

in cerebellar C-GMP observed at 24 h during dependence development may reflect an effect of morphine on cerebellar calcium and hence on guanylate cyclase activities. The increase in cerebellar C-GMP following acute treatment is apparently the result of the observed phosphodiesterase inhibition and appears not to be dose related at least at the dosages examined.

No significant difference in cerebellar C-GMP was observed between control and drug animals at 6 h during naloxone precipitated abrupt withdrawal, however, drug values were less than control values in abrupt withdrawal without naloxone. These results may reflect naloxone stabilization of calcium levels as reported by Ross et al.¹⁵

with the C-GMP decrease during natural withdrawal reflecting an acute calcium loss.

Our results then confirm the report of TRABER et al.⁴ in that an increase in C-GMP was observed with acute treatment. Additionally, we observed the decrease in neural C-GMP in morphine pelleted rats as previously reported by BONNET³. A decrease in cerebellar C-GMP 24 h after pellet implantation was also observed.

Although the data is insufficient to describe a role for C-GMP in the development of morphine dependence and withdrawal, it seems apparent that the etiology of morphine dependence may be related to the level of this cyclic nucleotide in the cerebellum.

Die Wirkung einer Leberschädigung durch Thioacetamid auf die mikrosomale Aromatisierung von Testosteron bei der Ratte

Effect of Liver Damage by Thioacetamide on Microsomal Aromatization of Testosterone in Rats

V. LÓPEZ DEL PINO und H. M. BOLT

Institut für Toxikologie der Universität Tübingen, Wilhelmstrasse 56, D-7400 Tübingen (Bundesrepublik Deutschland), 20. Mai 1976.

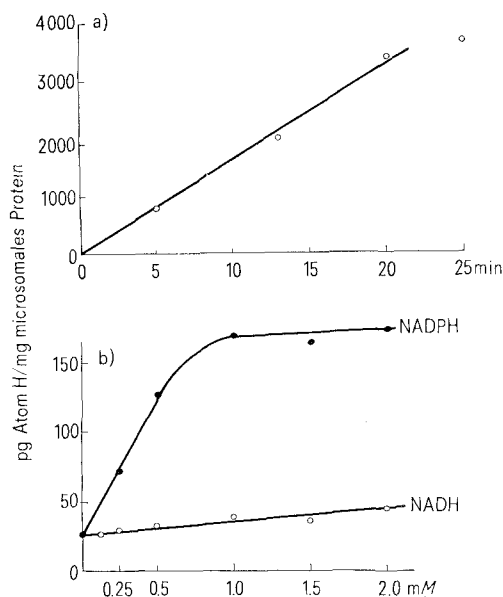
Summary. Rat liver microsomes, NADPH-regenerating system, and 1β , 2β - ^3H -testosterone have been incubated in vitro. The loss of tritium from the steroid, associated with aromatization of testosterone, was linear with time for 20 min and required NADPH. Pre-treatment of the rats with thioacetamide raised the liberation of tritium from 1β , 2β - ^3H -testosterone. The results suggest that liver damage by thioacetamide in rats may give rise to increased aromatization of testosterone.

Die Thioacetamid-vergiftete Ratte spiegelt als tier-experimentelles Modell Veränderungen des Östrogenabbaus wieder, die bei der menschlichen Leberzirrhose auftreten und hier zu klinischen Symptomen wie Gynäkomastie oder Hodenatrophie Anlass geben können¹. Bisher galt dabei das Augenmerk in erster Linie Störungen des Östrogenabbaus, besonders der eingeschränkten Mög-

lichkeit zur mikrosomalen 2-Hydroxylierung in der Leber^{2,3}. Andererseits wurde postuliert⁴, dass bei der Leberzirrhose des Menschen darüber hinaus eine periphere Bildung von Östrogenen aus androgenen Vorläufern in vermehrter Masse stattfindet. Dies gab uns Anlass, nachzuprüfen, ob auch bei der Thioacetamidvergiftung der Ratte in vermehrter Masse Androgene aromatisiert werden. Unsere Untersuchungen wurden in vitro durchgeführt mit Lebermikrosomen von Ratten, die akut oder chronisch mit Thioacetamid behandelt waren. Um einen Einblick in die insgesamt aus Testosteron gebildete Menge aromatischer Folgeprodukte zu erhalten, wurde als Substrat 1β , 2β - ^3H -Testosteron verwendet. Bei der Aromatisierung des A-Ringes zu Östrogenen wird bevorzugt der an 1β und 2β gebundene Wasserstoff eliminiert⁵ und kann dann im Inkubationsmedium als HTO gemessen werden. Da für unsere Fragestellung lediglich der relative Effekt einer Thioacetamidbehandlung in bezug auf un-behandelte Kontrolltiere interessierte, konnte dieses Vorgehen gewählt werden.

