

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Hamburg
(Direktor: Prof. Dr. med., Dr. med. h. c. CARL KRAUSPE)

Der Einfluß intravitalesterasehemmung auf die Cortisol-Pneumonie der Ratte

Von

G. PLIESS, H. KETELS-HARKEN und K. SCHNIEBER

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 11. Juli 1963)

Nach langdauernder täglicher Cortisol-Behandlung der Albinoratte entwickeln sich Lungenveränderungen (WELLER; PLIESS u. TRODE; RICKEN), die wir in ihrer Gesamtheit als Cortisol-Pneumonie bezeichnen. Zu den zunächst auftretenden *unspezifischen* Lungenbefunden gehören herdförmige Alveolarzellschwellung und die Ausbildung von sog. Schaumzellherden, Bronchopneumonien, Abscedierungen und Pilzherden. Als *spezifischer* Lungenbefund entwickelt sich von der 4. Behandlungswoche an eine allmählich zunehmende Besiedlung der Lungenalveolen mit *Pneumocystis carinii* (*experimentelle Ratten-Pneumocystose*). Sehr charakteristisch für *Pneumocystis carinii* ist die starke histochemische Fermentaktivität an Esterase (SCHULTZE-Jena) bzw. Lipase (PLIESS u. SUHR). Es lag daher nahe zu untersuchen, ob die Ratten-Pneumocystose bzw. die unspezifischen Veränderungen der Cortisol-Pneumonie durch *Inhalation eines Fermenthemmers* beeinflusst werden können. Auf Grund der reichlichen Aktivität der Esterase in den Pneumocysten benutzten wir den organischen Phosphatester *Diäthyl-p-Nitrophenylphosphat* (E 600), der als Substanz mit eserin-artiger Wirkung auch in Form von Augentropfen unter der Bezeichnung Mintacol im Handel ist.

Material und Methodik

Erzeugung der Cortisol-Pneumonie

44 Jungnatten erhielten täglich — mit Ausnahme der Sonntage — intramuskulär ein Gemisch von Cortisol¹ (Incortin H) und Supracillin¹. Die Dosierung des Supracillins betrug 10000 E/100 g Körpergewicht. Die Dosierung des Cortisols variierten wir in der folgenden Weise:

Im *Versuch I* erhielten 24 Ratten mit dem durchschnittlichen Anfangsgewicht von 48 g etwa 2 Wochen lang täglich 2 mg Cortisol/100 g Körpergewicht. Danach wurde die tägliche Dosis auf 2,9 mg und etwa vom 26. Tage auf 3,3 mg/100 g erhöht (Abb. 1).

Im *Versuch II* erhielten 20 Ratten mit dem durchschnittlichen Anfangsgewicht von 52 g die gleiche Ausgangsdosis von 2 mg Cortisol/100 g Körpergewicht. Mit Beginn jeder neuen Versuchswoche steigerten wir die Dosis um je 1 mg/100 g Körpergewicht bis zur endgültigen Dosis von täglich 5 mg/100 g Körpergewicht mit Beginn der 4. Versuchswoche (Abb. 1).

Inhalationstechnik

Mintacol soluble¹ enthält als Kochsalzverreibung 1,66% der wirksamen Substanz Diäthyl-p-Nitrophenylphosphat (E 600). Wir verwendeten eine wäßrige Inhalationslösung

¹ Folgenden Firmen danken wir für die freundliche Überlassung der verwendeten Medikamente: E. Merck-Darmstadt (Incortin H), Chemie-Grünenthal, Stolberg/Rhld. (Supracillin), Bayer-Leverkusen (Mintacol soluble).

mit der Konzentration des E 600 von 1:1000 bzw. 1:1500. Die Vernebelung der Lösung erfolgte mit einem Hand-Spray-Gerät. Die Tiere wurden zur Inhalation in einen Gummischurz gewickelt, der nur die Schnauze frei läßt, in eine Plastiktüte verbracht und in dieser einzeln der Vernebelung exponiert. Die Teilchengröße der vernebelten Lösung war nicht exakt bekannt.

Vorversuche mit E 600 zur Bestimmung der Toxizität

Sechs Ratten im Gewicht von 100 g wurden folgende Dosen von E 600 intraperitoneal appliziert: 0,15 mg, 0,3 mg, 0,35 mg, 0,40 mg/100 g Körpergewicht.

Sieben Ratten im Gewicht von 100 g inhalierten einmalig 2—25 min lang die Mintacol-Lösungen. Während dieser Zeit wurden bis zu 5 ml vernebelt, entsprechend einer „Vernebelungsdosis“ von 0,14 bis 1,5 mg E 600/min.

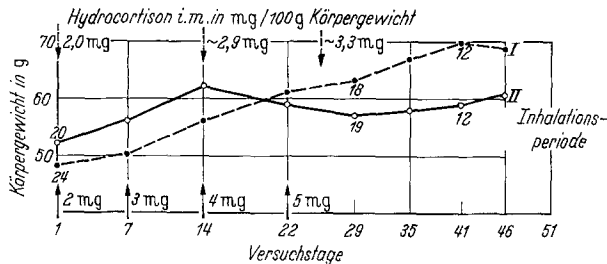


Abb. 1. Übersicht über die Versuchsanordnung. Die Pfeile verweisen auf den Termin einer Steigerung der Cortisol-Dosis in Versuch I (↓) bzw. II (↑). Die Kurven I und II geben das durchschnittliche Körpergewicht der Jungtatten wieder (in g). Die in die Kurven eingezeichneten Zahlen entsprechen der Anzahl von überlebenden Tieren zu einem bestimmten Zeitpunkt. Während der „Inhalationsperiode“ nach dem 45. bzw. 46. Versuchstage wurden in Versuch I und II je 8 Tiere einer ein- oder mehrmaligen Inhalation von E 600 unterworfen

Inhalation von Mintacol bei den cortisolbehandelten Ratten

Im Versuch I wurde bei 3 von 8 Tieren vom 47. Versuchstag an die Cortisol-Supracillin-Medikation unterbrochen. Alle 8 Tiere inhalierten 1mal täglich E 600 in der Konzentration von 1:1000. Die Inhalationsdauer betrug 15 sec bis 2 min. Während dieser Zeit wurden mindestens 1 ml, höchstens 5 ml der Inhalationslösung vernebelt.

