

Einfluß von Lynestrenol auf das in die Milz implantierte Ovar bei der Ratte*

A. Uhlarik und H. Wiegand

Frauenklinik und Hebammenlehranstalt der Philipps-Universität Marburg a. d. Lahn
(Direktor: Prof. Dr. med. R. Buchholz)

Eingegangen am 22. Oktober 1971

Influence of Lynestrenol on the Rat's Ovary Implanted Into the Spleen

Summary. With Lynestrenol treatment reduced growth of rat ovary implanted into the spleen is obtained. The implanted ovaries in hypophysectomized rats can be stimulated by gonadotropines. This stimulation can be influenced by additional treatment with lynestrenol.

Zusammenfassung. Das Wachstum und das histologische Bild der in die Milz implantierten Ovarfragmente wurde in 50tägiger Versuchsdauer bei kastrierten Ratten untersucht. Mit Lynestrenolgabe erreichte man durch die Unterdrückung der endogenen Gonadotropin-Produktion ein erheblich verringertes Wachstum der Implantate. Bei hypophysektomierten Tieren konnte mit PMS und HCG-Stimulation ein Wachstum mit massiver Luteinisierung erreicht werden. Die zusätzliche Lynestrenolbehandlung verminderte das Wachstum der Implantate. Histologisch ließen sich jedoch keine Differenzen zwischen den nur mit exogenen Gonadotropinen stimulierten Ovarien und den Ovarien, bei welchen die Tiere gleichzeitig Lynestrenol erhielten, ermitteln. Auf Grund dieser Untersuchungen erscheint zumindest eine gewisse direkte Einwirkung von Lynestrenol auf die Ovarien wahrscheinlich.

Das Versuchsmodell eines in der Milz des kastrierten Tieres implantierten Ovars wurde zur Beantwortung zahlreicher Fragen der Tumorentstehung in dem Milzovar, der normalen hormonalen Cyclusregulation und auch zur Klärung des Wirkungsmechanismus der hormonalen Ovulationshemmung angewendet [14, 23, 27]. Haller [14] entwickelte den Milzovar-Planimetertest und empfahl ihn unter anderem auch zur Untersuchung der Wirkung verschiedener Gestagene. Bei dem in die Milz von kastrierten Tieren implantierten Ovar kommt es zu Veränderungen, die das Resultat einer weitgehenden Störung des normalen endogenen hormonalen Systems sind. Die vom Ovar produzierten Hormone werden über die *V. lienalis* und *V. portae* der Leber zugeleitet und dort weitgehend inaktiviert [28]. Auf die fehlende „external feedback“ antwortet

* Die Untersuchungen wurden durchgeführt mit einer Forschungsbeihilfe der Ford Foundation.

die Hypophyse mit einer erhöhten Gonadotropin-Produktion, die wiederum das Ovarialtransplantat stimuliert [9]. Die Ovartransplantate in der Milz zeigen einen histologisch typischen Stadienverlauf [1—4, 13, 26]. Eine Hypophysektomie führt zur Atrophie des Transplantates, die nach Hypophysenvorderlappen-Implantation oder Gonadotropinzufuhr wieder reversibel ist [4]. Der Nachweis einer Hormonproduktion des Ovartransplantates kann leicht geführt werden, wenn mit dem Ovar bzw. dem Ovarfragment gleichzeitig ein Teil des Uterushornes mitimplantiert wird. Eine vermehrte Hormonproduktion der Ovarien führt zu einer Hypertrophie des Uterustransplantates. Auch zum Nachweis der hemmenden Wirkung auf die hypophysäre Gonadotropinproduktion der verschiedenen Hormone wurde die Versuchsanordnung des Milzovars verwendet [9—12, 16, 17, 20—22]. Uns schien die Versuchsanordnung des Milzovars geeignet, um der Klärung des Wirkungsmechanismus des zur oralen Kontrazeption angewendeten Lynestrenols nachzugehen. Hier wird neben der vielfach nachgewiesenen zentralen Hemmung der Gonadotropinausschüttung [5—7, 15, 18, 19, 24, 25] auch eine direkte Wirkung auf das Ovar diskutiert [8]. Da eine mögliche direkte Wirkung der Progestagene auf das Ovar von wesentlicher praktischer Bedeutung ist, wurde an dem Modell des in die Milz implantierten Ovarfragmentes versucht, unter verschiedenen Versuchsbedingungen diese Fragestellung anzugehen. Als Progestagen wurde Lynestrenol (17 α -Äthinyl- Δ 14-oestren-17 β -Ol) verwendet.

