

Das Verhalten einiger Fermente und Elektrolyte der Gefäßwand bei der experimentellen Hypertonie der Ratte

JU. W. POSTNOV

Laboratorium für Pathologische Anatomie (Leiter: Prof. Dr. A. M. WICHERT)
des Instituts für Therapie der Akademie der medizinischen Wissenschaften der UdSSR,
Moskau (Direktor: Prof. Dr. A. L. MYASNIKOV)

Eingegangen am 10. Februar 1966

Ausgehend von zahlreichen biochemischen und histochemischen Befunden zur Normologie und Pathologie der Gefäßwand ist es das Ziel unserer vorliegenden Untersuchungen, das Verhalten verschiedener Enzyme und Elektrolyte in der Rattenaorta unter den Bedingungen einer experimentellen nephrogenen Hypertonie darzustellen.

Methodik

Wir operierten 120 Ratten nach der Methode der „endokrinen Niere“ (SELYE, 1952). Hierbei erfolgt eine Einengung der Bauchaorta zwischen dem Abgang beider Nierenarterien. Als Folge hiervon kommt es zu einer Minderdurchblutung der linken Niere mit Atrophie derselben und Ausbildung eines Hypertonus mit Herzhypertrophie und Gefäßveränderungen. Bei den Kontrolltieren wurde eine Scheinoperation ohne Einengung der Aorta durchgeführt. In vorliegender Arbeit fanden 54 Versuchstiere neben 40 Kontrollratten Verwendung. Entscheidend für die Auswahl der Versuchstiere waren das Ausmaß der Hypertrophie des linken Ventrikels sowie die Höhe des Blutdrucks, der in der A. carotis communis unmittelbar vor der Tötung der Tiere gemessen wurde. Diese erfolgte durch Decapitation am 10. und 20. Tag nach der Operation (15 Versuchs- und 10 Kontrolltiere je Versuchsgruppe) sowie am 30. Tag post operationem (14 Versuchs- und 10 Kontrolltiere) (Tabelle 1). Die Aorta wurde unmittelbar nach der Tötung entnommen, ein Segment der Brustaorta abgetrennt und bis zur Tötung aller Tiere auf Trockeneis im Kühlschrank aufbewahrt (gewöhnlich nicht länger als 40 min).

Tabelle 1

Versuchstag	Zahl der Ratten	Systolischer Blutdruck in mm Hg	Herzgewicht in mg
Kontrollen	30	80—120	¹
10. Versuchstag	15	140—155	684 ± 9,5 (453 ± 7,0)
20. Versuchstag	15	150—200	807 ± 10,6 (554 ± 6,5)
30. Versuchstag	14	145—180	893 ± 8,0 (620 ± 7,2)

¹ Die Gewichte der Kontrollherzen sind jeweils in der Klammer bei den einzelnen Versuchsguppen angegeben.

Unfixierte Gewebsstücke der Aorta wurden entweder nach dem Messertiefkühlverfahren oder bei einer Temperatur von —20° C im Pearse-Kryostaten geschnitten. Die alkalische und saure Phosphatase (APase und SPase) wurde nach GOMORI (1950) bestimmt, die unspezifischen Esterasen mit der Methode nach NACHLAS u. SELIGMAN (1949) in einer Modifikation nach GOMORI mit a-Naphthylacetat als Substrat. Die Darstellung der NADH₂- und NADPH₂-Cytochrom-c-Reductase (Diaphorase I und Diaphorase II) erfolgte nach SCARPELLI u. Mitarb. (1958), die der Succinodehydrogenase (SDH) nach NACHLAS u. Mitarb. (1957) unter der Verwendung von Nitro-BT als Wasserstoffacceptor. Weiter wiesen wir die Leucinaminopeptidase (LAP) nach BURSTONE u. FOLK (1956) mit 1-Leucil-β-Naphthylamid als Substrat

und Echtschwarz K als Diazoniumsalz nach. Zur Darstellung der Adenosintriphosphatase (ATPase) verfahren wir nach der Ca-Methode von PADYKULA u. HERMAN (1955).