Die Anzahl der Ratten und die Inhalationen an aufeinanderfolgenden Tagen verteilen sich in folgender Weise: 1 Tier — 1mal, 2 Tiere — 2mal, 1 Tier — 3mal, 3 Tiere — 4mal, 1 Tier — 5mal Inhalation.

Zwei Ratten erhielten wegen auftretender Vergiftungserscheinungen nach der Inhalation mehrmals s.c. je 1 ml einer 0,002%igen Lösung von Atropin. sulfur. Spontan verstarb je eine Ratte während der Inhalation bzw. 15 min und 2 Std später. Von den übrigen 5 Tieren wurden je 2 nach 1 und 8 Std und eine Ratte 20 Std nach der Inhalation getötet.

Im Versuch II begann am 46. Versuchstage bei 8 Ratten die Inhalation von E 600 in der Konzentration 1:1500. Die Inhalationsdauer betrug konstant 2 min, die vernebelte Lösungsmenge 3 ml. Je 2 Ratten inhalierten nur einmal bzw. an 2, 3 oder 4 aufeinanderfolgenden Tagen. Alle Tiere erhielten auch an den Inhalationstagen Cortisol-Supracillin. Je 1 Ratte starb unmittelbar bzw. 2 Std nach der 2. Inhalation. Von den übrigen 6 Ratten wurden je 3 Tiere 30 min oder 5 Std nach der letzten Inhalation getötet.

Histologisch-histochemische Untersuchungen

Die Tötung der überlebenden Ratten erfolgte in tiefer Äthernarkose. Die Lungen wurden zum Teil in neutralem 10%igem Formalin, zum Teil in Aceton fixiert und entsprechend in Gelatine oder Paraffin eingebettet. An den Schnitten wurden folgende Färbungen vorgenommen: Hämatoxylin-Eosin, McManus, Gridley, Gram.

Ferment-histochemische Nachweise wurden nach PEARSE für unspezifische Esterase mit α -Naphthylacetat und für Lipase mit Tween 60 durchgeführt. Zur Kontrolle wurden die

Substrate aus den Inkubationsmedien fortgelassen. Die Färbungen und Ferment-Reaktionen erfolgten:

Bei den 16 cortisolbehandelten Ratten, die mindestens 1mal E 600 inhaliert hatten, bei weiteren 8 cortisolbehandelten Ratten, die ohne Inhalation nach dem 42. Versuchstage getötet wurden, und bei 5 unbehandelten jungen Kontrolltieren.

Bei den übrigen 20 Ratten aus den Versuchen I und II, die vor dem 42. Versuchstage spontan starben, wurden nur die Lungen an Paraffinschnitten den obengenannten Färbungen unterworfen.

In einem gesonderten Versuch prüften wir in Kryostat-Schnitten die Ferment-Hemmwirkung von E 600 in molaren Konzentrationen von 10^{-3} bis 10^{-7} auf die Esterase-Aktivität der Lungen von unbehandelten Kontrolltieren.

Ergebnisse

Toxizität von E 600

Als Zeichen einer Vergiftung mit E 600 treten bei den Ratten Zitterattacken des ganzen Körpers, Streckkrämpfe der Hinterbeine, dyspnoische Anfälle und akute Diarrhoe auf. Von den 6 Tieren, die im *Vorversuch* E 600 *intraperitoneal* erhielten, verstarben nach der Dosis von 0,4 mg/100 g 3 Tiere unter den genannten Erscheinungen innerhalb von 5–20 min. Ein Tier mit der Dosis von 0,35 mg/100 g starb einige Stunden post inj., 2 Ratten mit der Dosis von 0,3 mg/100 g zeigten keinerlei Reaktion. Die letale i.p.-Dosis liegt somit zwischen 0,3 und 0,35 mg/100 g, entsprechend der von MEYER im Großversuch bei der Ratte ermittelten LD_{50} von 3,25 mg/kg.

Im *Inhalations-Vorversuch* zeigten 5 von 7 Kontrolltieren Vergiftungserscheinungen. Dabei besteht eine deutliche Beziehung zur Inhalationsdauer, weniger zur Gesamtmenge der vernebelten Lösung. Die Vergiftungsdosis durch Inhalation ist unbekannt. Legen wir die i.p.- LD_{50} von 0,325 mg/100 g zugrunde, so ergibt sich, daß im Vorversuch unabhängig von der vernebelten Lösungsmenge bei genügendem Angebot von den normalen Jungratten im Gewicht von 100 g etwa 0,1 ml/min resorbiert werden. Dabei bleibt unbekannt, wieviel tatsächlich in den Lungen und wieviel bereits in den Atemwegen zur Resorption kommt.

Im *Versuch I* (E 600 in der Konzentration von 1:1000) reagierten 4 Tiere nach der 2. bzw. 3. und 4. Inhalation mit Vergiftungserscheinungen, an denen 1 Ratte trotz mehrfacher Gabe des Antidots 2 Std später verstarb. Beim Vergleich mit den Kontrolltieren des Vorversuchs zeigt sich, daß die cortisolbehandelten Ratten entweder eine größere Empfindlichkeit gegen E 600 besitzen oder eine größere Lösungsmenge pro Minute resorbieren. Für die erste Möglichkeit spricht, daß die Vergiftungsreaktion erst nach mehrmaliger Inhalation auftritt; die andere Möglichkeit korreliert sich mit der Beobachtung, daß die cortisolbehandelten Ratten — sicherlich auf Grund von pneumonischen Veränderungen — eine Atmungsbeschleunigung zeigen. Läßt man die Möglichkeit einer Empfindlichkeitssteigerung gegen E 600 außer acht, so würde die pro Minute durch Inhalation resorbierte Lösungsmenge bei den cortisolbehandelten Ratten trotz ihres niedrigeren Körpergewichtes etwa doppelt so hoch liegen wie die resorbierte Lösungsmenge bei den gesunden und schwereren Kontrolltieren (etwa 0,1:0,2 bis 0,25 ml).

