological and functional investigations on isolated adrenocortical cells: Zona fasciculata/reticularis cells of chronically ACTH-treated rats. Cell Tissue Res. <u>258</u>: 43-51

Anisimov, V.N.; G. Y. Osipova (1993).

Carcinogenesis induced by combined neonatal exposure to 5-bromo-2'-deoxyuridine and subsequent toal-body X-ray irradiation in rats. Cancer Lett. <u>70</u>: 81-90

Ansari, B.; P.J. Coates; B.D. Greenstein; P.A. Hall (1993).
In situ end-labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. J. Pathol. <u>170</u>: 1-8

Arends, M.J.; A. H. Wyllie (1991). Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. Int. Rev. Exp. Pathol. <u>32</u>: 223-254

Ashby, J. (1992).

Prediction of non-genotoxic carcinogenesis. Toxicol. Lett. 64/65: 605-612

Bahnemann, R.; W. Mellert (1997).

- Lobule-dependent zonal measurement (LZM) method for the determination of cell proliferation in the liver. Exp. Toxicol. Pathol. <u>49</u>: 189-196
- Bahnemann, R.; M. Jacobs; E. Karbe; W. Kaufmann; G. Morawietz; T. Nolte; S. Rittinghausen (1995).

RITA-Registry of industrial toxicology animal-data. Guides for organ sampling and trimming procedures in rats. Exp. Toxicol. Pathol. <u>47</u>: 247-266

Barrass, N. (1993).

"Cell Kinetics" British Society of Toxicologic Pathologists, course module II 6th January 1993

Baserga, R.; F. Wiebel (1969).

The cell cycle of mammalian cells. Int. Rev. Exp. Pathol. 7: 1-29

- Belloni, A.S.; G. Mazzocchi; V. Meneghelli; G.G. Nussdorfer (1978).Cytogenesis in the rat adrenal cortex: evidence for an ACTH-induced centripetal cell migration from the zona glomerulosa. Arch. Anat. Hist. Embr. norm. et exp. 61: 195-206
- Ben-Sasson, S.A.; Y. Sherman; Y. Gavrieli (1995). Identification of dying cells- in situ staining. Methods Cell Biol. <u>46</u>: 29-39

Bertholet, J.Y. (1980).

Proliferative activity and cell migration in the adrenal cortex of fetal and neonatal rats: an autoradiographic study. J. Endocrinol. <u>87</u>: 1-9

Burkhardt, S. (2001).

Untersuchung der zonalen Zellproliferation mittels BrdU in der Leber der B6C3F1 und C57BL Maus nach Verabreichung von drei nicht-genotoxischen Karzinogenen. Diss. Vet. Med., Giessen

Bursch, W.; F. Oberhammer; R. Schulte-Hermann (1992). Cell death by apoptosis and its protective role against disease. TiPS <u>13</u>: 245-251

Bursch, W.; S. Paffe; B. Putz; G. Barthel; R. Scchulte-Hermann (1990). Determination of the length of the histological stages of apoptosis in normal liver and in altered hepatic foci of rats. Carcinogenesis <u>11</u>: 847-853

Butterworth, B.E. (1996).

Letters to the editor- Correspondence re: E. Farber, Cell proliferation as a major risk factor for cancer: a concept of doubtful validity. Cancer Res. <u>55</u>: 3759-3762, 1995. Cancer Res. <u>56</u>: 4270-4271

Butterworth, B.E.; R.B. Conolly; K.T. Morgan (1995).

A strategy for establishing mode of action of chemical carcinogens as a guide for approaches to risk assessments. Cancer Lett. <u>93</u>: 129-146

Butterworth, B.E. (1991).

Chemically induced cell proliferation as a predictive assay for potential carcinogenicity. In: B.E. Butterworth; T.J. Slaga (eds.): Chemically induced cell proliferation: Implications for risk assessment. Wiley-Liss, Inc., New York: 457-467

Butterworth, B.E.; T.L. Goldsworthy (1991). The role of cell proliferation in multistage carcinogenesis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. <u>198</u>: 683-687

Butterworth, B.E. (1990).

Consideration of both genotoxic and nongenotoxic mechanisms in predicting carcinogenic potential. Mutat. Res. <u>239</u>: 117-132

Cain, A.J.; R.G. Harrison (1950). Cytological and histochemical variations in the adrenal cotex of the albino rat. J. Anat. <u>84</u>: 196-226
Ceccatelli, S.; A. Diana; M.J. Villar; P. Nicotera (1995). Adrenocortical apoptosis in hypophysectomized rats is selectively reduced by ACTH. Neuroreport <u>6</u>: 342-344
Clayson, D.B.; E.A. Nera; E. Lok (1989).

The potential for the use of cell proliferation studies in carcinogen risk assessment. Regul. Toxicol. Pharmacol. <u>9</u>: 284-295

Cohen, S.M. (1995). Role of cell proliferation in regenerative and neoplastic disease. Toxicol. Lett. <u>82/83</u>: 15-21

Cohen, S.M.; L.B. Ellwein (1996).