Methodik

Weibliche, etwa 100 g schwere Wistar-Ratten (AF-HAN) wurden kastriert und ein Teil des entnommenen Ovars (etwa 10—12 mg) in die Milz implantiert. Eine Gruppe der Tiere wurde auf parapharyngealem Wege hypophysektomiert. Bei dem größten Teil der hypophysektomierten Tiere wurde die fehlende Gonadotropin-Stimulation durch die exogene Zufuhr von Gonadotropinen ersetzt und so ein Wachstum der Ovarialimplantate erreicht. Den Tieren dieser Gruppe wurden, zwei Tage nach der Hypophysektomie beginnend, 16mal innerhalb von 50 Tagen je 50 IE Anteron® (PMS) und Primogonyl® (HCG) subcutan injiziert. Die Tiere mit intakter Hypophyse wurden in 3 Gruppen aufgeteilt. Die erste Gruppe diente als Kontrollgruppe, die zweite Gruppe erhielt 2,0 mg, die dritte Gruppe 4,0 mg Lynestrenol täglich in Form einer Suspension per os durch eine dünne Sonde. Die hypophysektomierten und mit PMS und HCG stimulierten Ratten wurden in gleiche Untergruppen aufgeteilt. Die Tiere, welche kein Lynestrenol erhielten, bekamen durch die Sonde die gleiche Menge Flüssigkeit (Wasser), wie sie zum Ansetzen der Suspension verwendet wurde. Nach 50 Tagen wurden die Tiere getötet. Die Milz mit dem Implantat, der Uterus, die Nebenniere und ggf. die Hypophyse wurden entnommen. Das Implantat konnte aus der Milz exakt herauspräpariert werden. Es wurde wie die anderen Organe im frischen Zustand gewogen und für histologische Untersuchungen aufgearbeitet.

Die Tiere, bei denen die Hypophysektomie nicht vollständig gelungen war, wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Adhäsionen zwischen der Milz

und Bauchdecke konnten wir bei keinem der Tiere beobachten. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick der Versuchsanordnung:

Gruppe	Tierzahl (N)	Hypophys- ektomie	PMS + HCG- Stimulation	Lynestrenol- behandlung
I.	26	keine	keine	keine
				2,0 mg/die
				4,0 mg/die
II.	52	hypophys- ektomiert	keine	keine
			800 IE Gesamtdosis	keine
				2,0 mg/die
				4,0 mg/die

Versuchsergebnisse

Bei der Präparation waren die Transplantate unter der Milzkapsel je nach Gewicht als größere oder kleinere gelbliche Vorwölbungen zu sehen oder nur als heller Fleck zu erkennen (Abb. 1). Die erste Milz zeigt die typische Größe des Ovarimplantates bei unbehandelten Tieren mit intakter Hypophyse. Die Implantate der zweiten Gruppe sind deutlich kleiner. Die Tiere dieser Gruppe erhielten täglich 2 mg Lynestrenol. Bei der dritten Gruppe ist das Implantat in der Milz kaum zu erkennen. Das Bild ist typisch für Tiere nach einer Hypophysektomie und für Tiere mit intakter Hypophyse, die täglich 4 mg Lynestrenol erhielten. Das Wachstum der beiden letzten Implantate wurde mit exogenen Gonadotropinen erreicht. Makroskopisch konnte hier bei der Aufarbeitung kein Unterschied zwischen den Tiergruppen ohne oder mit Lynestrenol-Behandlung gefunden werden. Die vierte Milz zeigt eine typische Implantatgröße bei hypophysektomierten Tieren nach PMS- und HCG-Stimulation, in der fünften sieht man ein Implantat nach zusätzlicher Behandlung mit 2 mg Lynestrenol täglich.