Im *Versuch II* mit Inhalation der niedriger konzentrierten Lösung von E 600 (1:1500) überstanden alle 8 Ratten auch mehrmalige Inhalationen von 2 min Dauer ohne Vergiftungserscheinungen.

Allgemeinverhalten der cortisolbehandelten Ratten

Durch die Cortisol-Behandlung wird eine Verlangsamung des Wachstums hervorgerufen. Aus Abb. 1 geht hervor, daß ein Gewichtsstillstand bzw. eine Gewichtsabnahme erst bei einer täglichen Dosierung des Cortisols von 4 mg/100 g Körpergewicht einsetzt. Dem Gewichtsstillstand entspricht bei den Tieren in Versuch II eine schwerere Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens als im Versuch I: Bewegungsarmut, verminderte Freßlust, dünnschleimige Faeces, gelichtetes, struppiges und verschmutztes Fell. Prä mortal bekommen die Tiere einen aufgetriebenen Leib. Im Versuch II zeigten die Ratten nach einiger Zeit auch Ohr- und Schwanzräude als Zeichen des stärkergradigen Resistenzverlustes. Die Sterblichkeit bis zum 41. Versuchstage lag im Versuch II (35%) niedriger als im Versuch I (54%).

Alle Ratten, die in Versuch I und II mindestens eine *Inhalation* überlebten, zeigten eine *Besserung des Allgemeinverhaltens*. Am auffälligsten war eine mit mehrmaligen Inhalationen zunehmende Lebendigkeit und Freßlust der Tiere trotz Fortdauer der Cortisol-Medikation.

Histologisch-histochemische Lungenbefunde

In der *normalen Rattenlunge* finden sich nur in den Zwickeln der Alveolarwände vereinzelte, geringgradig geschwollene Alveolarepithelien, die eine diffuse

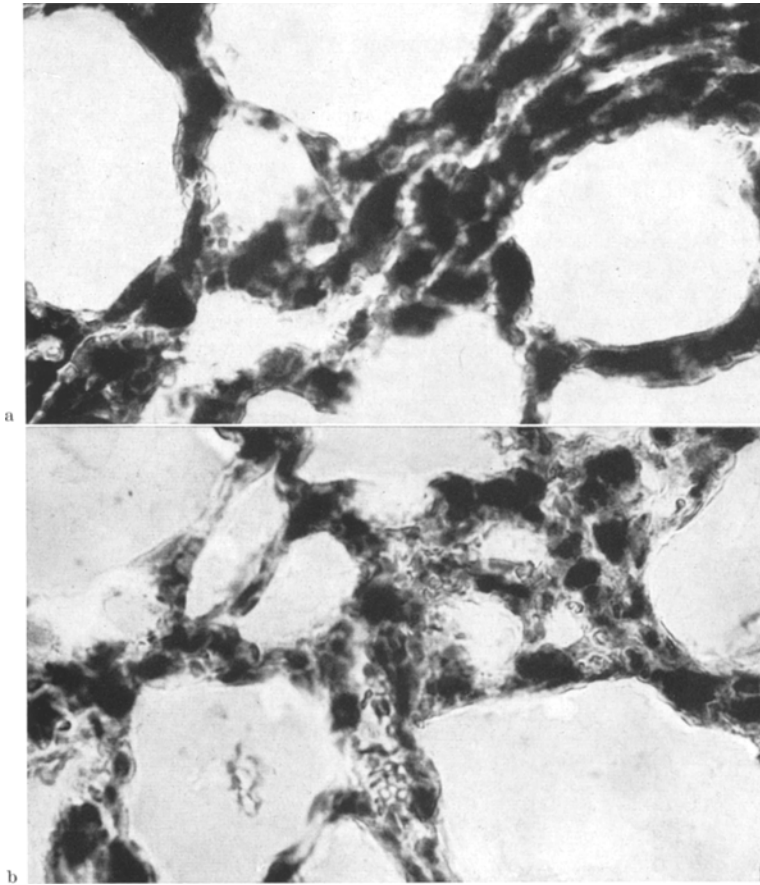


Abb. 2a u. b. Alveolarepithel-Reaktion bei Cortisol-Pneumonie. 49. Versuchstag. Nachweis unspezifischer Esterase. Gelatine-Einbettung. 500fache Vergrößerung. a Gesteigerte und diffuse Esterase-Aktivität des geschwollenen Epithels auch außerhalb pneumonisch veränderter Bezirke (ohne Inhalationsbehandlung). b Abnahme der pathologisch gesteigerten Esterase-Aktivität 30 min nach der 3. Inhalation von E 600

Färbung des Cytoplasma nach McMANUS ergeben (Gehalt an Mucopolysacchariden). Diese Zellen zeigen stark vermehrte Aktivität an Esterase (Abb. 2a) und etwas geringere Aktivität an Lipase. Beide Fermentnachweise sind im Gelatine-Präparat deutlicher ausgeprägt als in den Paraffinschnitten. Das gleiche gilt für die Fermentaktivität des noch stärker reagierenden Bronchialepithels.