Letters to the editor- Correspondence re: E. Farber, Cell proliferation as a major risk factor for cancer: a concept of doubtful validity. Cancer Res. <u>55</u>: 3759-3762, 1995. Cancer Res. <u>56</u>: 4269-4270

Cohen, S.M.; L.B. Ellwein (1991). Genetic errors, cell proliferation, and carcinogenesis. Cancer Res. <u>51</u>: 6493-6505

- Cohen, S.M.; L.B. Ellwein (1990). Cell proliferation in carcinogenesis. Science <u>249</u>: 1007-1011
- Collins, J.A.; C.A. Schandl; K.K. Young; J. Vesely; M.C. Willingham (1997). Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. J. Histochem. Cytochem. <u>45</u>: 923-934

Collins, R.J.; B.V. Harmon; G.C. Gobé; J.F.R. Kerr (1992).
 Internucleosomal DNA cleavage should not be the sole criterion for identifying apoptosis.
 Int. J. Radiat. Biol. <u>61</u>: 451-453

Cotran, R.S.; V. Kumar; T. Collins (1999). Robbins pathologic basis of disease. Sixth Edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia.

Cummings, M.C.; C.M. Winterford; N.I. Walker (1997). Apoptosis. Am. J. Surg. Pathol. <u>21</u>: 88-101

Cunningham, M.L. (1996). Role of increased DNA replication in the carcinogenic risk of nonmutagenic chemical carcinogens. Mutat. Res. <u>365</u>: 59-69

Cunningham, M.L.; M.R. Elwell; H.B. Matthews (1994).
 Relationship of carcinogenicity and cellular proliferation induced by mutagenic noncarcinogens vs carcinogens III. Organophosphate pesticides vs Tris(2,3-dibromopropyl)phosphate.
 Fund. Applied Toxicol. <u>23</u>: 363-369

Dallman, M.F. (1985). Control of adrenocortical growth in vivo. Endocr. Res. <u>10</u> : 213-242

Darzynkiewicz, Z.; G. Juan; X. Li; W. Gorczyca; T. Murakami; F. Traganos (1997). Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). Cytometry <u>27</u>: 1-20

Deane, H.W.; R.O. Greep (1946).

A morphological and histochemical study of the rat's adrenal cortex after hypophysectomy, with comments on the liver. Am. J. Anat. <u>79</u>: 117-145

DeKloet, E.R.; J.M.H.M. Reul (1987).

Feedback action and tonic influence of corticosteroids on brain function: a concept arising from the heterogeneity of brain receptor systems. Psychoendocrinol. <u>12</u>: 83-105

- Diderholm, H.; B. Hellman (1960a) The cell renewal in the rat adrenals studied with tritiated thymidine. Acta Path. Microbiol. Scand. <u>49</u>: 82-88
- Diderholm, H.; B. Hellman (1960b)

The cell migration in the adrenal cortex of rats studied with tritiated thymidine. Acta physiol. scand. <u>50</u>: 197-202

Dietrich, D.R. (1993).

Toxicological and pathological applications of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), a novel endogenous marker for cell proliferation. Crit. Rev. Toxicol. 23: 77-109

Doolittle, D.J.; S. C. McKarns; P.H. Ayres; D.W. Bombick (1992).
 Molecular approaches for quantifying DNA synthesis and cell proliferation during rodent bioassays. Toxicol. Meth. <u>1</u>: 215-230

Eastman, A.; M.A. Barry (1992).

The origins of DNA breaks: a consequence of DNA damage, DNA repair, or apoptosis? Cancer Invest. <u>10</u>: 229-240

Elashoff, J.D. (1997).

nQuery® Version 2.0 User's Guide. Dixon Associate Los Angeles

Eldridge, S.R.; S.M. Goldsworthy (1996).

Cell proliferation rates in common cancer target tissues of B6C3F1 mice and F344 rats: effects of age, gender, and choice of marker. Fund. Applied Toxicol. <u>32</u>: 159-167 Farber, E. (1996).

Editorial: Cell proliferation is not a major risk factor for cancer. Mod. Pathol. 9: 606

Farber, E. (1995).

Cell proliferation as a major risk factor for cancer: a concept of doubtful validity. Cancer Res. <u>55</u>: 3759-3762

Farber, E. (1994).

Programmed cell death: necrosis versus apoptosis. Mod. Pathol. 7: 605-609

Ford, J.K.; R.W. Young (1963).

Cell proliferation and displacement in the adrenal cortex of young rats injected with tritiated thymidine. Anat. Rec. <u>146</u>: 125-137

Foster, J.R. (1997).

The role of cell proliferation in chemically induced carcinogenesis. J. Comp. Pathol. 116: 113-144

Fritz, P.; J. Müller; G. Wegner; U. Braun; A. Grau; H. Tuczek; E. Moessner; R. Schenk (1985). Immunhistochemie: Theoretische Möglichkeiten, praktische Anwendung. Zentralbl. Allg. Pathol. <u>130</u>: 187-203

Gavrieli, Y.; Y. Sherman; S. Ben-Sasson (1992).

Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J. Cell Biol. <u>119</u>: 493-501

- Gold, R.; M. Schmied; H. Breitschopf; H.P. Hartung; K.V. Toyka; H. Lassmann (1994).
 Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques. Lab. Invest. <u>71</u>: 219-225
- Gold, R.; M. Schmied; G. Rothe; H. Zischler; H. Breitschopf; H. Wekerle; H. Lassmann (1993).
 Detection of DNA fragmentation in apoptosis: application of in situ nick translation to cell culture systems and tissue sections. J. Histochem. Cytochem. <u>41</u>: 1023-1030
- Goldsworthy, T.L.; B.E. Butterworth; R.R. Maronpot (1993).
 Concepts, labeling procedures, and design to cell proliferation studies relating to carcinogenesis.
 Environ. Health Perspect. <u>101</u>: 59-66
- Goldsworthy, T.L.; K.T. Morgan; J.A. Popp; B.E. Butterworth (1991).
 Guidelines for measuring chemically induced cell proliferation in specific rodent target organs. In:
 B.E. Butterworth; T.J. Slaga (eds.): Chemically induced cell proliferation: Implications for risk assessment. Wiley-Liss, Inc., New York: 253-284
- Gorczyca, W.; J. Gong; Z. Darzynkiewicz (1993).
 Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. Cancer Res. <u>53</u>: 1945-1951
- Gottschau, M. (1883).

Structur und embryonale Entwicklung der Nebenniere bei Säugethieren. Arch. Anat. Entwicklungsge. <u>7</u>: 412-458

Graf, U.; H.J. Henning; K. Stange (1966).

Formeln und Tabellen der mathematischen Statistik. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York

Grasl-Kraupp, B.; B. Ruttkay-Nedecky; H. Koudelka; K. Bukowska; W. Bursch; R. Schulte-Hermann (1995).

In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis and autolytic cell death: a cautionary note. Hepatology <u>21</u>: 1465-1468

Gratzner, H.G. (1982).

Monoclonal antibody to 5-bromo and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. Science <u>218</u>: 474-475

Greenwell, A.; J.F. Foley; R.R. Maronpot (1993). Detecting proliferating cell nuclear antigen in archival rodent tissues. Environ. Health Perspect. <u>101</u>: 207-210

Guesdon, J.L.; T.Ternynck; S. Avrameas (1979).The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques.J. Histochem. Cytochem. <u>27</u>: 1131-1139

Haenel, L.C.; K.L. Hermayer (2000).

A case of unilateral adrenal hyperplasia: the diagnostic dilemma of hyperaldosteronism. Endocr. Pract. <u>6</u>: 153-158

Hall, P.A.; D.A. Levison (1990).Review: Assessment of cell proliferation in histological material. J. Clin. Pathol. <u>43</u>: 184-192

Hall, P.A.; D.A. Levison; A.L. Woods; C.C.-W. Yu; D.B. Kellock; J.A. Watkins; D.M. Barnes; C.E. Gillert; R. Camplejohn; R. Dover; N.H. Waseem; D.P. Lane (1990).

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalisation in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. J. Pathol. <u>162</u>: 285-294

- Hanahan, D.; R.A. Weinberg (2000). The hallmarks of cancer. Cell <u>100</u>: 57-70
- Haug, H. (1967).

Probleme und Methoden der Strukturzählung im Schnittpräparat. In: E.R. Weibel; H. Elias (eds): Quantitative methods in morphology. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York: 58-77

- Henkes, W.; C. Doppler.; R. Eckert.; H.-P. Halbritter; E. Russmannn; B. Stier (1993).
 Methoden zur Messung der Zellproliferation. Boehringer Mannheim Biochemica: Sonderdruck aus BioTec; Vogel Verlag und Druck KG, Würzburg: 1-6
- Holzwarth, M.A.; C.E. Gomez-Sanchez; W.C. Engeland (1996).
 Phenotype of proliferating cells stimulated during compensatory adrenal growth.
 Endocr. Res. <u>22</u>: 401-406
- Hsu, S.M.; L. Raine; H. Fanger (1981).

Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. A comparison between ABC and unlabeled (PAP) procedures. J. Histochem. Cytochem. <u>29</u>: 577-580

Hunt, T.E.; E.A. Hunt (1966).

A radioautographic study of the proliferative activity of adrenocortical and hypophyseal cells of the rat at different periods of the estrous cycle. Anat. Rec. <u>156</u>: 361-368

- Iatropoulos, M.J.; G.M. Williams (1996). Proliferation markers. Exp. Toxicol. Pathol. <u>48</u>: 175-181
- Idelman, S. (1978).

The structure of the mammalian adrenal cortex. In: I. Chester-Jones, I.W. Henderson (eds.): General, comparative and clinical endocrinology of the adrenal cortex ,Vol.2, Academic Press, New York: 1-199

Jones, H.B.; S.R. Eldridge; B.E. Butterworth; J.R. Foster (1996). Measures of cell replication in risk/safety assessment of xenobiotic-induced, nongenotoxic carcinogenesis. Regul. Toxicol. Pharmacol. 23: 117-127

Jones, H,B.; S.J. Harbottle; A.L. Bowdler (1994).

Assessment of the labelling index of cohorts of the pancreatic islet cell population in phenobarbitone-treated male rats using a double immunohistochemical technique for 5-bromo-2`- deoxyuridine and pancreatic hormones. Arch. Toxicol. <u>69</u>: 52-58

Jones, H.B.; N.A.B. Clarke (1993).

Assessment of the influence of subacute phenobarbitone administration on multi-tissue cell proliferation in the rat using bromodeoxyuridine immunocytochemistry. Arch. Toxicol. <u>67</u>: 622-628

Variation in the mouse adrenal cortex with special reference to the zona reticularis and to brown degeneration together with a discussion of the 'cell migration' theory. Q. J. Micrscop. Sci. <u>89</u>: 53-74

Kataoka, Y.; Y. Ikehara; T. Hattori (1996).