Die Ovarimplantate wurden gewogen und die Ergebnisse statistisch ausgewertet (Abb. 2). Die Lynestrenolbehandlung bewirkte eine signifikante Verminderung des Wachstums der Implantate in beiden Versuchsgruppen. Dieser Effekt in der ersten Versuchsgruppe ist als eine Hemmung der durch die Kastration bedingten vermehrten Gonadotropinproduktion anzusehen. Der Unterschied der Implantatgewichte zwischen den Gruppen mit 2,0 und 4,0 mg Lynestrenolgabe ist signifikant.



Abb. 1. In der ersten Milz von links ein Ovarimplantat bei kastrierter Ratte ohne Behandlung. In der zweiten Milz das Ovarimplantat nach Lynestrenolgabe. Die dritte Milz zeigt die Größe des Implantates nach Hypophysektomie. In der vierten Milz sieht man das Ovarimplantat in hypophysektomiertem Tier nach PMS + HCG-Stimulation. In der fünften Milz das Ovarimplantat nach PMS + HCG-Stimulation mit zusätzlicher Lynestrenol-Behandlung

Bei den hypophysektomierten Tieren sank das Ovarimplantatgewicht auf $\sim 5,0$ mg ab. Die Ovarimplantate waren in der Milz kaum auffindbar. Mit der Verabfolgung von insgesamt 800 IE PMS + HCG konnte nicht das gleiche Wachstum der Transplantate erreicht werden, wie es bei den Tieren mit intakter Hypophyse gefunden wurde. Unter Lynestrenol-Einfluß kam es zu einem verminderten Wachstum der Implantate. Der Gewichtsunterschied ist nach dem Student *t*-Test signifikant. Zwischen den Tiergruppen mit 2,0 und 4,0 mg Lynestrenol konnte kein statistisch gesicherter Unterschied gefunden werden (Abb. 3). Histologisch waren die Implantate der ersten Versuchsgruppe (nicht hypophysektomierte Tiere) voneinander gut zu unterscheiden. Ohne Lynestrenolbehandlung finden sich innerhalb einer fibrösen Kapsel zahlreiche, durch schmale Bindegewebssepten getrennte Corpora lutea, bzw. Corpora lutea-ähnliche Gebilde, die wegen der begrenzten Wachstumsmöglichkeit eine polygonale Form zeigen (Abb. 4). Im Zentrum dieser Gebilde befand sich

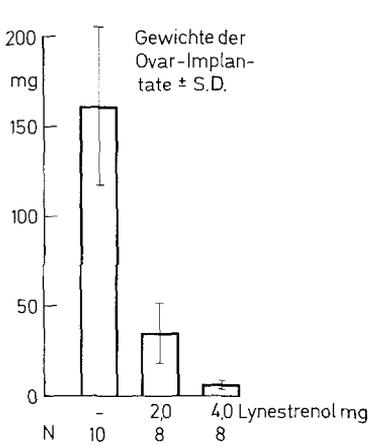


Abb. 2

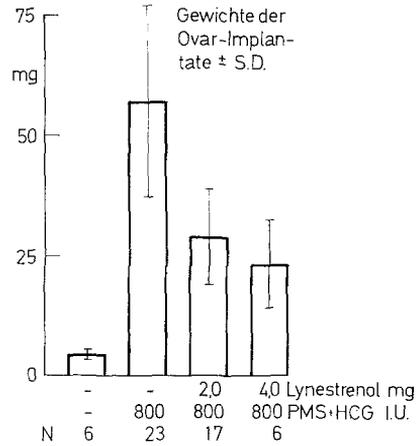


Abb. 3

Abb. 2. Gewichte der Ovarimplantate bei Tieren mit intakter Hypophyse und Lynestrenol-Behandlung (N = Anzahl der Tiere)

Abb. 3. Gewichte der Ovarimplantate bei hypophysektomierten Ratten. (N = Anzahl der Tiere)