Experimenteller Teil. 1β , 2β - ^3H -Testosteron wurde von der Firma New England Nuclear Inc., Boston, Mass., bezogen.

Die akute Vorbehandlung von Ratten mit Thioacetamid erfolgte durch p.o. Verabreichung der Substanz in wässriger Lösung. Die Dosierungen betrugen 100 mg/kg, 200 mg/kg und 300 mg/kg. 24 h nach der Behandlung wurden die Ratten getötet. Die Präparation von Leber-



Freisetzung von Wasserstoff aus den Positionen 1β und 2β von Testosteron in vitro bei Inkubation von 1β , 2β - ^3H -Testosteron mit Rattenlebermikrosomen (Kontrollratten) und NADPH-regenerierendem System. a) Zeitabhängigkeit der Reaktion. b) Abhängigkeit vom Kofaktor, wenn statt des NADPH-regenerierenden Systems verschiedene Konzentrationen an NADH (○—○—○) bzw. NADPH (●—●—●) eingesetzt werden.

¹ V. LÓPEZ DEL PINO und H. M. BOLT, *Endokrinologie* 66, 250 (1975).

² V. LÓPEZ DEL PINO und H. M. BOLT, *Endokrinologie*, im Druck (1976).

³ M. WENZEL, K. U. BLUM und E. KRAAS, *Z. klin. Chem. klin. Biochem.* 6, 265 (1968).

⁴ J. M. M. THIJSEN, J. LOURENS und G. H. DONKER, *Acta endocr., Copenh. Suppl.* 184, 31 (1974).

⁵ H. J. BRODIE, K. J. KRIPALANI und G. POSSANZA, *J. Am. chem. Soc.* 91, 1241 (1969).

mikrosomen erfolgte nach den üblichen Standardmethoden⁶. Chronisch wurden Ratten mit Thioacetamid behandelt durch Verabreichung von 0,1% Thioacetamid im Trinkwasser über eine Zeit von 6 Wochen.

Die Inkubation mit Lebermikrosomen und NADPH-regenerierendem System (Isocitrat und Isocitratdehydrogenase) wurde früher beschrieben¹. Als Substrat wurde 1 β ,2 β -³H-Testosteron verwendet; die Substratkonzentration im Ansatz betrug 200 nMol/ml. Die Messung der Freisetzung von Tritium aus dem verwendeten Substrat erfolgte durch Bestimmung des gebildeten HTO wie früher beschrieben¹.

Ergebnisse und Diskussion. Figur a zeigt, dass in Gegenwart von NADPH ³H aus 1 β ,2 β -³H-Testosteron durch mikrosomale Enzyme der Leber freigesetzt wird. Die Reaktion verläuft über 20 min linear. Die Prüfung der

Kofaktorabhängigkeit dieser Reaktion (Figur b) ergibt, dass der Zusatz von NADPH für die Reaktion essentiell ist. Die Sättigungskonzentration für NADPH liegt bei 1 mM. Ersatz des NADPH durch NADH führt lediglich zu minimalen Umsätzen.

Die Tabelle zeigt den Einfluss einer akuten bzw. chronischen Vorbehandlung der Ratten mit Thioacetamid auf die mikrosomale Freisetzung von Tritium aus 1 β ,2 β -³H-Testosteron. Während eine akute Dosis von 100 mg/kg noch keine signifikante Änderung hervorruft, führt eine akute Gabe von 200 mg/kg bzw. 300 mg/kg Thioacetamid zu einer starken Steigerung der ³H-Freisetzung.

Werden Ratten chronisch mit Thioacetamid behandelt (0,1% im Trinkwasser), so sieht man zunächst in den ersten 1–3 Wochen der Behandlung eine Verringerung der mikrosomalen ³H-Freisetzung aus 1 β ,2 β -³H-Testosteron, der dann nach 6wöchiger Behandlung eine Steigerung der ³H-Freisetzung in etwa dem Ausmasse folgt, wie sie auch bei akuter hoher Thioacetamidgabe feststellbar ist. Wird Thioacetamid in dieser Phase abgesetzt, so persistiert der Effekt über mindestens 2 Wochen.