Zur Bestimmung der Elektrolyte (Na, K und Ca) in der Aorta wurden 10 Tiere verwendet, die am 10. Versuchstag getötet wurden. Außerdem fanden 10 Kontrolltiere Verwendung. Nach der Entnahme der Aorta wurde diese sorgfältig von der Adventitia befreit und bei einer Temperatur von 110° C getrocknet. Nach Bestimmung des Trockengewichts und Veraschung in Salpetersäure wurden die Elektrolyte im Flammenphotometer nach Zeiss quantitativ bestimmt. Die Angaben über den Elektrolytgehalt der Aorta bei den Versuchs- und Kontrolltieren sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt.

Ergebnisse

Bei der üblichen histologischen Untersuchung der Aorta ist am 10. Tag nach der Operation eine Schwellung der subendothelialen Schichten der Intima mit einer Anhäufung von sauren Mucopolysacchariden zu beobachten. Der gleiche Befund ergibt sich in den angrenzenden Schichten der Media. In den Arterien des Herzens, den Intercostal- und Mesenterialarterien finden sich zu diesem Zeitpunkt schwere fibrinoide Veränderungen der Wandung.

Am 20. Tag kann man außer diesen Veränderungen eine Hypertrophie der Muskelfasern der Media feststellen, die am 30. Tag noch ausgeprägter ist. Die kleinen Arterien zeigen am 20. Tag starke proliferative Vorgänge mit Ausbildung einer Sklerose und Hyalinose am 30. Versuchstag.

Die fermenthistochemischen Untersuchungen der Aortenwand ergaben ausgeprägte Veränderungen bei den Ratten mit einer nephrogenen Hypertonie im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe. Von den dehydrierenden Enzymen

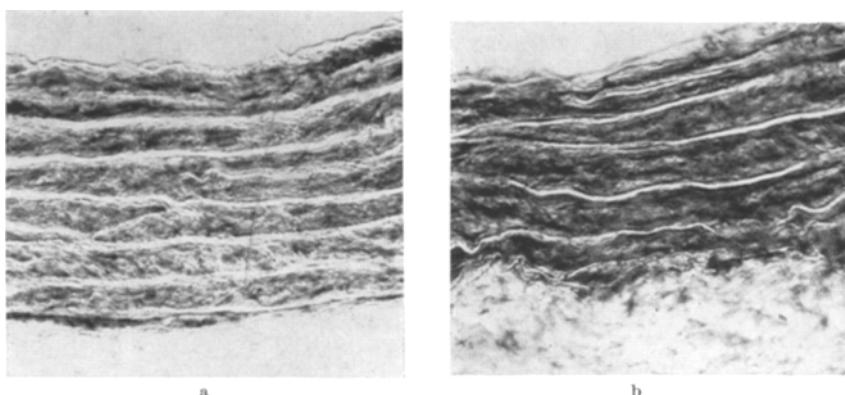


Abb. 1a u. b. Diaphorase I. Vergr. 170 x. a Kontrolltier; b Zunahme der Diaphorase-Aktivität bei Ratten am 10. Versuchstag

war bei den Kontrolltieren die Aktivität der Diaphorase I am stärksten, während die Diaphorase II und die SDH in wesentlich geringerem Umfang nachzuweisen waren.

Diaphorase I. Normalerweise findet sich dieses Enzym in den Mitochondrien der glatten Muskelfasern der Media, des Endothels und der retikulären Zellen der Adventitia sowie in Form kleinerer Granula im Protoplasma dieser Zellen.

Bei den Ratten der Versuchsgruppen, die am 10. und 20. Tag getötet wurden, war eine Aktivitätssteigerung in den glatten Muskelzellen der Media und in den Zellen der Adventitia zu bemerken. Die Endothelzellen wiesen keine Aktivitätsänderungen auf (Abb. 1) (am 30. Versuchstag wurde dieses Ferment nicht untersucht).

Diaphorase II. Die Lokalisation dieses Enzyms verhält sich entsprechend der Diaphorase I, nur mit dem Unterschied, daß ihre Aktivität im Protoplasma der glatten Muskelzellen sichtlich geringer, in den adventitiellen Zellen jedoch ausgeprägter als bei der Diaphorase I ist.