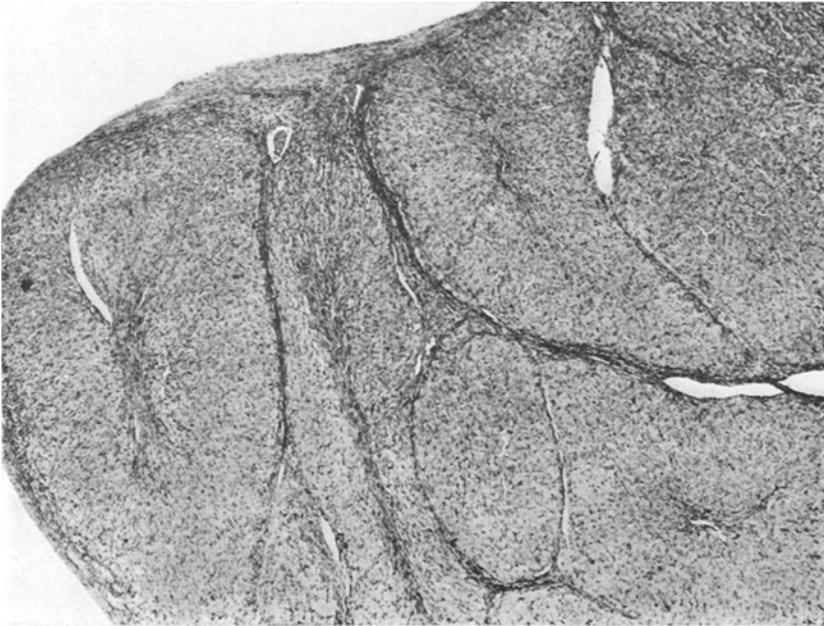


Abb. 4. Ovarimplantat bei kastrierter Ratte mit intakter Hypophyse ohne Behandlung (Vergr.: 40fach)

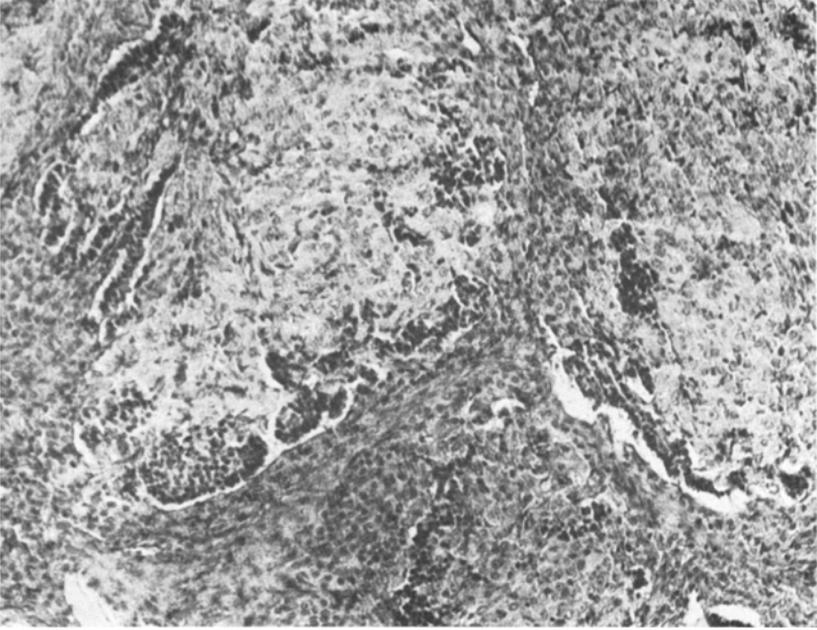


Abb. 5. Granulosazellnester in dem Ovarimplantat. (Vergr.: 150fach)