Aromatisierung von Testosteron durch Rattenlebermikrosomen: Einfluss einer Behandlung mit Thioacetamid

Initialgeschwindigkeit (pg Atom H/mg mikrosomales Protein/min)		
Kontrollen (unbehandelt)	168 \pm 12	(n = 6)
Akute Behandlung mit Thioacetamid		
100 mg/kg	156 \pm 12	(n = 4) n.s.
200 mg/kg	258 \pm 67	(n = 4) ^b
300 mg/kg	234 \pm 87	(n = 4) ^a
Chronische Behandlung mit Thioacetamid		
1 Woche	64 \pm 5	(n = 5) ^c
3 Wochen	104 \pm 17	(n = 5) ^c
6 Wochen	275 \pm 35	(n = 5) ^c
2 Wochen Erholung nach chronischer Behandlung	269 \pm 32	(n = 5)

Die Zahlen ($\bar{x} \pm s_x$) geben die Menge Wasserstoff an (pg Atom H/mg mikrosomales Protein/min), die aus den Positionen 1 β und 2 β von Testosteron bei Inkubation von 1 β , 2 β -³H-Testosteron mit Mikrosomen und NADPH-regenerierendem System freigesetzt wird.

n.s. = kein signifikanter Unterschied gegenüber Kontrollen

^a 0,05 > p > 0,025; ^b 0,01 > p > 0,005; ^c p < 0,001.

In früheren Arbeiten^{1,2} konnten wir zeigen, dass Lebermikrosomen von Thioacetamid-vergifteten Ratten eine starke Beeinträchtigung der Fähigkeit zur aromatischen Hydroxylierung von Östrogenen zeigen, was den Verhältnissen bei der menschlichen Leberzirrhose entspricht. Die hier vorgelegten Daten zeigen darüber hinaus, dass im gleichen System eine vermehrte Aromatisierung von Testosteron stattfindet.

THIJSEN et al.⁴ fanden bei Patienten mit Leberzirrhose eine gesteigerte Umwandlung von Androstendion in Östron. Sie erklärten dies mit einem primär in der geschädigten Leber verminderten Abbau von Testosteron bzw. Androstendion in Ring-A-gesättigte 17-Ketosteroide. Entsprechend stehe vermehrt Substrat für die Umwandlung in Östrogene zur Verfügung. Die vorliegenden Ergebnisse lassen ähnliche Mechanismen auch im Falle der experimentellen Leberschädigung der Ratte durch Thioacetamid vermuten.

⁶ H. REMMER, H. GREIM, J. B. SCHENKMAN und R. W. ESTABROOK, *Meth. Enzymol.* 10, 703 (1967).

Lamellated Sensory Nerve Endings in Guinea-Pig Adrenals

O. HABURA, K. UNSICKER and U. ZWARG

Anatomisches Institut der Universität, Olshausenstrasse 40–60, D–2300 Kiel (Federal Republic of Germany), 17 May 1976.

Summary. Lamellated sensory nerve endings were observed in the adrenal gland of guinea-pigs located at the cortico-medullary junction close to venous blood vessels. We suggest that they form the afferents of a system contributing to a local regulation of adrenal blood flow.

Lamellated sensory nerve endings are widely distributed in mammals. They show a great structural variability and are known by a variety of different names. Lamellated receptors have been described to occur both in the skin (for reviews see ^{1,2}) and in internal organs, such as serous and mucous membranes, heart and blood vessels, mesentery, pancreas, ureter bladder and prostate³.

This communication deals with lamellated nerve endings located at the cortico-medullary junction in the adrenal of the guinea-pig. This observation is of particular

interest in view of recent physiological evidence in favour of baroreceptors occurring in cat and rabbit adrenal glands⁴.

¹ K. H. ANDRES and M. v. DÜRING, *Handbook of Sensory Physiology* (Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1973), vol. 2, p. 3.

² Z. HALATA, *Ergebn. Anat. EntwGesch.* 50, 5 (1975).

³ R. SHEHATA, *Acta anat.* 77, 139 (1970).

⁴ A. NIJIMA and D. L. WINTER, *Science* 159, 434 (1968).