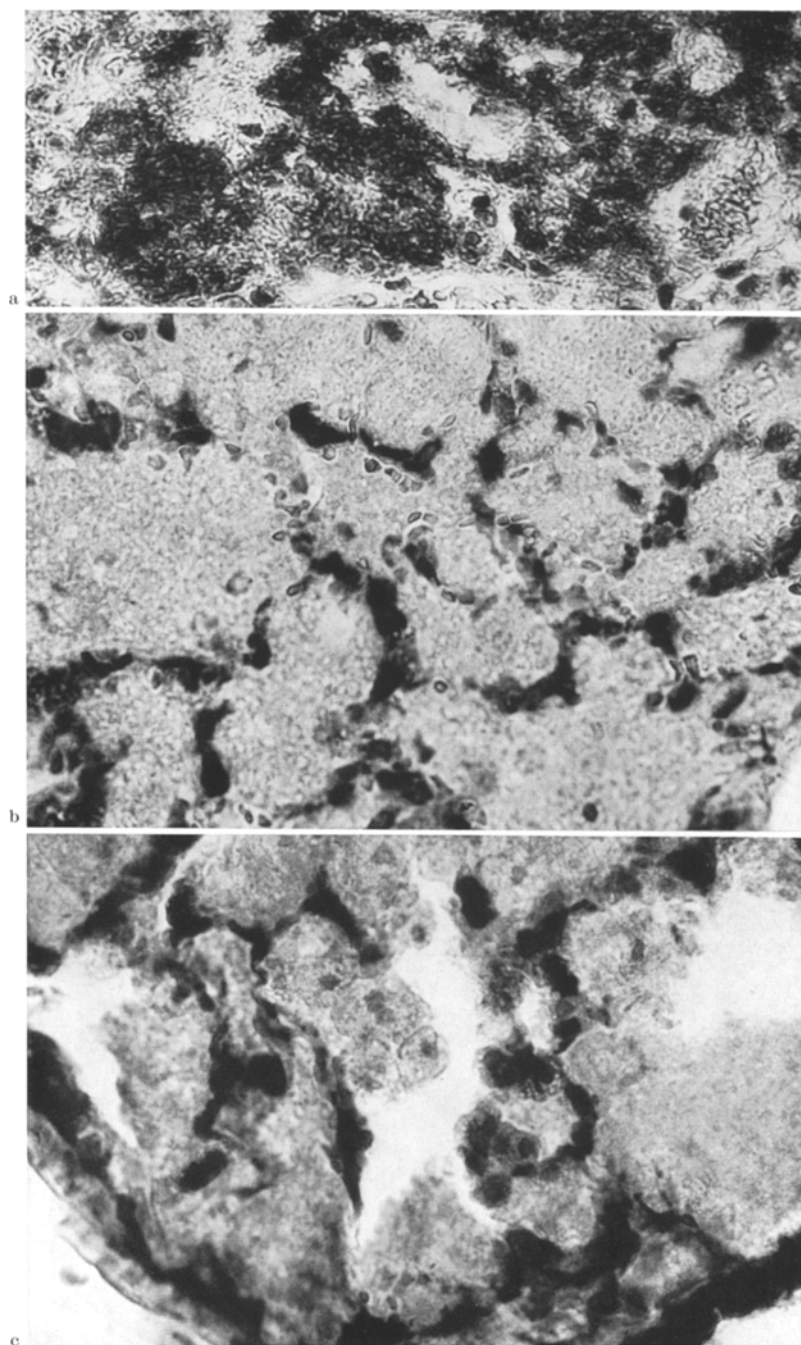


Abb. 3a—c. Intraalveoläre Veränderungen bei Cortisol-Pneumonie. 49. Versuchstag. Nachweis unspezifischer Esterase. Gelatine-Einbettung. 500fache Vergrößerung. a Intraalveoläre Pneumocystis-Verbände mit reichlicher Esterase-Aktivität (ohne Inhalations-Behandlung). b Negativer Esterasenachweis an Pneumocystis-Verbänden unmittelbar nach der 2. Inhalation von E 600. c Unspezifische Veränderungen in Form eines sog. Schwammzellherdes. Nur das Alveolarepithel ergibt Esterase-Aktivität

Mit Abstoßung der stark geschwollenen Alveolarepithelien kommt es zur Transformation in freie lipoidbeladene Alveolarmakrophagen (Schaumzellen).

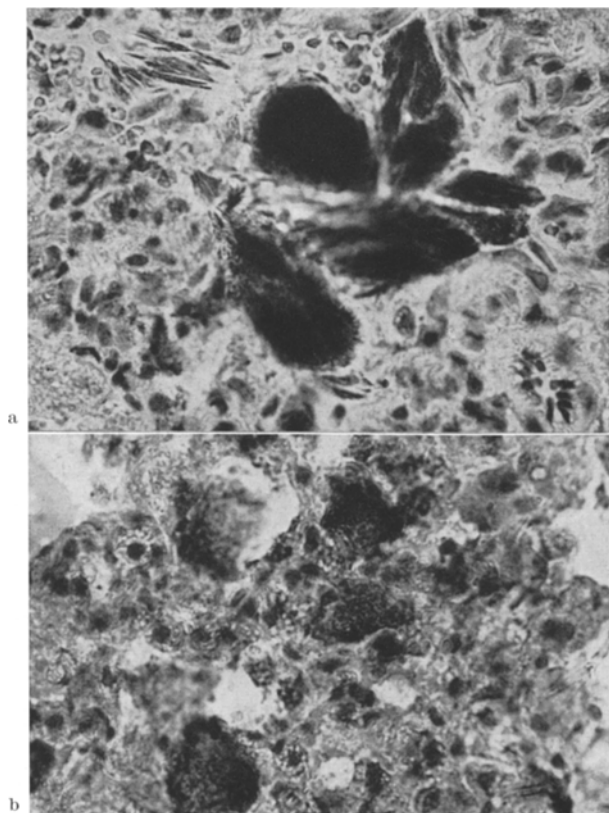


Abb. 4a u. b. Detritusmaterial bei Cortisol-Pneumonie. 49. Versuchstag. Lipase-Nachweis ohne Substrat. Gelatine-Einbettung. 450fache Vergrößerung. a Fettsäure-Nadeln in einem Bronchus und in einer benachbarten Alveole (links oben), b „Fett-Detritus“ in zerfallenden Pneumocystisrasen 30 min nach der 4. Inhalation von E 600