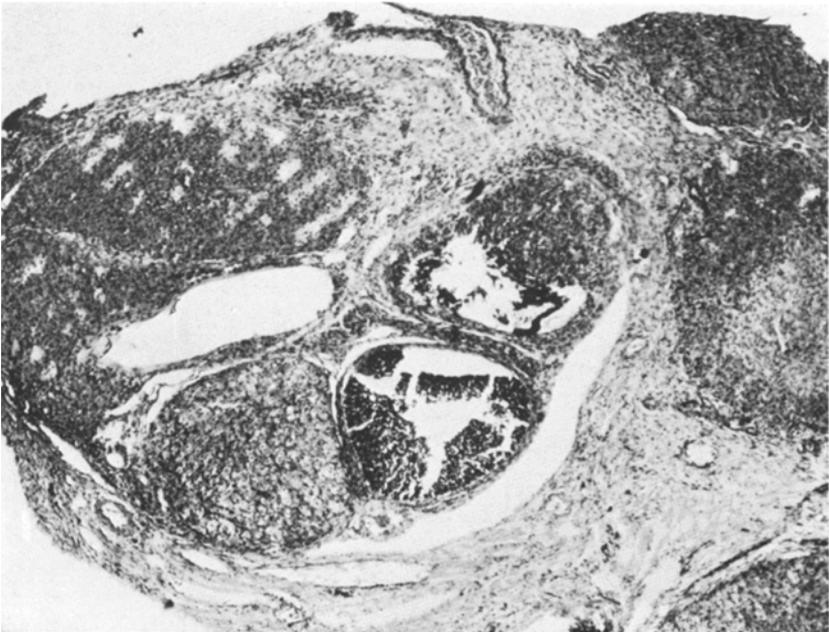


Abb. 6. Ovarimplantat nach 2,0 mg tägliche Lynestrenol-Gabe bei kastrierter Ratte mit intakter Hypophyse. (Vergr.: 60fach)



Abb. 7. Ovarimplantat bei kastrierter und hypophysektomierter Ratte ohne Behandlung (Vergr.: 40fach)

meist etwas Bindegewebe, gelegentlich ein kleiner Hohlraum mit kolloidartiger Flüssigkeit. Die Zellen waren im größten Teil luteinisiert. Man fand in den Implantaten geringe Anzahl von Sekundär- und Tertiärfollikeln. In einigen Präparaten wurden cystische Gebilde in Größe eines Corpus luteums, ausgefüllt mit kolloidartiger Flüssigkeit gesehen.

Zwischen den luteinisierten Zellen findet man häufig in kleineren Nestern granulosazell-ähnliche Zellen mit chromatinreichen Kernen (Abb. 5). Diese Zellen treten gewöhnlich in einem späteren Zeitpunkt auf [13]. Die Implantate nach 2,0 mg tägliche Lynestrenol-Gabe bestanden im wesentlichen aus primären, sekundären und tertiären Follikeln sowie Corpora lutea in geringerer Zahl (Abb. 6). Im Gegensatz zu den nicht behandelten Tieren waren diese Implantate nur gering stimuliert. Die Behandlung mit 4,0 mg/die Lynestrenol verursachte eine weitgehende Zurückbildung und Degeneration des Implantates, die man sonst als Folge einer Hypophysektomie beobachten kann (Abb. 7).

Die Zufuhr exogener Gonadotropine verhindert diesen Effekt der Hypophysektomie. Histologisch konnte man die Implantate nach exogener Gonadotropinstimulation nicht von der oben beschriebenen, durch endogene Gonadotropinstimulation entstandene Implantate, unterscheiden (Abb. 8).

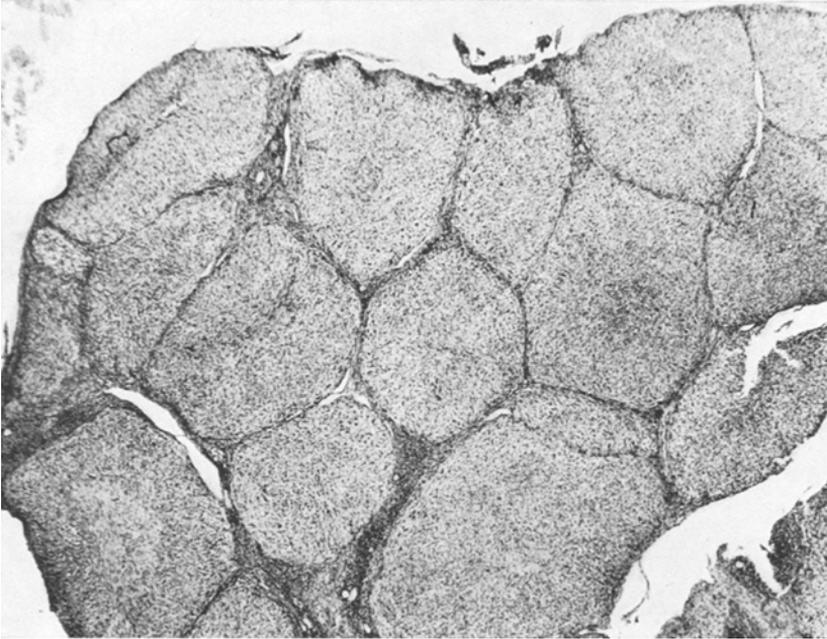


Abb. 8. Ovarimplantat bei kastrierter und hypophysectomierter Ratte nach PMS + HCG-Stimulation und zusätzlicher Lynestrenolbehandlung. (Vergr.: 40fach)

