

Histotopochemie aktiver proteolytischer Enzyme bei der experimentellen autodigestiven Pankreatitis

U. BLEYL, K.-H. GRÖZINGER, W. NAGEL und M. WANKE

Institut für Allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie

(Direktor: Prof. Dr. W. DOERR),

Chirurgische Klinik (Direktor: Prof. Dr. F. LINDER)

und Physiologisch-Chemisches Institut (Direktor: Prof. Dr. W. KUTSCHER)
der Universität Heidelberg

Eingegangen am 2. September 1966

Im Mittelpunkt der formalen Pathogenese der „autodigestiv-tryptischen“ Pankreatitis steht das hohe enzymatische Potential der Bauchspeicheldrüse. Neben der lipolytischen Aktivität des Bauchspeichels sind es vor allem proteolytische Enzyme, die den Ablauf des Krankheitsprozesses richtunggebend beeinflussen. NAGEL und WILLIG (1964) konnten nachweisen, daß die experimentelle Pankreatitis mit einer signifikanten Vermehrung proteolytischer Enzyme einhergeht, die nicht mit Trypsin oder Chymotrypsin identisch sind. Eine spezifizierende Analyse dieser „proteolytischen Restaktivität“ (NAGEL und WILLIG) steht bislang aus.

Die vorliegenden Untersuchungen hatten das Ziel, die bei der „autodigestiv-tryptischen“ Pankreatitis auftretenden proteolytischen Enzymaktivitäten *histochemisch* zu erfassen. Wir wollten prüfen, ob den „quasispezifischen tryptischen Parenchymnekrosen“ (DOERR et al., 1965; BECKER, 1964) bei der experimentellen Pankreatitis eine histochemisch nachweisbare proteolytische Enzymaktivität topochemisch zuzuordnen ist.

Material

Bei zehn Hunden beiderlei Geschlechts, verschiedener Rassen und verschiedenen Alters wurde in Evipannarkose nach Vorbereitung mit 0,2 g Luminal und 24stündiger absoluter Nahrungskarenz eine Pankreatitis nach ELLIOTT, WILLIAMS und ZOLLINGER (1957) durch intracanalikuläre Applikation von 6 ml Olivenöl DAB 6 erzeugt. Das Pankreas wurde 2 bis 5 Std nach der Applikation von Olivenöl unmittelbar vor Tötung der Tiere entnommen und der histologische bzw. histochemischen Bearbeitung lebensfrisch zugeführt. Die feingewebliche Untersuchung erfolgte an formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe. Kontrolluntersuchungen wurden an nicht pankreatischen Hunden durchgeführt.

Die der Olivenöl-Instillation folgende autodigestive Parenchymdestruktion ist streng substratgebunden. Entsprechend der Viskosität des Infundates sind die Speichelgänge erweitert. Pericanaliculär breiten sich autodigestive Nekrosen im exkretorischen Parenchym aus. Nur die Randacini zeigen in der Regel noch keine Parenchymschäden. Die Grenze zwischen autodigestiver Parenchymdestruktion und integeren Parenchymarealen ist durch eine schmale Zone „eosinophil entarteter“, ihrer Zymogengranula beraubter Acinusepithelien gekennzeichnet (WANKE et al., 1966). Im Interstitium findet sich ein eiweißreiches, fädiges, von mäßig vielen Leukocyten durchsetztes Ödem.

Das Ausmaß autodigestiver Parenchymzerstörung war entsprechend der unterschiedlichen Versuchsdauer wechselhaft. Die „tryptischen“ Nekrosen waren jedoch in allen Pankrea-ten aufzufinden. Damit waren die morphologischen Voraussetzungen für die histotopochemischen Untersuchungen gegeben.