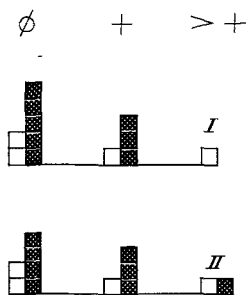


Abb. 5. Übersicht über Häufigkeit und Schweregrad der Pneumocystose in Versuch I und II. Erklärungen: □ Cortisolbehandelte Tiere ohne Inhalation, ■ Cortisolbehandelte Tiere mit Inhalation von E 600; ∅ keine Pneumocystose; + geringgradige Pneumocystose; >+ stärkergradige Pneumocystose

Damit ist eine starke Abnahme der Färbbarkeit nach McMANUS und ein fast völliger Schwund der Fermentaktivität an Esterase, vor allem aber an Lipase, verbunden (Abb. 3c). Die Schaumzellen treten in das Lumen kleiner Bronchien über. Aus ihrem Zerfall entstehen herdförmige Ansammlungen von Fettsäurenadeln (Abb. 4a).

Die Schaumzellherde nehmen mit der Dauer der Cortisol-Medikation an Zahl und Ausdehnung zu. Die stärksten Veränderungen dieser Art finden sich bei den nach dem 42. Versuchstage getöteten Kontrolltieren. Dagegen bestehen eitrig Bronchitis und Bronchopneumonien (als Todesursache) vor allem bei den Tieren, die vor dem 41. Versuchstage spontan sterben.

Als spezifisches Symptom der Cortisol-Pneumonie der Ratte entwickelt sich die Pneumocystose. Sie tritt (Abb. 5) im Versuch II, entsprechend der höheren Cortisol-Dosierung häufiger auf (6/12) als im Versuch I (5/12). Die Besiedlung der Lungen mit *Pneumocystis carinii* erfolgt zunächst herdförmig „tapezierend“ an den Alveolarwänden und verstärkt sich bis zur alveolenfüllenden Ansammlung dünnwandiger Pneumocysten. Diese ergeben reichliche Färbung nach McMANUS und starke Esterase- und Lipase-Aktivität, vor allem im Gelatine-Präparat (Abb. 3a). Außerdem finden sich mehr oder weniger zahlreiche dickwandige Pneumocysten ohne oder mit 4–8 Cystenkörperchen. Die dickwandigen Pneumocysten liegen gleichfalls wandständig oder später inmitten der dünnwandigen Pneumocystis-Rasen. Sie ergeben zusätzlich Färbbarkeit nach GRAM und GRIDLEY und zeigen verstärkte Fermentaktivität.

Einfluß von E 600 auf die histologisch-histochemischen Lungenbefunde

An den Kryostat-Schnitten *normaler Rattenlungen* (Abb. 6) führt E 600 noch in der molaren Konzentration von 10^{-7} zu einer deutlichen Hemmung der Esterase-Aktivität (Abb. 6b). Der fermenthistochemische Nachweis wird völlig negativ für das Bronchialepithel bei der molaren Konzentration von 10^{-3} (Abb. 6d), für das Alveolarepithel bei 10^{-4} . Dies entspricht der eindeutig und konstant stärkeren Fermentaktivität des Bronchialepithels im Vergleich zum Alveolarepithel.

An den Rattenlungen mit *Cortisol-Pneumonie* führt die Inhalation von E 600 zu folgenden Veränderungen: In allen Präparaten läßt sich noch Stunden nach der Inhalation eine mehr oder weniger starke Überblähung der Alveolen in den cranialen Lungenabschnitten nachweisen. Im Versuch I (E 600-Konzentration 1:1000) findet sich bei den bis 2 Std nach der Inhalation gestorbenen oder getöteten Tieren eine diffuse, gering- bis mittelgradige Schwellung des Alveolarepithels auch in den nicht pneumonisch veränderten Bezirken. Diese Reaktion ist im Versuch II (E 600-Konzentration 1:1500) kaum zu beobachten.

Die Inhalationsbehandlung führt unmittelbar nach der Einwirkung des E 600 zu keiner histochemisch nachweisbaren Aktivitätsabnahme der Esterase im Bronchial- und Alveolarepithel. Doch ist einige Stunden nach der Inhalation, besonders bei den mehrmals inhalierenden Tieren, eine Tendenz zur „Alveolarreinigung“ unverkennbar: Die Anzahl der stark geschwellenen Alveolarzellen verringert sich deutlich, und ihre histochemisch nachweisbare Esterase-Aktivität nimmt progressiv bis zur Normalisierung des Befundes ab (Abb. 2b). Die Anzahl der Schaumzellherde ist zwar nicht eindeutig vermindert, doch zeigen die Alveolarmakrophagen vermehrte Degenerationserscheinungen mit bröckligem Zellzerfall und mit Ausbildung von feinsten oder gröberen Fettsäurenadeln.

Die *Wirkung der Inhalation von E 600 auf die Pneumocystose* äußert sich in folgender Weise: Die sonst gute Färbbarkeit der Pneumocysten nach McMANUS ist besonders bei den Tieren verwaschen oder aufgehoben, die in kurzem Zeitintervall nach der Inhalation getötet wurden. Die Gramfärbung ergibt dann einen bröckligen Zerfall grampositiver dickwandiger Cysten. Oft sind diese Cystenformen nur noch durch feine, schattenhafte, grampositive Konturen erkennbar. Besonders eindrucksvoll ist der Verlust der sonst starken Esterase-Aktivität an den Pneumocystis-Verbänden bei kurzem Zeitabstand zur Inhalation (Abb. 3b). Bei den mehrmals inhalierenden Tieren finden sich feingranu-