Cell proliferation and renewal of mouse adrenal cortex. J. Anat. 188: 375-381

Kerr, J.F.R.; G.C. Gobé; C.M. Winterford; B.V. Harmon (1995). Anatomical methods in cell death. Methods Cell Biol. <u>46</u>: 1-27

Jones, I.C. (1948).

Kerr, J.F.R.; A.H. Wyllie; A.R. Currie (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon wih wide-ranging implications in tissue kinetics. Br. J. Cancer 26: 239-257 Kerr, J.F.R.; (1971a). Shrinkage necrosis of adrenal cortical cells. J. Pathol. 107: 217-219 Kerr, J.F.R.; (1971b). Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. J. Pathol. 105: 13-20 Kockx, M.M.; J. Muhring; M.W.M. Knaapen, G.R.Y. de Meyer (1998). RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labeling techniques used to detect apoptosis. Am. J. Pathol. 152: 885-888 Kressel, M.; P. Groscurth (1994). Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labelling of fragmented DNA. Cell Tissue Res. 278: 549-556 Labat-Moleur, F.; C. Guillermet; P. Lorimier; C. Robert; S. Lantuejoul; E. Brambilla; A. Negoescu (1998). TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. J. Histochem. Cytochem. 46: 327-334 Lake, B.G.; M.E. Cunninghame; R. J. Price (1997). Comparison of the hepatic and renal effects of 1,4-Dichlorobenzene in the rat and mouse. Fundam. Appl. Toxicol. 39: 67-75 Larson, J.L.; D.C. Wolf; B.E. Butterworth (1994). Induced cytotoxicity and cell proliferation in the hepatocarcinogenicity of chloroform in female B6C3F1 mice: Comparison of administration by gavage in corn oil vs ad libitium in drinking water. Fund. Appl. Toxicol. 22: 90-102 Leblond, C.P. (1964). Classification of cell populations on the basis of their proliferative behavior. Nat. Cancer Inst. Monogr. 14: 119-150 Lesniewska, B.; K.W. Nowak; L.K. Malendowicz (1992). Dexamethasone-induced adrenal cortex atrophy and recovery of the gland from partial, steroidinduced atrophy. Exp. Clin. Endocrinol. 100: 133-139 Levin, S.; T.J. Bucci; S.M. Cohen; A.S. Fix; J.F. Hardisty; E.K. LeGrand; R.R. Maronpot; B.F. Trump (1999). The nomenclature of cell death: recommendations of an ad hoc committee of the Society of Toxicologic Pathologists. Toxicol. Pathol. 27: 484-490 Levin, S. (1995). A toxicologic pathologist's view of apoptosis or I used to call it necrobiosis, but now I'm singing the apoptosis blues. Toxicol. Pathol. 23: 533-539 Linden, M.D.; F.X. Torres; j. Kubus; R.J. Zarbo (1992). Clinical application of morphologic and immunocytochemical assessments of cell proliferation. Am. J. Clin. Pathol. 97: 4-12

Loury, D.J.; T.L. Goldsworthy; B.E. Butterworth (1987).
 The value of measuring cell replication as a predictive index of tissue-specific tumorigenic potential. Banbury Report 25: Nongenotoxic mechanisms in carcinogenesis; Cold Spring Harbor Laboratory: 119-136

Maier, P.; B. Weibel; G. Zbinden (1983). The mutagenic activity of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) in vivo in rats. Environ. Mutagen. <u>5</u>: 695-703

Majno, G.; I. Joris (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An oveview of cell death. Am. J. Pathol. <u>146</u>: 3-15

Malendowicz, L.K.; G.G. Nussdorfer; M. Trejer (1997a). Effect of 5-bromo-2'-deoxyuridine on the proliferative activity of thymus and regenerating adrenal cortex. Life Sci. <u>61</u>: 641-643

Malendowicz, L.K.; P. Rebuffat; P.G. Andreis; G.G. Nussdorfer; M. Nowak (1997b). Different mechanisms mediate the in vivo aldosterone and corticosterone responses to 5-bromo-2'deoxyuridine in rats. Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes <u>105</u>: 277-281

Malendowicz, L.K.; G.G. Nussdorfer; (1996).
5-bromo-2'-deoxyuridine stimulates the pituitary-adrenal axis in the rat: an effect blocked partially by endothelin-receptor antagonists. J. Int. Med. Res. <u>24</u>: 363-368

Malendowicz, L.K.; G.G. Nussdorfer; A. Markowska; K.W. Nowak (1992). Analysis of the preventive action of ACTH on dexamethasone-induced adrenocortical atrophy in the rat. Cytobios. <u>71</u>: 191-199

Malendowicz, L.K.; B. Lesniewska; B. Miskowiak; G.G. Nussdorfer; M. Nowak (1991). Effects of neurotensin on the pituitary-adrenocortical axis of intact and dexamethasone suppressed rats. Exp. Pathol. <u>43</u>: 205-211

Malendowicz, L.K. (1987).

Sex differences in adrenocortical structure and function. XXIV. Comparative morphometric studies on adrenal cortex of intact mature male and female rats of different strains. Cell Tissue Res. <u>249</u>: 443-449

Malendowicz, K. (1986).