Die Lynestrenolbehandlung verursachte bei diesen Implantaten keine morphologisch erkennbare Veränderung. Die Uterusgewichte und das histologische Bild vom Endometrium entsprachen den einzelnen experimentellen Bedingungen.

Diskussion

Das Wachstum des Ovarimplantates der kastrierten Ratte ist ein Zeichen der erhöhten Gonadotropinproduktion der Hypophyse. Durch die Verabfolgung von 2,0 mg des Progestagens Lynestrenol täglich konnte diese Gonadotropinproduktion erheblich, mit täglicher Gabe von 4,0 mg fast völlig unterbunden werden. Es ist möglich, die Ovarimplantate bei hypophysectomierten Tieren mit PMS und HCG zu stimulieren und ein beachtliches Wachstum der Implantate zu erreichen. Die mit exogenen Gonadotropinen in einer Dosierung von insgesamt 800 IE innerhalb von 50 Tagen stimulierten Implantate erreichen jedoch nicht das Gewicht der Implantate der Tiere mit intakter Hypophyse.

Das durch exogene Gonadotropinzufuhr erreichte Wachstum der Ovarimplantate kann durch die Gabe von Lynestrenol verringert werden,

jedoch in weit geringerem Umfange als bei Tieren mit intakter Hypophyse. Diese Wirkung kann als eine Hemmung der Stimulierbarkeit der Implantate durch exogene Gonadotropine aufgefaßt werden. Sie müßte somit als eine direkte Wirkung des Lynestrenols auf das Ovargewebe angesehen werden. Das histologische Bild der Ovarien zeigte bei den hypophysektomierten Tieren keinen Unterschied zwischen den Tiergruppen, die nur mit Gonadotropinen stimuliert waren, und denen, die zusätzlich auch Lynestrenol erhielten. Die Hypothese der verminderten Stimulierbarkeit der Ovarimplantate bei hypophysektomierten Tieren unter Lynestrenol-Einfluß beruht also nur auf dem Gewichtsunterschied der Implantate. Die vorwiegend zentrale Wirkung des Lynestrenols kommt in den histologischen Bildern der Ovarien bei nichthyphosektomierten und mit Lynestrenol behandelten Tieren zum Ausdruck.