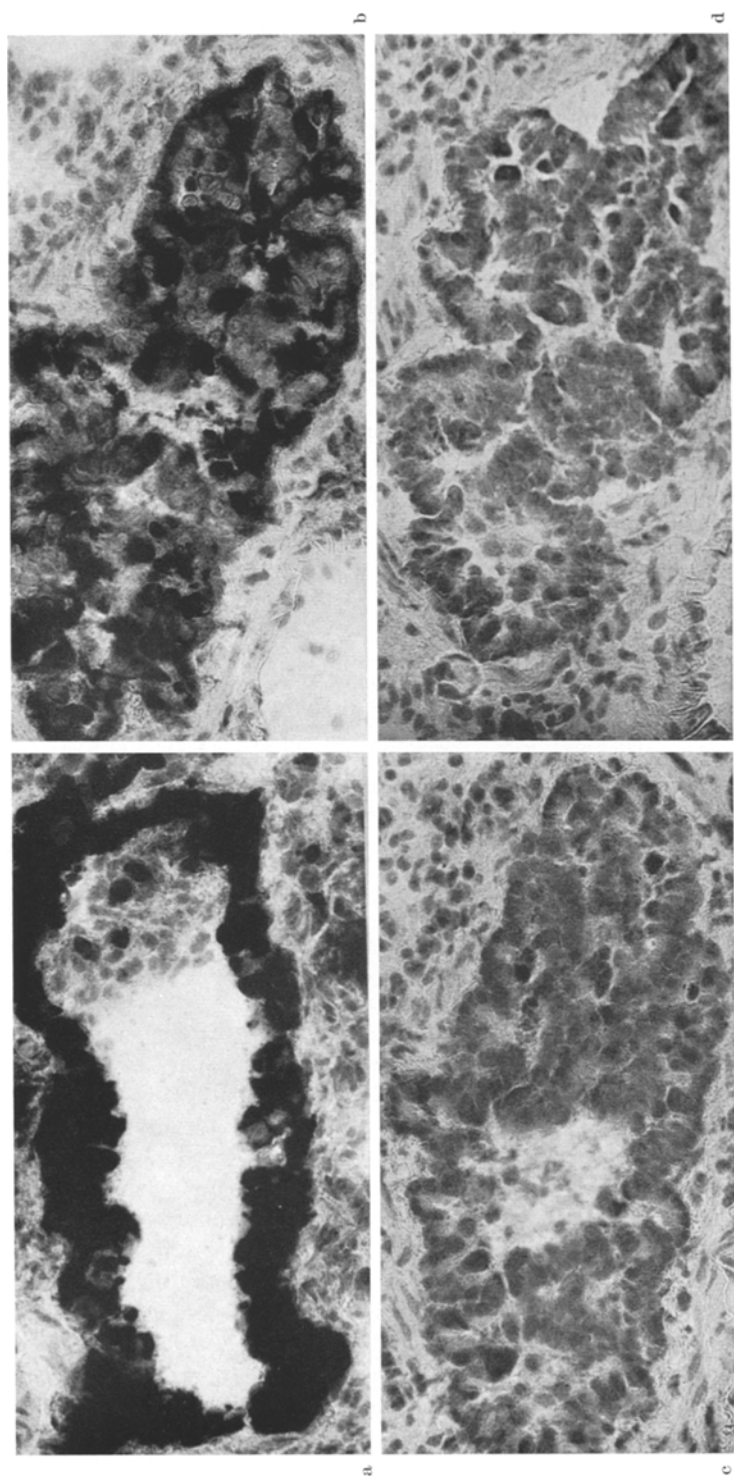


Abb. 6a—d. Esterase-Hemmwirkung von E 600 auf das Bronchialepithel in vitro. Normale Rattenlungen. Nachweis unspezifischer Esterase. Kryostat-Methodik. 300fache Vergrößerung. a Kontrolle ohne E 600; b molare Konzentration von E 600 = $1 \cdot 10^{-7}$; c E 600 = $1 \cdot 10^{-6}$; d E 600 = $1 \cdot 10^{-5}$

läre Massen in den Alveolen (Abb. 4b), die wir in unseren bisherigen Versuchsreihen (PLIESS und TRODE; PLIESS und SUHR; PLIESS und SEIFERT) bei Cortisol-Pneumonie nicht beobachtet haben. Diese feingranulären intraalveolären Massen sind mit der Lipase-Methodik nach GOMORI ohne Substrat im Inkubationsmedium nachweisbar. Es handelt sich also um originär in den Alveolen vorhandene Fett-Spaltungsprodukte, die offenbar durch Zerfall von Pneumocystis-Rasen zustande gekommen sind.

Diskussion

Die Befunde aus beiden Versuchsreihen bestätigen bereits früher mitgeteilte Charakteristica der Cortisol-Pneumonie der Ratte (PLIESS und SUHR). Wir konnten jetzt ergänzend nachweisen, daß bei den *unspezifischen Veränderungen der Cortisol-Pneumonie* die Alveolarzellschwellung mit einer deutlichen Verstärkung der Esterase-Aktivität einhergeht, während eine geringe Aktivität an „Lipase“ (Tween-Methodik) nur in stärker geschwollenen Alveolarwandzellen nachweisbar ist. Die Aktivierung der Esterase ist kein Spezificum der Cortisol-Pneumonie. Sie tritt auch in aktivierten Alveolarzellen nach intravenöser Zufuhr von Chinatusche oder Trypanblau (VERNE und HÉBERT) und bei der experimentellen Silikose der Ratte auf (SIMON).