Untersuchungstechnik

Die histochemischen Untersuchungen wurden an Kryostatschnitten (Schnittdicke $10\ \mu$) mit einer Modifikation der Fibrin-Substratfilm-Methode nach TODD (1959) und WARREN (1964) durchgeführt. Fettfreie Objektträger wurden mit einem zarten Ausstrichfilm von in 0,9% NaCl gelöstem Thrombin (20 NIH-Einheiten/ml; „Thrombinum purum“, Behringwerke) überzogen und bei 37°C im Brutschrank bis zu vollständiger Eintrocknung verwahrt. Die Kryostatschnitte wurden auf derart präparierte Objektträger aufgezogen. Während der Schnittstreckung diffundiert das durch die Feuchtigkeit des Schnittes wieder gelöste Thrombin in den Kryostatschnitt. Nach erneutem kurzfristigem Antrocknen bei Zimmertemperatur wurden die Objektträger mit einem Fibrinogenfilm überzogen, in eine feuchte Kammer eingebracht und bis zur Fibrinbildung (5–10 min) beobachtet.

Die Fibrinogen-Filme wurden aus Rinderfibrinogen („Fibrinogen vom Rind“, Behringwerke, 90% gerinnbar, 60 mg, gelöst in 10 ml 0,9% NaCl) bei 37°C hergestellt und bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Um die Fibrinogen-Filme möglichst dünn über den Objektträgern auszubreiten, wurden 2–3 Tropfen der Fibrinogen-Lösung an einer Querkante des Objektträgers aufgetragen und mit Hilfe eines zweiten Objektträgers durch capillare Attraktion über die Kryostatschnitte verteilt.

Nach Gelbildung des Substratfilms wurden die Kryostatschnitte in der feuchten Kammer für 10–60 min bei 37°C bebrütet, unmittelbar darnach in 5% Formalin fixiert, mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und nach ausgiebiger Entwässerung des Fibrinfilms durch die aufsteigende Alkoholreihe in DePeX (GURR, London) eingedeckt.

In einer zweiten Versuchsserie haben wir der Fibrinogen-Lösung vor der Auftragung auf die Objektträger Calciumionen zugegeben. Die Fibrin-Gelbildung tritt unter Einwirkung von Ca^{++} (CaCl_2 , 0,05 m) rascher ein. Nach LAKI und LORAND (1948) enthalten die handelsüblichen Fibrinogen-Präparate zudem aber einen Fibrin-stabilisierenden Faktor (FSF, Laki-Lorand-Faktor, Fibrinase), der in Gegenwart von Calciumionen die fibrinolytische Angreifbarkeit des Fibrin durch Plasmin herabsetzt. Eigene Untersuchungen haben die Existenz dieses FSF in den von uns verwendeten Fibrinogen-Präparaten bestätigt (BLEYL, 1966). Durch Ca^{++} wird damit nicht nur die Gerinnung des Fibrinfilms beschleunigt, sondern das Substrat zugleich gegen das im Substrat gebundene fibrinolytisch wirksame Plasmin stabilisiert.

Ergebnisse

1. Substratfilm-Bebrütung der Kontroll-Pankreaten

1. Ohne Ca^{++} . Nach einhalb- bis einstündiger Inkubation der Kontrollschnitte von Hunden ohne Pankreatitis finden sich in den Substratfilmen breite, kreisrunde oder ovale Fibrinolysehöfe in der Umgebung intrapankreatischer Gefäße. Die fibrinolytische Aktivität ist über Venen und Venolen deutlich stärker als über Arterien und Arteriolen. Ausgedehnte Lysehöfe finden sich in der Regel läppchenperipher, im breiten interlobären und intralobären Bindegewebe. Kurzfristige Schnittinkubation (bis zu 15 min) erlaubt eine eindeutige Zuordnung der *initialen Lyseareale* zu den Gefäßendothelien, deren Zellen zu diesem Zeitpunkt von einem selten $10\ \mu$ überschreitenden halbmondförmigen Aufhellungsbezirk im Fibrinfilm umgeben sind, während über den eigentlichen Accessoria noch keine Fibrinolysezonen sichtbar werden. Über dem Acinusepithel und den Ausführungsgängen des exkretorischen Parenchyms fehlt die Fibrinolyse, das exkretorische Parenchym der Kontrollschnitte ist stets von einem gleichmäßig dichten, homogenen, eosinophilen Substratfilm bedeckt.