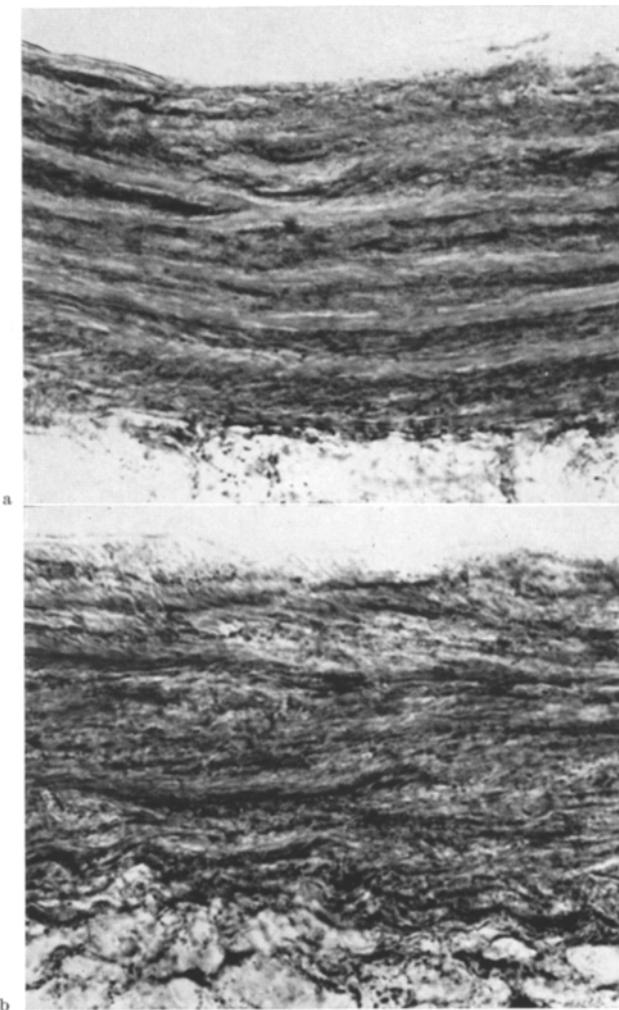


Abb. 2 a u. b. Leucinaminopeptidase. Vergr. 600 \times . a Kontrolltier; b deutliche Steigerung der Enzymaktivität am 10. Versuchstag

Die Ratten der Versuchsgruppen ließen am 10. und 20. Tag eine gesteigerte Fermentaktivität erkennen, die besonders deutlich in den retikulären Zellen der Adventitia nachzuweisen war.

Succinodehydrogenase. Im Zusammenhang mit der geringen Aktivität des Ferments im Gewebe der Aorta ist ein zuverlässiger Vergleich zwischen den Versuchs- und Kontrolltieren praktisch nicht möglich.

Leucinaminopeptidase. Bei Verwendung von Echtschwarz K erscheint die Fermentaktivität als schwach violette Körnelung auf dem hellorangen Unter-

grund des nicht aktiven Anteils des Gewebes. Bei den Kontrollen stellt sich das Ferment in der glatten Muskulatur der Media dar sowie im Endothel und in den retikulären Zellen der Adventitia. Bei den Versuchstieren liegt am 10. Tag eine erhöhte Fermentaktivität in der Media und in der Adventitia vor (Abb. 2). Am 30. Tag des Experiments unterscheidet sich die Aktivität der LAP nicht

wesentlich von der Norm, nur in den retikulären Zellen der Adventitia bleibt sie unverändert hoch.

Unspezifische Esterasen. Die glatten Muskelfasern der Media weisen eine hohe Esterasen-Aktivität auf, das Protoplasma färbt sich gleichmäßig blau an. Interessant ist die Feststellung, daß am Abgang der Intercostalarterien von der Aorta wie auch in den Herzkranzarterien eine Esterasenaktivität in der Media nicht nachzuweisen. Eine hohe Aktivität besitzen auch die retikulären Adventitialzellen und die Fettzellen.

Die Ratten, die am 10. Versuchstag getötet wurden, zeigten in der Media eine bemerkenswerte Aktivitätsabnahme (Abb. 3), besonders auffällig in ihren intimanahen Abschnitten. Am 20. Tag ist diese Aktivitätsminderung noch eindrucksvoller. Sie hält auch am 30. Versuchstag an, obwohl jetzt die an die Adventitia angrenzenden Mediananteile eine hohe Fermentaktivität aufweisen.