A correlated stereological and functional studies on the long-term effects of ACTH on rat adrenal cortex. Folia Histochem. Cytobiol. <u>24</u> : 203-212

Markowska, A.; P.G. Andreis; B. Miskowiak; G.G. Nussdorfer; L.K. Malendowicz (1997).
 Effects of pneumadin (PNM) on the adrenal glands. 6. Further studies on the inhibitory effect of PNM on dexamethasone-induced atrophy of the rat adrenal cortex. Histol. Histopathol. <u>12</u>: 677-682

Marsman, D.S.; J.C. Barrett (1994). Apoptosis and chemical carcinogenesis. Risk Anal. 14: 321-326

Marsman, D.S.; R.C. Cattley; J. G. Conway; J.A. Popp (1988). Relationship of hepatic peroxisome proliferation and replicative DNA synthesis to the hepatocarcinogenicity of the peroxisome proliferators Di(2-ethylhexyl)phthalate and [4-Chloro-6-(2,3-xylidino)-2-pyrimidinylthio]acetic acid (Wy-14,643) in rats. Cancer Res. <u>48</u>: 6739-6744

Mayersbach, H. (1967).

Ausmaß und Ursachen unspezifischer Färbungen. Acta Histochem. Suppl. 7: 271-284

- Mazzocchi, G.; L.K. Malendowicz; P. Rebuffat; C. Robba; G. Gottardo; G.G. Nussdorfer (1986). Short- and long-term effects of ACTH on the adrenal zona glomerulosa of the rat. A coupled stereological and enzymological study. Cell Tissue Res. <u>243</u>: 303-310
- McDougall, J.G.; A. Butkus; J.P. Coghlan; D.A. Denton; J. Müller; C.J. Oddie; P.M. Robinson; B.A. Scoggins (1980).

Biosynthetic and morphological evidence for inhibition of aldosterone production following administration of ACTH to sheep. Acta Endocrinol. <u>94</u>: 559-570

McEwan, P.E.; G.B. Lindop; C.J. Kenyon (1996).

Control of cell proliferation in the rat adrenal gland in vivo by the renin-angiotensin system. Am. J. Physiol. <u>271</u> : E192-E198

McNicol, A.M.; A.E. Duffy (1987).

A study of cell migration in the adrenal cortex of the rat using bromodeoxyuridine. Cell Tissue Kinet. <u>20</u>: 519-526

Melnick, R.L.; M.C. Kohn; C.J. Portier (1996).
 Implications for risk assessment of suggested nongenotoxic mechanisms of chemical carcinogenesis. Environ. Health Perspect. <u>104</u>: 123-134

Melnick, R.L.; J. Huff; J.C. Barrett; R.R. Maronpot; G. Lucier; C.J. Portier (1993). Cell proliferation and chemical carcinogenesis: symposium overview. Environ. Health Perspect. <u>101</u>: 3-8

Michalopulos, G.K.; M.C. DeFrances (1997). Liver regeneration. Science <u>276</u>: 60-66

Michel, C.; M. Cabanac (1999). Effects of dexamethasone on the body weight set point of rats. Physiol. Behav. <u>68</u>: 145-150

Miller, T.L.; K.E. Mayo (1997). Glucocorticoids regulate pituitary growth hormone-releasing messenger ribonucleic acid expression. Endocrinology 138: 2458-2465

Mitani, F.; H. Miyamoto; K. Mukai; Y. Ishimura (1996). Effects of long term stimulation of ACTH-and angiotensin II-secretions on the rat adrenal cotex. Endocr. Res. <u>22</u>: 421-431

Mitani, F.; H. Suzuki; J.-I. Hata; T. Ogishima; H. Shimada; Y. Ishimura (1994).
 A novel cell layer without corticosteroid-synthesizing enzymes in rat adrenal cortex: histochemical detection and possible physiological role. Endocrinology <u>135</u>: 431-438

Moolgavkar, S.H.; E.G. Luebeck (1995). Incorporating cell proliferation kinetics into models for cancer risk assessment. Toxicology <u>102</u>: 141-147

Moolgavkar, S.H. (1993).

Cell proliferation and carcinogenesis models: general principles with illustrations from the rodent liver system. Environ. Health Perspect. <u>101</u>: 91-94

Moolgavkar, S.H.; E.G. Luebeck (1992). Risk assessment of non-genotoxic carcinogens. Toxicol. Lett. <u>64/65</u>: 631-636

Morris, S.A. (1996).

Letters to the editor- Correspondence re: E. Farber, Cell proliferation as a major risk factor for cancer: a concept of doubtful validity. Cancer Res. <u>55</u>: 3759-3762, 1995. Mod. Pathol. <u>9</u>: 1094