2. Nach Ca^{++} -Zusatz. Bei kurzfristiger Inkubation der Kontrollschnitte werden im Ca^{++} -haltigen Substratfilm keine Fibrinolysezonen sichtbar, auch über den interlobären Arterien und Venen bleibt der Fibrinfilm homogen eosinophil. Erst nach mehr als einhalbstündiger Bebrütung treten perivasaal kleine kreisrunde

Aufhellungsbezirke im Fibrinfilmm auf, jedoch bleiben diese Lysehöfe während der maximal 60 min dauernden Inkubation nach Ca^{++} -Zusatz zum Substratfilm stets klein. Über dem exkretorischen Parenchym fehlt erneut jede fibrinolytische Aktivität.

II. Substratfilm-Bebrütung bei der experimentellen Pankreatitis

1. *Ohne Ca^{++} -Zusatz.* Im Ca^{++} -freien Fibrinfilmm läßt sich bereits 10 min nach Inkubationsbeginn neben den über den ganzen Schnitt verteilten perivasalen, vorwiegend inter- und intralobären Lysehöfen eine diskrete Substratfilm-Aufhellung über dem autodigestiv-pankreatischen exkretorischen Parenchym erkennen, die keine topische Beziehung zu Gefäßen aufzeigt. Die Substratfilm-Andauung ist zunächst unvollständig, die für perivasale Aufhellungsbezirke charakteristische scharfe Konturierung fehlt über dem exkretorischen Parenchym. Noch ehe die ganze Schichtdicke des Substratfilms angedaut ist, konfluieren die Lysezonen über dem pankreatitischen Parenchym zu größeren Arealen.

Die *initiale Substratfilm-Andauung* liegt regelmäßig über Acinusepithelien, die feingeweblich die Symptome der autodigestiven Parenchymdestruktion erkennen lassen, während die nicht pankreatitischen Läppchenareale von einem gleichmäßig eosinophilen Substratfilm überzogen bleiben. Über vollständig nekrotischen Parenchymarealen andererseits fehlt jegliche Lyse des Fibrinfilms. Bei längerer Inkubationszeit (mehr als 30 min) ist der Substratfilm über pankreatitischem Parenchym regelmäßig vollständig abgedaut, periacinäre, perilobuläre und perivasale Lysehöfe konfluieren zu größeren Bezirken, eine Zuordnung der Lyseareale zu bestimmten Läppchenterritorien wird zunehmend schwieriger.

In Parallele zur *Proteolyse des Fibrinfilmmes* über pankreatischen Gewebbezirken zeigen bei längerer Schnittinkubation die Kryostatschnitte selbst eine rasch fortschreitende Proteolyse des pankreatischen Gewebes. Acini und Lobuli, die bei histologischer Kontrolle im Paraffinschnitt nur die Zeichen einer beginnenden pankreatitischen Autodigestion erkennen lassen, werden bei längerer Bebrütung unscharf konturiert, die Zellen verklumpen, ihr Cytoplasma sintert zusammen, die Kernanfärbbarkeit geht verloren. Diese *in vitro-Proteolyse im Gewebe* wird besonders deutlich an wechselnd lange bebrüteten Parallelschnitten. Nach 60 min zeigt das durch die Pankreatitis *in vivo* nur wenig alterierte Parenchym häufig eine ausgeprägtere proteolytische Desintegration als bereits *in vivo* vollständig nekrotisiertes exkretorisches Parenchym. Dementsprechend sind im Langzeitversuch gerade die am stärksten desintegrierten Parenchymbezirke von Lysehöfen im Substratfilm überzogen. Die andererseits bereits *in vivo* der subtotalen Nekrose anheimgefallenen, enzymatisch „ausgebrannten“ Läppchenterritorien unterliegen *in vitro* nicht mehr der sekundären Proteolyse. Sie bleiben vergleichsweise gut erhalten und werden nicht von Lysearealen im Substratfilm umgeben.

Die *in vitro-Proteolyse* des Parenchyms greift während der Bebrütung auch auf Parenchymbezirke in der unmittelbaren Umgebung autodigestiv-pankreatitischer Herde über und erfaßt hier sowohl autodigestiv desintegriertes als auch primär nicht-pankreatitisch alteriertes Gewebe. Letzteres zeigt nicht selten unter dem aufgehellten Substratfilm als auffälligstes Indiz der proteolytischen *in vitro*-Dekomposition einen Kernschwund der Acinusepithelien. Die Anfärbbarkeit der

Kerne ist aufgehoben, die Stelle der Kernlokalisation erscheint wie ausgestanzt. Das feingewebliche Bild der Parenchymzellen in der unmittelbaren Umgebung autodigestiver Desintegration entspricht dem nach Proteinase-Einwirkung auftretenden sog. Kernschwund (GROLL, 1949).