Adenosintriphosphatase. Die normale Rattenaorta weist eine hohe ATPase-Aktivität auf. Das Ferment stellt sich diffus im Protoplasma der glatten Muskelfasern der Media sowie im Endothel und in der Adventitia dar. Bei unserem Material waren deutliche Schwankungen der Aktivität bei den Kontrolltieren zu bemerken. Trotzdem war am 10. und

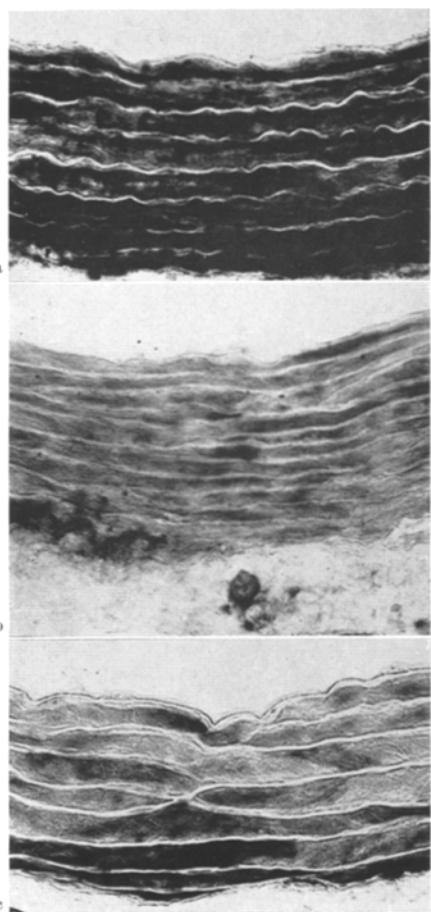


Abb. 3a—c. Unspezifische Esterasen. Vergr. 150 x. a Kontrolltier; b deutliche Aktivitätsabnahme am 10. Versuchstag; c erhebliche Aktivitätsverminde- rung auch am 30. Versuchstag

20. Versuchstag bei den hypertonischen Tieren eine sichere Aktivitätserhöhung in der Media und im Endothel der Aorta festzustellen (Abb. 4). Auch am 30. Versuchstag blieb dieser Unterschied der Fermentaktivität im Vergleich zu den Kontrolltieren bestehen, jedoch weniger ausgeprägt.

Saure Phosphatase. Die SPase stellt sich vorwiegend im Protoplasma und in den Kernen der glatten Muskelfasern sowie im Endothel und auch in der Adventitia (diffus) dar.

Im Vergleich zu den Kontrolltieren besteht bei den Versuchstieren ein eindrucksvoller Aktivitätsanstieg, der am deutlichsten in der Media der Aorta in

Erscheinung tritt (Abb. 5). Die Aktivitätszunahme dieses Enzyms hält im Verlauf des gesamten Experiments an.

Alkalische Phosphatase. Die APase findet sich fast ausschließlich in der Adventitia der Aorta und sehr viel geringer in den Kernen der glatten Muskelzellen der Media und im Endothel.

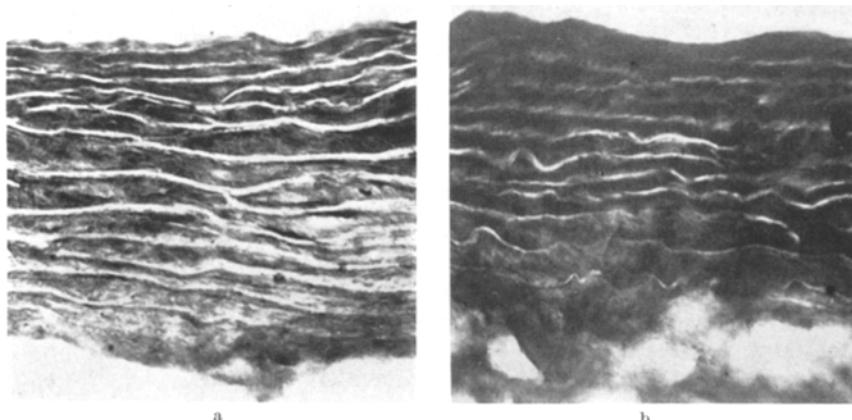


Abb. 4a u. b. ATPase. Vergr. 170 \times . a Kontrolltier; b im Vergleich zur Kontrolle gesteigerte Enzymaktivität am 10. Versuchstag