Die Umwandlung der aktivierten Alveolarwandzellen zu Alveolarmakrophagen (sog. Lipoid- oder Polysaccharidzellen) ist mit einem Schwund der histochemisch nachweisbaren Esterase-Aktivität verbunden. Dieser Befund korreliert sich mit den früheren Beobachtungen (PLIESS und SUHR), daß die Bildung der Alveolarmakrophagen mit einer Aktivitätssteigerung der Mitochondrienfermente Cytochrom-c-Oxydase und Succino-Dehydrogenase einhergeht. Dieser Befund spricht dafür, daß die Alveolarmakrophagen stoffwechselaktive Zellen sind. Die Bedeutung der histochemisch nachweisbaren Fermentaktivierung in den Alveolarwandzellen (Esterase, Lipase) und in den Alveolarmakrophagen (Cytochrom-c-Oxydase, Succino-Dehydrogenase) für den Zellstoffwechsel bzw. für die Funktion dieser Zellelemente in der Rattenlunge ist unbekannt. Es handelt sich ja bei histochemischen Nachweisen zunächst nur um Methoden zur feineren Zelldifferenzierung, die allerdings auch einen gewissen Rückschluß auf Veränderungen der Zellaktivität gestatten. Eine Brücke zwischen den histochemischen Befunden und der aktuellen Biochemie des Zellstoffwechsels besteht nicht; denn die Substrat-Spezifität der histochemischen Reaktionen ist noch unvollkommen, und der intracelluläre Schwellenwert für den lichtoptischen Nachweis von Fermenten und Stoffen liegt noch zu hoch. Die relativ „grobe“ histotopochemische Methodik ist daher auch für die Erfassung feinerer quantitativer Unterschiede der Fermentaktivität wenig geeignet.

Dies zeigt sich bei Testung der *Esterase-Hemmwirkung von E 600* an Kryostatschnitten der Rattenlunge *in vitro*. Die Änderung der molaren Konzentration des E 600 um eine Zehnerpotenz (z. B. von 10^{-7} auf 10^{-6}) ergibt histochemisch keine signifikante Änderung der Esterase-Aktivität im Bronchial- und Alveolarepithel, während Konzentrationsunterschiede in Höhe von zwei Zehnerpotenzen im Hemmeffekt erfaßbar sind (Abb. 6). Es ist daher nicht verwunderlich, daß bei den kurz nach einer E 600-Inhalation verstorbenen oder getöteten Tieren histochemisch keine Esterase-Hemmung am Bronchial- und Alveolarepithel nachweisbar ist. Aus diesem Befund darf geschlossen werden, daß die Aufnahme

des vernebelten E 600 im Bronchial- und Alveolarepithel nicht die molare Konzentration von 10^{-7} erreicht, mit der E 600 *in vitro* bereits einen gewissen Hemmeffekt hervorruft. Trotz negativen histochemischen Nachweises einer Esterase-Hemmung *in vivo* läßt sich aus dem Verhalten des Alveolarepithels schließen, daß E 600 mit der Vernebelung in die Lungen gelangt und cytobiologische Effekte auslöst: Einige Stunden nach der kurzdauernden Inhalationsbehandlung besteht eine Tendenz zur „Alveolarreinigung“ in Form von Schwund (Abstoßung? Auflösung?) der stark geschwollenen seßhaften Alveolarepithelien und der Alveolarmakrophagen, die unter Bildung von Fettsäurenadeln zerfallen.

Von diesen Befunden ist eine gering- bis mittelgradige diffuse Schwellung des Alveolarepithels auch in nicht-pneumonisch veränderten Lungenbezirken abzugrenzen, die noch einige Stunden nach der Inhalationsbehandlung bestehenbleibt. Es handelt sich dabei mit Wahrscheinlichkeit um eine unspezifische Reaktion auf den Inhalationsreiz (Lösungsmittel?), die in weiteren Experimenten näher zu untersuchen ist.

Bei den mehrmals inhalierenden Tieren zeigt auch die durch die Cortisol-Pneumonie gesteigerte Esterase-Aktivität der seßhaften Alveolarepithelien deutliche Tendenz zur „Normalisierung“. Dieser Befund und die Tendenz zur „Alveolarreinigung“ führen zu der Folgerung, daß bereits eine sehr kurz dauernde und am Wirkungsort unter der molaren Konzentration von 10^{-7} liegende Zufuhr von E 600 die weitere Proliferation und Fermentaktivierung des Alveolarepithels verhindert und den Zerfall von Alveolarmakrophagen beschleunigt. Ob dieser Befund durch eine — histochemisch nicht erfaßbare — Esterase-Hemmwirkung oder durch anderweitige cytotoxische Wirkungen des E 600 zustande kommt, läßt sich aus unseren Experimenten nicht entscheiden.

Die *Hemmwirkung von E 600 auf die Proliferation des Alveolarepithels bei der Cortisol-Pneumonie* steht in Analogie zu Versuchen von SIMON bei der experimentellen Silikose der Ratte. Durch Chlorochindiphosphat (7-Chloro-4-(4'-diäthylamino-1'-methyl-butylamino)-chinolindiphosphat), das ursprünglich zur Malaria-Behandlung entwickelt wurde, konnte SIMON die proliferative Phase der experimentellen Rattensilikose über Zeiträume von 12 Wochen fast vollständig unterdrücken. Diese Wirkung erklärt SIMON mit einer fermentativen Dyskinese der Zellen: Chlorochindiphosphat blockiert SH-Gruppen und hemmt damit zahlreiche Fermente, die funktionelle SH-Gruppen als Wirkungszentren benötigen (Fermente des Citronensäurecyclus, der biologischen Endoxydation, des Adenylsäuresystems, des Eiweiß-, Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels).

Im Gegensatz zum Bronchial- und Alveolarepithel läßt sich an den intra-alveolären *Pneumocystis*-Verbänden nach Inhalation von E 600 eine auffällige Hemmung der Esterase-Aktivität nachweisen, die mit färberisch nachweisbaren Zerfallserscheinungen der Erreger verbunden ist. Es ist fraglich, ob der Schwund der Esterase-Aktivität in den Pneumocysten nur auf eine direkte chemische Blockade des Fermentes zurückzuführen ist. Mehr Wahrscheinlichkeit besitzt nach unserer Meinung die Annahme, daß der *Fermentverlust die unspezifische Begleiterscheinung eines allgemeinen Vitalitätsverlustes der Pneumocysten* darstellt. Ob die Vitalität von *Pneumocystis carinii* bereits durch eine geringgradige Dysfermentie infolge Aufnahme von E 600 ausgelöst wird, oder ob dabei noch andere cytotoxische Wirkungen von E 600 eine Rolle spielen, bleibt vorerst offen. Wir müssen auch betonen, daß in den hier mitgeteilten Versuchen von einer „Heilung“ der experimentellen Ratten-Pneumocystose keine Rede sein kann.