Eine Differenzierung zwischen der peripankreatitischen Substratfilm-Andauung und der perivasalen Fibrinolyse ist während der gesamten Bebrütungsdauer der Kryostatschnitte möglich. Eine *perivasale* in vitro-Proteolyse des Parenchyms mit proteolytischer Kernausstanzung haben wir während einstündiger Inkubation nie beobachtet. Die perivasale Andauung bleibt stets auf den Substratfilm beschränkt.

2. *Nach Ca^{++} -Zusatz.* Im Ca^{++} -haltigen Substratfilm spielt die durch gewebs-eigene Plasminogen-Aktivatoren hervorgerufene perivasale Fibrinolyse eine untergeordnete Rolle. Im Vordergrund steht die Substratfilm-Andauung und -Verdauung über dem autodigestiv-pankreatitischen exkretorischen Parenchym in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer. Bereits 5–10 min nach Inkubationsbeginn finden sich über frischen autodigestiven Parenchymnekrobiosen rasch größer werdende Digestionsherde im Substratfilm. Die Fibrinolyse über den Gefäßen fehlt dagegen noch vollständig (Abb. 1).

Das initiale Stadium dieser Andauung des Substratfilmes ist nicht gleichförmig. Bei Tieren, die 2 Std nach Olivenöl-Instillation getötet wurden, sind die Autodigestionsherde in der unmittelbaren Umgebung der Ausführungsgänge auf nur wenige Acini beschränkt. Die Substratfilm-Andauung (nach kurzfristiger Inkubation) und -Verdauung (nach Langzeit-Inkubation) ist dementsprechend streng auf von der Autodigestion befallene Acini lokalisiert, die Lyseareale liegen weit auseinander, aber nahezu sämtliche Autodigestionsherde sind von Lysezonen im Substratfilm umgeben. „Ausgebrannte“ Acini und Lobuli fehlen fast vollständig. Nach fünfstündiger Überlebenszeit sind Autodigestionsherde und zugehörige Lyseareale in der Regel ausgedehnter. Andauungs- und Verdauungshöfe wechseln einander im Fibrinfilmen ständig ab. Neben ausgestanzten Lysehöfen finden sich über breiten Nekrobiosefeldern nur Aufhellungen des Substratfilms als Ausdruck der bereits nahezu erloschenen enzymatischen Aktivität des zugrunde gehenden Parenchyms. Bei längeren Inkubationszeiten treten neben den Lysearealen über dem pankreatitischen exkretorischen Parenchym auch perivasale Fibrinolysezonen im Substratfilm auf. Ihre Ausdehnung bleibt aber während der gesamten Versuchsdauer hinter der entsprechend lokalisierter Gefäße bei Bebrütung im Ca^{++} -freien Substratfilm zurück.

Bei histotopochemischer Analyse der Beziehungen zwischen den Prädisloktions-orten geweblicher Autodigestion im Kryostatschnitt und der Verteilung der Lysezonen im Substratfilm finden sich die gleichen Verhältnisse wie im Ca^{++} -freien Film. Nicht-pankreatitische Parenchymbezirke sowie vollständig autodigestiv desintegrierte periductuläre Nekrosfelder lassen keine Substratfilmmandauung erkennen. Über frischeren autodigestiven Nekrobiosefeldern dagegen ist die Fibrinauflösung regelmäßig eine totale, die Proteolyse greift — wie schon für den Ca^{++} -freien Substratfilm beschrieben — auch auf primär nicht pankreatitisch verändertes Gewebe in unmittelbarer Umgebung der Autodigestionsfelder über und führt hier nicht selten zu proteolytischem Kernschwund. Mitunter sind die Lysezonen im Randbereich zwischen autodigestiver Parenchymdestruktion und integren,