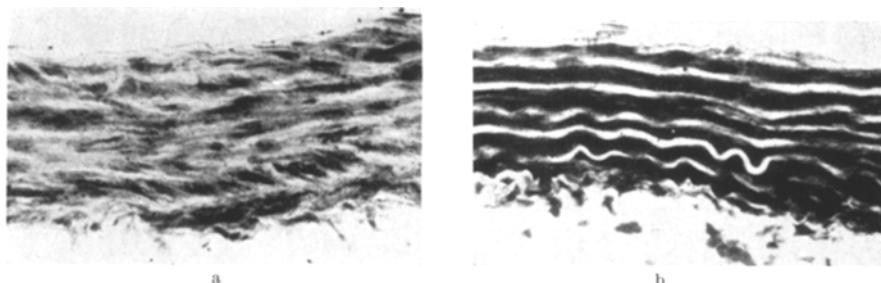


Abb. 5a u. b. Saure Phosphatase. Vergr. 150 \times . a Kontrolltier; b im Vergleich zum Kontrolltier eine deutliche Aktivitätssteigerung am 20. Versuchstag

Die Aktivitätsänderungen dieses Ferments bei den Ratten der Versuchsgruppen waren nicht so deutlich wie bei der SPase. Es ist nur zu erwähnen, daß am 20. und 30. Tag des Versuchs bei einem Teil der Tiere eine unbedeutende Erhöhung der APase-Aktivität in der Media auftritt. In der Aktivität der Adventitia und des Endothels bestanden keine Differenzen zwischen Versuchs- und Kontrolltieren.

Tabelle 2. Gehalt an Natrium, Kalium und Calcium in der Aorta von Ratten mit nephrogener Hypertonie (mÄq/kg Trockengewicht)

	Zahl der Ratten	Natrium	Kalium	Calcium
Kontrolltiere	10	268 \pm 6,2	106,8 \pm 2,8	40,8 \pm 1,0
Versuchstiere	10	306 \pm 11,5	143,0 \pm 5,0	63,3 \pm 10,2

Die Untersuchung der *Elektrolyte* im Gewebe der Aorta nach Entfernung der Adventitia ergab bei den Ratten mit nephrogener Hypertonie eine beträchtliche Erhöhung von Na, K und Ca (Tabelle 2).

Diskussion

Unsere Befunde über den Gehalt an Na und K in der Aorta von Ratten mit nephrogener Hypertonie stimmen im wesentlichen mit denen von TOBIAN u. BINION (1954) sowie FREEED u. Mitarb. (1959) überein. Die Hypertonie der Ratte wurde von diesen Autoren durch eine achtähnliche Ligatur der einen Niere mit anschließender Entfernung der anderen erzielt. Die von TOBIAN u. BINION (1954) durchgeführten Untersuchungen über den Gehalt von Na und K im Blutplasma hypertonischer und normaler Ratten ergaben keine ausgeprägten Unterschiede. Wie in diesen Untersuchungen gezeigt werden konnte, wird die Erhöhung des Na- und K-Gehaltes der Gefäßwand nicht von einer Steigerung der Chlorionenkonzentration begleitet. Man darf daher die Erhöhung der Ionenkonzentration in der Gefäßwand nicht einfach als eine Infiltration mit Bestandteilen des Blutplasmas als Folge einer Druckerhöhung deuten. Man muß vielmehr an eine Änderung des normalen *Elektrolyttransportes* durch die Gefäßwand im Sinne einer Steigerung denken.

Die bei der nephrogenen Hypertonie der Ratte zu beobachtende Konzentrationserhöhung von Na und K in der Aorta sowie die Änderung der Fermentaktivität demonstrieren verschiedene Seiten des Stoffwechsels in der Gefäßwand.

Die Veränderung der Kationenkonzentration in der Aorta, in erster Linie die von Na und K, deutet zweifellos auf den Einfluß corticaler Hormone der Nebenniere auf die Gefäßwand hin. Das bestätigen auch die Angaben von GERASIMOVA (1965), die bei der Hypertonie nach SELYE (1952) eine erhebliche Verstärkung der Biosynthese von Aldosteron in der Nebenniere hervorhebt.