| Morris, R.W. (1993). Analysis of cell proliferation data. Environ. Health Perspect. <u>101</u> : 73-78 |
|---|
| Mundle, S.; A. Iftikhar; V. Shetty; S. Dameron; V. Wright-Quinones; B. Marcus; J. Loew; S. Gregory; A. Raza (1994) |
| Novel in situ double labeling for simultaneous detection of proliferation and apoptosis. J. Histochem. Cytochem. <u>42</u> : 1533-1537 |
| Napalkov, N.P.; V.N. Anisimov; A.J. Likhachev; L. Tomatis (1989). 5-Bromodeoxyuridine-induced carcinogenesis ans its modification by persistent estrus syndrome, unilateral nephrectomy, and X-irradiation in rats. Cancer Res. <u>49</u>: 318-323 |
| Negoescu, A.; P. Lorimier; F. Labat-Moleur; C. Drouet; C. Robert; C. Guillermet; C. Brambilla; E. Brambilla (1996). In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. J. Histochem. Cytochem. <u>44</u>: 959-968 |
| Nolan, L.A.; E. Kavanagh; S.L. Lightman; A. Levy (1998). Anterior pituitary cell population control: basal cell trunover and the effects of adrenalectomy and dexamethasone treatment. J. Neuroendocrinol. <u>10</u>: 207-215 |
| Nussdorfer, G.G. (1986). International review of cytolgy. Volume 98. Cytophysiology of the adrenal cortex. Academic Press Inc., London |
| Nussdorfer, G.G.; G. Mazzocchi; C. Robba; A.S. Belloni; P. Rebuffat (1977). Effects of ACTH and dexamethasone on the zona glomerulosa of the rat adrenal cortex: an ultrastructural stereological study. Acta Endocrinol. <u>85</u> : 608-614 |
| O'Connell, J.T. (1996). Letters to the editor- Correspondence re: E. Farber, Cell proliferation as a major risk factor for cancer: a concept of doubtful validity. Cancer Res. <u>55</u> : 3759-3762, 1995. Mod. Pathol. <u>9</u> : 1092- 1093 |
| Payet, N.; JG. Lehoux; H. Isler (1980). Effect of ACTH on the proliferative and secretory activities of the adrenal glomerulosa. Acta Endocrinol. <u>93</u>: 365-374 |
| Preston-Martin, S.; M.C. Pike; R.K. Ross; B.E. Henderson (1993). Epidemiologic evidence for the increased cell proliferation model of carcinogenesis. Environ. Health Perspect. <u>101</u> : 137-138 |
| Preston-Martin, S.; M.C. Pike; R.K. Ross; B.E. Henderson (1991). Epidemiologic evidence for the increased cell proliferation model for carcinogenesis. In: B.E. Butterworth; T.J. Slaga (eds.): Chemically induced cell proliferation: Implications for risk assessment; Wiley-Liss, Inc., New York: 21-34 |
| Preston-Martin, S.; M.C. Pike; R.K. Ross; P.A. Jones; B.E. Henderson (1990). Increased cell division as a cause of human cancer. Cancer Res. <u>50</u> : 7415-7421 |
| Pudney, J.; G.M. Price; B.J. Whitehouse; G.P. Vinson (1984). Effects of chronic ACTH stimulation on the morphology of the rat adrenal cortex. Anat. Rec. <u>210</u>: 603-615 |
| Ramachandran, J.; A. Jagannadha Rao; S. Liles (1977). Studies on the trophic action of ACTH. Ann. N.Y. Acad. Sci. <u>297</u>: 336-348 Reiter, R.J.; D.J. Pizzarello (1966). |

Radioautographic study of cellular replacement in the adrenal cortex of male rats. Tex. Rep. Biol. Med. <u>24</u>: 189-194

Roberts, R.A.; A.R. Soames; J.H. Gill; N.H. James; E.B. Wheeldon (1995). Non-genotoxic hepatocarcinogens stimulate DNA synthesis and their withdrawal induces apoptosis, but in different hepatocyte populations. Carcinogenesis <u>16</u>: 1693-1698

Roe, F.J.C. (1989).

Non-genotoxic carcinogenesis: implications for testing and extrapolation to man. Mutagenesis $\underline{4}$: 407-411

Rosol, T.J.; J.T. Yarrington; J. Latendresse; C.C. Capen (2001). Adrenal gland: structure, function, and mechanisms of toxicity. Toxicol. Pathol. <u>29</u>: 41-48

Samali, A.; A.M. Gorman; T.G. Cotter (1996). Apoptosis- the story so far... Experientia <u>52</u>: 933-941

Sapirstein, L.A., Goldman, H. (1959). Adrenal blood flow in the albino rat. Am. J. Physiol. <u>196</u>: 159-162

Sarason, E.L. (1943).

Morphologic changes in the rat's adrenal cortex under various experimental conditions. Arch. Pathol. <u>35</u>: 373-390

SAS/STAT User's Guide, Version 6, Fourth Edition, Cary, NC: SAS Institute Inc. (1990).

Sasano, H.; A. Imatani; S. Shizawa; T. Suzuki; H. Nagura (1995). Cell proliferation and apoptosis in normal and pathologic human adrenal. Mod. Pathol. <u>8</u>: 11-17

Schulte-Hermann, R.; W. Bursch; B. Grasl-Kraupp; B. Marian; L. Török; P. Kahl-Rainer; A. Ellinger (1997).

Concepts of cell death and application to carcinogenesis. Toxicol. Pathol. 25: 89-93

Scoggins, B.A.; J.P. Coghlan; D.A. Denton; J.A. Whitworth (1984). ACTH-dependent hypertension. Clin. Exp. Hypertens. <u>6</u>: 599-646

Stachowiak, A.; G.G. Nussdorfer, L.K. Malendowicz (1990). Proliferation and distribution of adrenocortical cells in the gland of ACTH- or dexamethasonetreated rats. Histol. Histopathol. <u>5</u>: 25-29

Staunton, M.J.; E.F. Gaffney (1995).