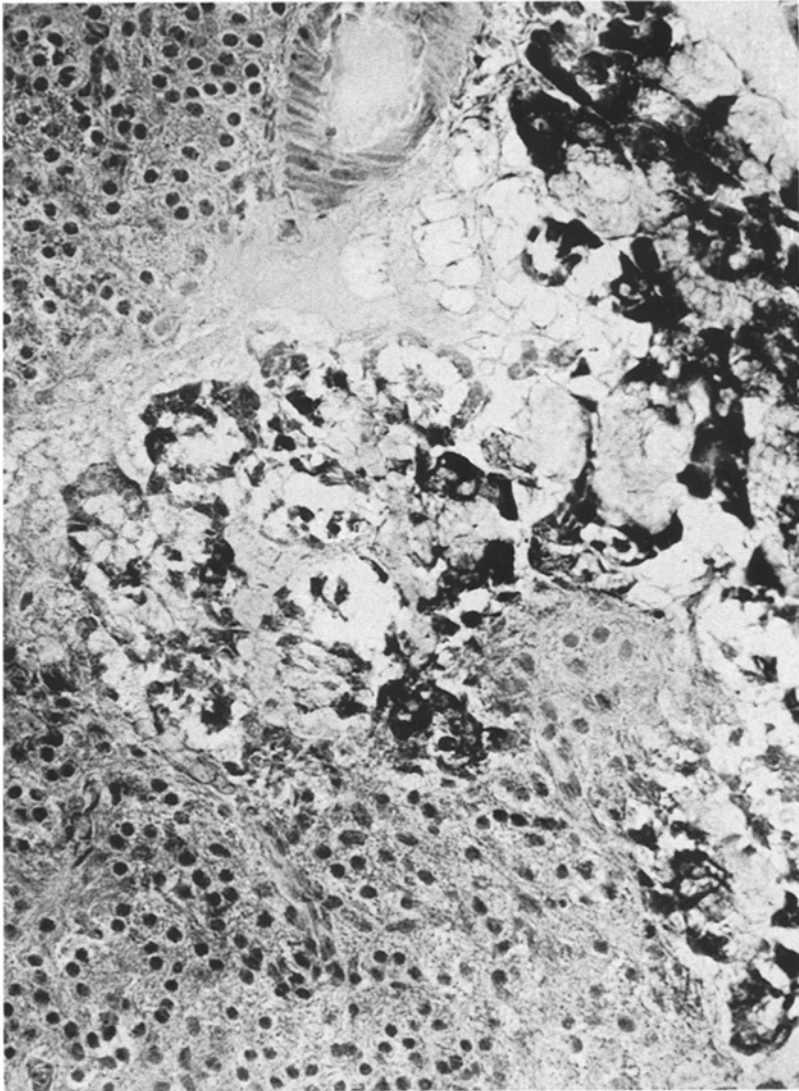


Abb. 1. Hund. Experimentelle Pankreatitis nach Instillation von 6 ml Olivenöl in den Ductus pancreaticus. Überlebenszeit 2 Std. Der von einem homogenen eosinophilen (im Schwarz-Weiß-Bild grauen) Fibrinfilmm überzogene Kryostatschnitt zeigt über nekrotischem exkretorischem Parenchym eine umschriebene Substratfilmaufhellung durch Proteolyse des Fibrins. Eine perivasale Fibrinolyse fehlt (oben im Bild). Keine Proteolyse mit Substratfilmaufhellung über nicht pankreatitisch alteriertem Parenchym. Fibrin-Substratfilm mit Ca^{++} , Bebrütungsdauer 20 min. HE, Mikrophotogramm 1:120

nicht-pankreatitischen Parenchymbezirken ausgedehnter als im Zentrum der lobulären Autodigestion.

Diskussion

Das aus dem Arbeitskreis um J. B. DUGUID von TODD in die histochemische Technik eingeführte Substratfilm-Verfahren der „fibrinolysis autographs“ gestattet eine über die Möglichkeiten des Astrupschen Fibrinplattenverfahrens (ASTRUP, 1959) hinausgehende histotopochemische Analyse der Tätigkeit sog. gewebeigener Plasminogen-Aktivatoren (TODD, 1959).