Der starke Anstieg von Na und K in der Aorta bei der nephrogenen Hypertonie ist anscheinend nicht für das ganze Gefäßsystem charakteristisch, wie die Arterien kleineren Kalibers (HALPERN u. Mitarb., 1964). Hier nimmt nur der Gehalt an Na wesentlich zu, während sich die K-Konzentration nicht entscheidend ändert. In unseren Versuchen können wir die Tatsache der Erhöhung von Ca⁺⁺ in der Aorta hypertonischer Ratten nicht erklären, ebenso wie TOBIAN u. BINION (1954) früher keine Deutung für die Abnahme der Mg⁺⁺-Konzentration geben konnten. Diese Frage bedarf einer Untersuchung der Funktion der Nebenschilddrüse ebenso wie eines Studiums der Störungen der konkurrierenden Wechselbeziehungen verschiedener Kationen in der Gefäßwand bei dieser Form der experimentellen Erkrankung.

Die Verteilung der Enzymaktivitäten in der normalen Aortenwand entspricht durchaus den Angaben anderer Autoren (MALINOW u. Mitarb., 1959; SANDLER u. BOURNE, 1960; LOJDA, 1962; ZEMPLÉNYI, 1962; HECHT u. Mitarb., 1965; KUNZ u. Mitarb., 1965; OKA u. ANGRIST, 1965).

Die von uns beobachtete Erhöhung von Diaphorase I und II in der Aortenwand der Ratte bei arterieller Hypertonie spiegelt anscheinend die plötzliche Intensivierung des Kationentransports in die cellulären Strukturen der Gefäßwand wider. Der aktive Transport von Kationen durch die Zellmembran ist ebenso wie die Gewebsatmung von Oxydo-Reduktionsprozessen abhängig (HAR-

RIS, 1956; ROBERTSON, 1960 u. a.) — er beginnt in gleicher Weise wie die Atmung mit der Freisetzung von Wasserstoff, doch besteht ein Unterschied in der Richtung des Elektronenflusses.

Mit der Intensivierung dieses Prozesses des Kationentransports ist eine Zunahme der Aktivität der ATPase in der Aorta der hypertonischen Ratte verbunden als Ausdruck des vermehrten Energiebedarfs, der für den aktiven Ionentransport durch die Gefäßwand besteht und durch die oxydative Phosphorylierung gedeckt wird.

Die Steigerung der LAP-Aktivität könnte als Ausdruck einer Erhöhung proteolytischer Prozesse in der Gefäßwand angesehen werden, die möglicherweise zum Teil auf dem Abbau und der Resorption von in die Gefäßwand eingedrungenen Eiweißbestandteilen des Blutplasmas bestehen.

Interesse erfordert auch unsere Beobachtung der Veränderung der Aktivität der Esterasen, die veresterte kurzkettige Fettsäuren hydrolysieren. Der Nachweis dieser Fermente kann einer Demonstration des Ausmaßes des Lipidstoffwechsels in der Gefäßwand dienen. Wie aus den Versuchsergebnissen zu ersehen ist, ist die Aorta der hypertonen Ratten durch einen Abfall der Esterasen-Aktivität charakterisiert.

Den Anstieg der unspezifischen Phosphatasen-Aktivität schließlich muß man mit dem vorhandenen Anstieg von Calcium im Aortengewebe in Zusammenhang bringen. Dies besonders hinsichtlich einer Konzentrationserhöhung von Phosphaten, deren Hydrolyse auf die Wirksamkeit der erwähnten Fermente zurückzuführen ist. Diese Vermutung wird durch die Angaben von LOJDA (1962) bestätigt, der eine Erhöhung der Phosphatasen in der Aorta bei Vitamin D-Hypervitaminose beobachtete.

Zusammenfassung

In der Aorta von Ratten mit nephrogener Hypertonie beobachtete man eine Zunahme der Kationen Natrium, Kalium und Calcium, verbunden mit einer Aktivitätszunahme der Fermente Diaphorase I und II sowie der ATPase. Diese kann man als den Ausdruck eines erhöhten Transports von Kationen durch die Zellmembranen der Gefäßwand unter den Bedingungen der nephrogenen Hypertonie betrachten.

In der Aorta von Ratten mit nephrogener Hypertonie ist außerdem eine Steigerung der Aktivität der sauren Phosphatase und der Leucinaminopeptidase zu beobachten. Die unspezifischen Esterasen zeigen eine Aktivitätsabnahme.

The Behavior of Some Enzymes and Electrolytes of the Vessel Wall in Experimental Hypertension in the Rat

Summary

A rise in the cations sodium, potassium, and calcium was demonstrated in the aorta of rats with nephrogenic hypertension. A rise in the activity of the enzymes diaphorase I and II, and of ATPase was also observed. This behavior was viewed in relation to an increased transport of cations through the cell membranes of the vessel wall under conditions of nephrogenic hypertension. In these aortas a rise of activity of acid phosphatase and leucinamino-peptidase could also be demonstrated, whereas the nonspecific esterases diminished.