Unsere Befunde ergeben aber eindeutig, daß die große Spontantendenz zum Vitalitätsverlust von *Pneumocystis carinii* durch Spray-Behandlung mit einem Esterasehemmer beträchtlich gesteigert werden kann. In Verbindung mit der oben diskutierten „Alveolarreinigung“ setzt dadurch eine Rückbildung der Cortisol-Pneumonie ein, die sich auch in der Besserung des Allgemeinbefindens bei den behandelten Tieren äußert. Dieses Ergebnis berechtigt zu weiteren Versuchen einer Spray-Behandlung der experimentellen Cortisol-Pneumonie der Ratte in der Hoffnung, Ansatzpunkte zu einer kausalen Therapie der analogen *Pneumocystis*-Pneumonie des Menschen zu finden, die insbesondere als interstitielle plasmacelluläre Säuglingspneumonie (HAMPERL) mit hoher Infektiosität und Mortalität verbunden ist.

Zusammenfassung

Die Alveolarzellschwellung bei der experimentellen Cortisol-Pneumonie der Jungratte ist mit einer beträchtlichen Zunahme der histochemisch nachweisbaren Aktivität an unspezifischer Esterase verbunden. Die im weiteren Verlaufe die Lungenalveolen besiedelnde *Pneumocystis carinii* ergibt ebenfalls starke Aktivität an unspezifischer Esterase. Wenn man die Tiere nach dem 45. oder 46. Versuchstage einer ein- oder mehrmaligen Inhalationsbehandlung mit einem vernebelten Esterasehemmer aussetzt (Mintacol = E 600 = Diäthyl-p-Nitrophenylphosphat), wird die Cortisol-Pneumonie in folgender Weise beeinflusst:

1. Das Allgemeinbefinden der Tiere bessert sich auffallend.
2. Die herdförmige Alveolarzellschwellung wird unterbunden, der Zerfall der freien Alveolarmakrophagen beschleunigt. Die nach mehrmaliger Inhalation deutliche Tendenz zur Normalisierung der gesteigerten Esterase-Aktivität steht offenbar im Zusammenhang mit einer allgemeinen, noch nicht näher definierbaren Hemmwirkung des E 600 auf das Alveolarepithel.
3. Intraalveoläre *Pneumocystis*verbände zeigen weitgehenden oder vollständigen histochemischen Aktivitätsverlust der Esterase und Zerfallserscheinungen. Die Möglichkeit einer Spray-Behandlung der menschlichen *Pneumocystis*-Pneumonie mit Fermenthemmern wird diskutiert.

The Effect of Intravital Inhibition of Esterase on the Cortisol Pneumonia of the Rat

Summary

In the experimental cortisol pneumonia of the young rat the swelling of the alveolar cells is related to a considerable increase of the histochemically detectable activity of non-specific esterase. In addition, the pulmonary alveoli become infected with *pneumocystis carinii* which likewise show an intense activity of non-specific esterase. If the animals are treated briefly (after the 45th or 46th experimental day) with single or repeated inhalations of nebulized esterase inhibitor (Mintacol = E 600 = diethyl-p-nitrophenyl phosphate), the cortisol pneumonia is effected in the following way: 1. The focal swelling of the alveolar cells is prevented; the destruction of the free alveolar macrophages is enhanced. The obvious tendency towards a normalization of the increased esterase activity, which occurs after repeated inhalations, is related apparently to a general inhibitory effect of E 600 on the alveolar epithelium; this effect at present cannot

be better defined. 2. Intra-alveolar groups of pneumocystis show advanced or complete loss of histochemical activity of esterase and evidences of degeneration. The possibility of treating human pneumocystosis with an aerosol of E 600 is discussed.

Literatur

- HAMPERL, H.: Die pathologische Anatomie der interstitiellen Pneumonie. *M Schr. Kinderheilk.* **108**, 132 (1960).
- MEYER, F.: Untersuchungen über 17 neue Dialkyl-dihalogenvinyl- und -tetrahalogenäthylphosphate. *Habil.-Schr. Hamburg* 1953.
- PLIESS, G., u. A. SUHR: Histochemische Befunde an der Rattenlunge nach Cortisonmedikation. *Beitr. path. Anat.* **121**, 406 (1959).
- , u. H. TRODE: Experimentelle Pneumocystose. *Frankfurt. Z. Path.* **69**, 231 (1958).
- RICKEN, D.: Histologische Untersuchungen bei experimenteller Pneumocystis-Pneumonie. *Virchows Arch. path. Anat.* **331**, 713 (1958).
- SCHULTZE-JENA, B. S.: Histochemische Untersuchungen zur interstitiellen Pneumonie. *M Schr. Kinderheilk.* **108**, 156 (1960).
- SEIFERT, K., u. G. PLIESS: Beitrag zum Entwicklungscyclus von *Pneumocystis carinii* auf vergleichend elektronenoptischer und cytochemischer Basis. *Beitr. path. Anat.* **123**, 412 (1960).
- SIMON, K.: Histochemische Untersuchungen zur Wirkung von Chlorochindiphosphat. *Naturwissenschaften* **48**, 647 (1961).
- VERNE, J., et S. HÉBERT: La cytochimie des estérases dans le poumon du rat blanc et le développement de leur activité postnatale. *C. R. Soc. biol. (Paris)* **147**, 274 (1953).
- WELLER, R.: Zur Erzeugung von Pneumocystosen im Tierversuch. *Z. Kinderheilk.* **76**, 366 (1955).
- WESSEL, W., u. D. RICKEN: Elektronenoptische Untersuchung von *Pneumocystis carinii*. *Virchows Arch. path. Anat.* **331**, 545 (1958).

Prof. Dr. G. PLIESS,
Pathologisches Institut, 2 Hamburg 20, Martinistr. 52