Derartige Plasminogen-Aktivatoren sind cytoplasmatisch gebunden, liegen im Endothel von Arterien und Venen (TODD, 1964; WARREN, 1964) und leiten durch eine Aktivierung des im Fibrin gebundenen Plasminogen zu Plasmin die Auflösung etwaiger auf dem Endothel der Blutgefäße niedergeschlagener Fibrinfilme ein. In Arterien und Arteriolen sind nach TODD und WARREN vornehmlich Proaktivatoren des Plasminogen nachweisbar, die erst durch Streptokinase oder Cytokinase in ihre aktive Form übergeführt, dann jedoch gleichermaßen fibrinolytisch wirksam werden.

TODD hat diesen im Rahmen der „latenten Gerinnung“ (LASCH, 1959) physiologisch wirksamen Fibrinolyse-Prozeß der Endothelzellen zu einer histochemischen Nachweismethode genutzt, bei der Nativschnitte — z. T. nach vorheriger Kontamination mit Streptokinase — mit einem Substratfilm aus Fibrin überzogen werden. Unter dem Einfluß der geweblich gebundenen, in vitro aus den Schnitten in den Substratfilm diffundierenden Plasminogen-Aktivatoren erfolgt im Substratfilm die Umwandlung des in physikalischer Korrelation zu den Fibrinmonomeren stehenden Plasminogen zu Plasmin. Plasmin verdaut, in Bindung an die Fibrinmonomeren, am Orte seiner Aktivierung den weitgehend homogenen Substratfilm. Die Fibrinolyse läßt sich nach Anfärbung des Substratfilms topochemisch in Form einigermaßen scharf abgegrenzter Fibrinolysezonen erfassen. TODD (1959—1964) und WARREN (1964) haben mit dieser Methode den Plasminogen-Aktivator- und -Proaktivator-Gehalt von Herzmuskel, Aorta, Vena cava, Leber, Milz, Niere, Schilddrüse, Ovar, Uterus, Prostata, Nebennieren, Lunge, Muskulatur und Mundspeicheldrüsen untersucht und eine Reihe von Gesetzmäßigkeiten in der Lokalisation von Plasminogen-Aktivatoren erarbeitet. Über den Einfluß gewebe-eigener Proteasen auf den Verlauf der Substratfilm-Verdauung berichten TODD und WARREN nicht, das *Pankreas* wurde in die Untersuchungen beider Autoren *nicht* einbezogen.

KWAAN (1964) hat mit der Methode der „fibrinolysis autographs“ Mastzellsuspensionen auf ihre fibrinolytischen und proteolytischen Aktivitäten untersucht und nach Gabe von Compound 48/80 in vitro eine geringe proteolytische Aktivität der Mastzellgranula bei fehlender fibrinolytischer Aktivität beobachtet. Als Substratfilm diente Fibrin nach Hitzeinaktivierung von Plasminogen. Nach den Untersuchungen von BENDITT und ARASE (1959), LAGUNOFF und BENDITT (1963) sowie GLENNER et al. (1960, 1962) enthalten Mastzellen neben Histamin, Heparin und Serotonin chymotrypsin- und trypsinartige Proteasen, Amidasen und Esterasen.

Bei den vorliegenden Untersuchungen sind wir von der Überlegung ausgegangen, daß gewebeeigene Proteasen, sobald sie in aktiver Form und ausreichender Quantität für eine histochemische Erfassung vorliegen, zu einer proteolytischen Auflösung des Fibrinfilms führen können. Am Pankreas mußten nach Olivenöl-Instillation in den Ductus pancreaticus neben der fibrinolytischen Substratfilm-Aufhellung auch „unspezifische“ proteolytische Veränderungen am Substratfilm sichtbar werden, wenn es bei der experimentellen Pankreatitis zu einer proteolytischen Autodigestion des exkretorischen Parenchyms kommt.