Tumor type is a determinant of susceptibility to apoptosis. Am. J. Clin. Pathol. 103: 300-307

Stemmermann, G.N.; A. Noffsinger; C.M. Fenoglio-Preiser; B.N. Ames; L.S. Gold; S.M. Cohen; L.B. Ellwein; B.E. Butterworth(1996).

Letters to the Editor. Correspondence re: E. Farber, Cell proliferation as a major risk factor for cancer: a concept of doubtful validity. Cancer Res. <u>55</u>: 3759-3762, 1995. Cancer Res. <u>56</u>: 4267

Stöcker, E.; G.H. Schmid (1973).

Altersabhängige autoradiographische Untersuchung über die Nebennierenrinden-Proliferation von männlichen Ratten nach ³H-Thymidin-Dauerinfusion. Virchows Arch. Abt. B Zellpath. <u>13</u>: 247-257

- Sträter, J.; A.R. Günthert; S. Brüderlein; P. Möller (1995). Microwave irradiation of paraffin-embedded tissue sensitizes the TUNEL method for in situ detection of apoptotic cells. Histochemistry 103: 157-160
- Swann, H.G. (1940). The pituitary-adrenocortical relationship. Physiol. Rev. 20: 493-521

Swenberg, J.A.; R.R. Maronpot (1991).
Chemically induced cell proliferation as a criterion for selecting doses for long-term bioassays. In:
B.E. Butterworth; T.J. Slaga (eds.): Chemically induced cell proliferation: Implications for risk assessment; Wiley-Liss, Inc., New York: 245-251

Tennant, R.W.; B.H. Margolin; M.D. Shelby; E. Zeiger; J.K. Haseman; J. Spalding; W. Caspary; M. Resnick; S. Stasiewicz; B. Anderson; R. Minor (1987).
Prediction of chemical carcinogenicity in rodents from in vitro genetic toxicity assays.
Science 236: 933-931

Tonutti, E. (1953).Experimentelle Untersuchungen zur Pathophysiologie der Nebennierenrinde.Verh. Dtsch. Ges. Pathol. 36: 123-157

Trump, B.F.; I.K. Berezesky; S.H. Chang; P. C. Phelps (1997). The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. Toxicol. Pathol. <u>25</u>: 82-88

Ueberberg, H.; E. Stöcker; F. Städtler (1970).

Zur cellulären Nucelinsäure- und Protein-Synthese der Nebennierenrinde von Ratten nach Dexamethason-Applikation. Virchows Arch. Abt. B Zellpath. <u>6</u>: 97-106

Vazir, H.; B.J. Whitehouse; G.P. Vinson; E. McCredie (1981). Effects of prolonged ACTH treatment on adrenal steroidogenesis and blood pressure in rats. Acta Endocrinol. <u>97</u>: 533-542

Verheijen, R.; H.J.H. Kuijpers; R.O. Schlingemann; A.L.M. Boehmer; R. van Driel; G.J. Brakenhoff; F.C.S. Ramaekers (1989).

Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes. J. Cell Sci. <u>92</u>: 531-540

Walker, P.R.; L. Kokileva; J. LeBlanc; M. Sikorska (1993). Detection of the initial stages of DNA fragmentation in apoptosis. Biotechniques <u>15</u>: 1032-1040

Weibel, E.R. (1979). Stereological methods. Bd. 1. Academic Press, New York

Weinstein, I.B. (1991). Mitogenesis is only one factor in carcinogenesis. Science <u>251</u>: 387-388

Whitworth, J.A.; T.D. Hewitson; L. Ming; R.S. Wilson; B.A. Scoggins; R. Douglas Wright; P. Kincaid-Smith (1990).

Adrenocorticotrophin-induced hypertension in the rat: haemodynamic, metabolic and morphological characteristics. J. Hypertens. <u>8</u>: 27-36

Whithworth, J.A.; D. Saines; J. Andrews; J.G. Sloman; B.A. Scoggins (1981). Haemodynamik response to ACTH administration in essential hypertension. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. <u>6</u>: 533-556 Wijsman, J.H.; R.R. Jonker; R. Keijzer; C.J.H. Van De Velde; C.J. Cornelisse; J. H. Van Dierendonck (1993). A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. J. Histochem. Cytochem. 41: 7-12 Williams, G.M.; M.J. Iatropoulos; J.H. Weisburger (1996). Chemical carcinogen mechanisms of action and implications for testing methodology. Exp. Toxicol. Pathol. 48: 101-111 Williams, G.M.; H. Mori; C.A. McQueen (1989). Structure-activity relationships in the rat hepatocyte DNA-repair test for 300 chemicals. Mutat. Res. 221: 263-286 Wolkersdörfer, G.W.; M. Ehrhart-Bornstein; S. Brauer; C. Marx; W.A. Scherbaum; S.R. Bornstein (1996a). Differential regulation of apoptosis in the normal human adrenal gland. J. Clin. Endocrinol. Metab. 81: 4129-4136 Wolkersdörfer, G.W.; C. Marx; J.W. Brown; W.A. Scherbaum; S.R. Bornstein (1996b). Evaluation of apoptotic parameters in normal and neoplastic human adrenal. Endocr. Res.: 22: 411-419 Woosley, J. T. (1991). Measuring cell proliferation. Arch. Pathol. Lab. Med. 115: 555-557 Wright, N.A.; D. Voncina (1977). Studies on the postnatal growth of the rat adrenal cortex. J. Anat. 123: 147-156 Wright, N.A.; D.R. Appleton; A.R. Morley (1974). Effect of dexamethasone on cell population kinetics in the adrenal cortex of the prepubertal male rat. J. Endocrinol. 62: 527-536 Wright, N.A.; D. Voncina; A.R. Morley (1973). An attempt to demonstrate cell migration from the zona glomerulosa in the prepubertal male rat adrenal cortex. J. Endocrinol. 59: 451-459 Wright, N.A (1971). Cell proliferation in the prepubertal male rat adrenal cortex: an autoradiographic study. J. Endocrinol. 49: 599-609 Wyllie, A.H.; M.J. Arends; R.G. Morris; S.W. Walker; G. Evan (1992). The apoptosis endonuclease and its regulation. Immunology 4: 389-397 Wyllie, A.H. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. Int. Rev. Cytol. 68: 251-306 Wyllie, A.H.; J.F.R. Kerr; A.R. Currie (1973b). Cell death in the normal neonatal rat adrenal cortex. J. Pathol. 111: 255-261 Wyllie, A.H.; J.F.R. Kerr; A.M. Macaskill; A.R. Currie (1973a). Adrenocortical cell deletion: the role of ACTH. J. Pathol. 111: 85-94 Yoffey, J.M. (1953). The suprarenal cortex: the structural background. In: J.M. Yoffey (ed.) The suprarenal cortex. Academic Press, Inc., New York: 31-38