Literatur

- BURSTONE, M. S., and J. E. FOLK: Histochemical demonstration of aminopeptidases. *J. Histochem. Cytochem.* **4**, 217—226 (1956).
- FREED, CH., S. ST. GEORGE, and R. H. ROSENMANN: Arterial wall potassium in renal hypertensive rats. *Circulat. Res.* **7**, 219—223 (1959).
- GERASIMOVA, E.: Biosynthese von Kortikosteroiden bei der experimentellen Arteriosklerose und der experimentellen Hypertonie. In: *Hormone und Fermente in der Kardiologie* (Vorträge der 16. Jahrestag. des Instituts für Therapie der Akademie der medizinischen Wissenschaften der UdSSR v. 28. bis 30. 1. 1965) (im Druck).
- GOMORI, G.: An improved histochemical technic for acid phosphatase. *Stain Technol.* **25**, 81 (1950).
- HALPERN, B., PH. MEYER, G. LAGRUE, et P. MILLIEZ: Augmentation du sodium des parois arterielles et arterielles en fonction de la durée de l'hypertension arterielle. *J. Urol. Néphrol.* **70**, 143—146 (1964).
- HARRIS, E. J.: Transport and accumulation in biological systems. London: Butterworth & Co. 1956.
- HECHT, A., H. A. HACKSELLNER u. K. SAJKIEWICZ: Vergleichende fermenthistochemische Untersuchungen an der Wand und am Endothel von Aorta und A. pulmonaris. *Z. Zellforsch.* **68**, 611—617 (1965).
- KUNZ, J., A. HECHT u. H. HEGEWALD: Morphologische und fermenthistochemische Untersuchungen der Aorta des Kaninchens nach lokaler Einwirkung von Sr⁹⁰-Y⁹⁰-Bastastrahlen. *Frankfurt. Z. Path.* **74**, 293—306 (1965).
- LOJDA, Z.: The enzyme topochemistry of the arterial wall. *Čs. Morfol.* **10**, 46—61 (1962).
- MALINOW, M., M. FERNANDEZ, A. GIMENO, and G. BUR: Disturbation of alkaline phosphatase in the arteries of several species. *Nature (Lond.)* **183**, 1262—1263 (1959).
- NACHLAS, M. M., and A. M. SELIGMAN: The histochemical demonstration of esterase. *J. nat. Cancer Inst.* **9**, 415—424 (1949).
- K. C. TSOU, E. DE SOUZA, C. S. CHENG, and A. M. SELIGMAN: Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted detetrazole. *J. Histochem. Cytochem.* **5**, 420—436 (1957).
- OKA, M., and A. ANGRIST: Histoenzymatic studies of arteries in high salt hypertension. *Lab. Invest.* **14**, 1604—1615 (1965).
- PADYKULA, HELEN A., and E. HERMAN: The specificity of the histochemical method for adenosine triphosphate. *J. Histochem. Cytochem.* **3**, 170—195 (1955).
- ROBERTSON, R.: Ion transport and respiration. *Biol. Rev.* **35**, 231—264 (1960).
- SANDLER, M., and G. BOURNE: Histochemical localisation of enzymes dephosphorylating ATP and AMP in animal aorta. *J. Geront.* **15**, 32—34 (1960).
- SCARPELLI, D. G., R. HESS, and A. G. E. PEARSE: The cytochemical localization of oxidative enzymes I. Diphosphopyridine nucleotide diaphorase and triphosphopyridine nucleotide diaphorase. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 747—752 (1958).
- SELYE, H.: The study of adaptation syndrom. Montreal 1952.
- TOBIAN, L., and J. BINION: Artery wall electrolytes in renal and DCA-hypertension. *J. clin. Invest.* **33**, 1407—1414 (1954).
- ZEMPLÉNYI, T.: Enzymes of the arterial wall. *J. Atheroscler. Res.* **2**, 2—24 (1962).

Dr. JU. W. POSTNOV

Laboratorium für Pathologische Anatomie des Instituts für Therapie der Akademie der medizinischen Wissenschaften der UdSSR, Moskau, UdSSR