Theoretisch waren für die Realisierung der proteolytischen Andauung des Substratfilms als Ausdruck der proteolytischen Autodigestion *zwei Möglichkeiten* gegeben:

1. Gewebeeigene Proteinasen könnten — in Nachahmung des physiologischen Prozesses der Plasminogen-Aktivierung — zu einer überstürzten und weit über das physiologische Maß hinausgehenden Plasminbildung führen. Untersuchungen von JACOBSON (1950), LEWIS und FERGUSON (1952), ASTRUP und STERNDOFF (1952) sowie KOCHOLATY et al. (1952) haben gezeigt, daß Proteinase zu einer enzymatischen Umwandlung von Plasminogen in Plasmin befähigt sind. Die durch gewebeeigene, in den Substratfilm diffundierende Proteinase hervorgerufene Plasminogen-Aktivierung und Plasmin-Anflutung am Fibrin könnte, wenn hinreichend proteolytische Enzyme in aktiver Form vorliegen, zu einer außerordentlich starken Fibrinolyse führen.

2. Die gewebeeigenen Proteasen könnten aber auch ohne Vermittlung des Plasminogens nach Diffusion in den Substratfilm zu einer unspezifischen Proteolyse desselben führen. Das Prinzip einer derartigen „Fibrinolyse“, besser Fibrinverdauung, entspricht dem Nachweis proteolytischer Aktivitäten durch das Gelatine-Silberkorn-Verfahren von ADAMS und TUQAN (1961). Mit einer Modifikation der Gelatine-Silberkorn-Methode haben ROMPEL und SCOMAZZONI (1963) am normalen Pankreas keine aktiven proteolytischen Enzyme im exokrinen Pankreasparenchym nachweisen können. Erst nach Enterokinase-Aktivierung der Pankreasenzyme in Gegenwart von Calciumionen traten im Gelatinefilm charakteristische, wenngleich unscharf markierte Proteolysezonen auf.

Für unsere Fragestellung mußte das originale Toddsche Verfahren der „fibrinolysis autograph“ modifiziert werden. Die Verwendung gewöhnlicher Gefrierschnitte verbot sich, weil die proteolytischen Enzyme im Gegensatz zu den gewebsgebundenen Plasminogen-Aktivatoren sofort in das Auffangwasser der Gefrierschnitte diffundieren und ausgewaschen werden. Zur Umgebung dieser Auswaschung haben wir Kryostatschnitte verwendet, bei denen nur das kurzfristige Schnittaufftauen zu einer begrenzten Enzymdislokation führen konnte. Um eine einwandfreie Streckung der Schnitte zu erzielen, wurde der Fibrinfilm erst nach Antrocknung der Kryostatschnitte über die Objektträger gezogen.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden darüber hinaus Ca^{++} in den Substratfilm eingeführt. Nach den Untersuchungen von LAKI und LORAND (1948), FEARNLEY et al. (1953—1964), BICKFORD und SOKOLOW (1961), GOTTLIEB et al. (1961), KOPFER (1963), LACK (1964) sowie TYLER und LACK (1964) hemmen Calciumionen in Gegenwart eines in Gewebshomogenaten und im Blut vorhandenen Fibrin-stabilisierenden Faktors die physiologische, plasminbedingte Fibrinolyse. Nach LACK sowie TYLER und LACK ist dieser Fibrin-stabilisierende Faktor (FSF) in allen handelsüblichen Fibrinogen-Präparaten als Verunreinigung enthalten, was für das Fibrinogen der eigenen Untersuchungen bestätigt werden konnte. Da alle synthetischen Plasmin-Inhibitoren zugleich Proteinase-Inhibitoren sind, war nur durch Calciumionen die Möglichkeit gegeben, die Plasmin-bedingte Fibrinolyse zugunsten einer unspezifischen Proteolyse des Substratfilms zumindest partiell auszuschalten.

Die Anwesenheit von Ca^{++} bei der experimentellen Pankreatitis führt zu einer vergleichsweise komplexen Reaktionsbeeinflussung. In Gegenwart von Ca^{++} werden unter physiologischen Bedingungen Trypsinogen und Chymotrypsinogen durch Enterokinase aktiviert (HAVERBACK et al., 1960). Ca^{++} fördert daneben auch die autokatalytische Aktivierung von Trypsinogen zu Trypsin (DESNUELLE et al., 1961). Trypsin und Chymotrypsin werden durch Ca^{++} -Ionen stabilisiert. FORELL und DOBOVICNIK (1964) beobachteten schließlich eine experimentelle Beeinflussbarkeit des pankreaseigenen Trypsinhemmkörpers durch Ca^{++} -Ionen.