Yu, C. C.-W.; A.L. Woods, D.A. Levison (1992).

The assessment of cellular proliferation by immunohistochemistry: a review of currently available methods and their applications. Histochem. J. <u>24</u>: 121-131

Zajicek, G.; I. Ariel; N. Arber (1986).

The streaming adrenal cortex: direct evidence of centripetal migration of adrenocytes by estimation of cell turnover rate. J. Endocrinol. <u>111</u>: 477-482

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die bei der Umsetzung dieser Doktorarbeit beteiligt waren.

Herrn Prof. Dr. W. Baumgärtner danke ich für die Überlassung des Themas, seine kritische und sehr konstruktive Betreuung und die Aufnahme am Institut für Veterinärpathologie der JLU in Gießen.

Herrn Dr. J. Hellmann gebührt ebenso Dank für die Überlassung des Themas, sowie für seine unerschütterliche Kreativität und sein Engagement, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei der Abteilung Toxikologie der Merck KGaA und hier insbesondere bei Herrn Dr. P. Kramer bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung und das mir gewährte Vertrauen. Bei allen Mitarbeitern der TOX möchte ich mich ganz herzlich für die freundliche Aufnahme am Institut bedanken. Der gleiche Dank gilt allen Mitarbeitern der Veterinärpathologie der JLU.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Günther Wüst und Frau Angelika Schäfer-Schwebel für ihre sowohl theoretische als auch praktische Unterstützung bei allen histotechnischen und immunhistologischen Fragestellungen. Herrn Adam Vay danke ich für seine Hilfe bei allen versuchstechnischen Fragen und für die OP-Assistenz. In diesem Zusammenhang sei auch dem "ZIP-Labor" der BASF AG, Herrn Hans-Robert Hofman, Herrn Thomas Tatarewicz und natürlich Herrn Dr. R. Bahnemann für ihre Einweisung und Hilfe bei der Durchführung dieser "Proli-Studie" gedankt.

Herrn Rolf Müller danke ich für die Einführung in die Welt der Morphometrie. Frau Daniela Jäger, Herrn Jörg Hiller und Frau Natalie Jakel sei für die Hilfestellung bei allen Fragen der EDV und der Behebung der damit zwangsläufig verbundenen Tücken und Fallen gedankt.

Herrn T. Goddemeier und Herrn Dr. K. Failing gilt ein ganz besonderer Dank für ihren Beitrag zu statistischen Fragestellungen und deren Auswertung.

Herrn Prof. Dr. M. Reinacher, Herrn Prof. Dr. E. Burkhardt, Herrn Prof. Dr. W. Baumgärtner, Frau Dr. Susanne Alldinger, Frau Dr. Anja Kipar, Frau Dr. Christiane Herden und Herrn Dr. Dr. Udo Hetzel sowie Kernt Köhler gilt mein besonderer Dank für ihre Einweisung, Unterstützung und unerschöpfliche Wissensquelle bei Sektionen, deren histologischer Auswertung und Befundung.

Der "Baumi-Arbeitsgruppe", Dr. Susanne Alldinger, Andreas Beineke, Dr. Stephanie Czasch, Dr. Annalena Frisk, Sibylle Gröters, Ute Kaim, Dr. Stephanie Markus, Dr. Gundi Müller, Nicole Werner-Keiss und Reiner Ulrich danke ich für die Erweiterung meines Horizonts während diskussionsfreudigem Beisammensein und für das tolle Arbeitsklima während meiner Sektionszeit. Insbesonder Dr. Silke Burkhardt danke ich für das mir gewährte Asyl in Gießen und die netten Abende während diverser "Patho-Touren".

Meiner "Schrankgefährtin" Nicole Hübler danke ich für ihre Aufmunterung. Dr. Stephanie Czasch sei noch zusätzlich für die Durchsicht des Manuskripts gedankt.

Und abschließend danke ich meinen Eltern für ihre Unterstützung und den in mich gesetzten Glauben.