Literatur

1. Ber, A.: Development of ovarian autografts near the stomach of adult castrated rats. *Endokrinologie* **53**,48 (1968)
2. Biskind, M. S., Biskind, G. R.: Experimental ovarian tumours in rats. *Amer. J. clin. Path.* **19**, 501 (1949).
3. Biskind, G. R., Kordan, B., Biskind, M. S.: Ovary transplanted to spleen in rats: The effect of unilateral castration, pregnancy and subsequent castration. *Cancer Res.* **10**, 309 (1950).
4. Biskind, G. R., Pencharz, R., Biskind, M. S.: The pathogenesis of intrasplenic ovarian tumours in rats with a note on effect of hypophysectomy and unilateral castration. *Acta Un. int. Cancr.* **6**, 97 (1947).
5. Buchholz, R., Nocke, L., Nocke, W.: Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus von Äthinylnortestosteron bei der Unterdrückung der Ovulation. *Geburtsh. u. Frauenheilk.* **22**, 923 (1962).
6. Buchholz, R., Nocke, L., Nocke, W.: The influence of gestagens on the urinary excretion of pituitary gonadotropins, estrogens and pregnandiol in women in the postmenopause and during the menstrual cycle. *Int. J. Fertil.* **9**, 231 (1964).
7. Buchholz, R., Nocke, W.: Wirkungsmechanismus der Ovulationshemmung. *Fortschr. Geburtsh. Gynäk.* **21**, 148 (1965).
8. Buchholz, R.: Der Anteil des Progesterons an der Steuerung der indirekten generativen Ovarialfunktion. Bd. XXII des Handbuches der experimentellen Pharmakologie, Teil 2, S. 270. 1969.
9. Fels, E., Foglia, F. G., Rivera, L. M., Cortes: Die Wirkung von Hypophysenhormonen auf das in die Milz implantierte Ovar. *Acta endocr. (Kbh.)* **48**, 369 (1965).
10. Fels, E.: Rückbildung der experimentellen Ovarialtumoren unter dem Einfluß östrogenen oder androgenen Hormone. *Acta endocr. (Kbh.)* **28**, 349 (1958).
11. Flerko, B., Illei, Gy.: Zur Frage der Spezifität des Einflusses von Sexualsteroiden auf hypothalamische Neuronstrukturen. *Endokrinologie* **35**, 123 (1957)
12. Gitsch, E.: Über die Auswertung der kombinierten Uterus- und Ovarialimplantation in die Milz kastrierter Ratten als Gradmesser gonadotroper Aktivität. *Acta endocr. (Kbh.)* **30**, 1 (1959).
13. Guthrie, M. J.: Tumorigenesis in intrasplenic ovaries in mice. *Cancer (Philad.)* **10**, 190 (1957).

14. Haller, J.: Ovulationshemmung durch Hormone. Stuttgart: Thieme 1956.
15. Haller, J.: Beeinflussung der Ovulation durch Gestagene. Geburtsh. u. Frauenheilk. **22**, 211 (1962).
16. Iglesias, R., Lipschütz, A., Mordones, E.: Antiluteomatous action of progesteron in the guinea pig. J. Endocr. **6**, 363 (1949/50).
17. Igleasis, R., Lipschütz, A., Rojas, G.: Experiments with the local action of oestrogen on the intrasplenic ovarian grafts. Endocrinology **46**, 414 (1950).
18. Jöchle, W.: Konzeptionsverhütende Steroide bei Haustieren. Erfahrungen und vergleichende physiologische Betrachtungen. Internist (Berl.) **5**, 251 (1964).
19. Junkmann, K.: Überblick über Chemie und Verhalten der Gestagene im Tierexperiment. Med. Mitt. Schering, Berlin **21**, 116 (1960).
20. Kullander, S.: Studies in spayed rats with ovarians tissue autotransplanted into the spleen. Acta endocr. (Kbh.) **21**, 185 (1965).
21. Li, M. H., Gardner, W. U.: Further studies on the pathogenesis of ovarian tumours in mice. Cancer Res. **9**, 35 (1949).
22. Lipschütz, A., Iglesias, R., Bruzzone, S., Humerez, J., Penaranda, J. M.: Progesterone and desoxycorticosterone in the steroid control of the gonadotrophic function of the hypophysis. Endocrinology **42**, 301 (1948).
23. Lipschütz, A.: Study of the gonadotrophic activity of the hypophysis in situ. Nature (Lond.) **157**, 551 (1946).
24. Overbeek, G. A., Madjerek, Z., Visser, J. de: The effects of lynestrenol on animal reproduction. Acta endocr. (Kbh.) **41**, 351 (1962).
25. Uhlarik, S., Kovacs, L., Viski, S., Szontagh, F. E.: ICSH-Gehalt der Hypophyse und die Veränderungen des genitalen Zyklus von Rattenweibchen bei Gestagenbelastung. Endokrinologie **47**, 82 (1964).
26. Waidl, E.: Die experimentelle Ovarimplantation in die Milz. Arch. Gynäk. **181**, 351 (1952).
27. Watzka, M.: Weibliche Genitalorgane. Das Ovarium. Handbuch der Anatomie des Menschen, Ergänzg. zu Bd. VII/1 (1957).
28. Zondek, B.: Über das Schicksal des Follikelhormons (Follikelklin) im Organismus. Skand. Arch. Physiol. **70**, 133 (1934).

Dr. A. Uhlarik
Universitäts-Frauenklinik
D-3550 Marburg a. d. Lahn
Pilgrimstein 3
Deutschland