Für die vorliegenden Untersuchungen waren somit ausgedehnte Kontrollversuche an Pankreaten gesunder Hunde erforderlich. Sie mußten einerseits klären, ob der calciumhaltige Substratfilm zur Aktivierung proteolytischer Proenzyme führt und damit primär nicht aktivierte proteolytische Kapazitäten zu enzymatischer Entfaltung kommen. Zum anderen mußte in Vorversuchen das histotopchemische Muster der Proaktivatoren und Aktivatoren des Plasminogen im Pankreas bestimmt werden, um eine Differenzierung zwischen spezifischer Fibrinolyse und „unspezifischer“ Proteolyse am Schnitt wie im Substratfilm durch-

führen zu können. Die physiologischen Grundlagen unseres methodischen Vorgehens sind in Abb. 2 aufgezeigt.

Bei Anwendung der Toddschen Substratfilm-Methode am Kontroll-Pankreas fand sich eine den Befunden von TODD (1959—1964) und WARREN (1964) entsprechende starke fibrinolytische Aktivität im Endothel inter- und intralobärer Venen und Nenolen. Die fibrinolytische Aktivität im Endothel der Arterien war deutlich geringer und fand sich zumeist erst nach mehr als einhalbstündiger

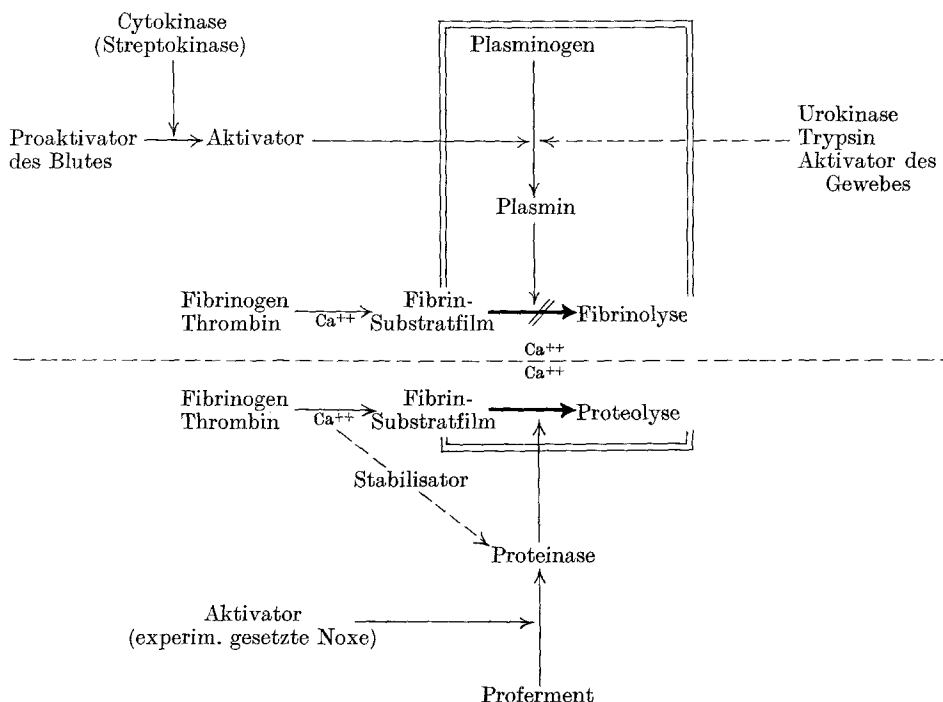


Abb. 2. Schematische Wiedergabe der zwischen Kryostatschnitt und Substratfilm ablaufenden Reaktionen: oben die durch Ca^{++} verzögerte Fibrinolyse unter dem Einfluß gewebeeigener Aktivatoren und Proaktivatoren, unten die „unspezifische“ Proteolyse unter dem Einfluß in den Substratfilm diffundierender Proteinasen

Schnittinkubation. Über dem exkretorischen Parenchym fehlte am Kontrollpankreas jegliche fibrinolytische und proteolytische Aktivität. Nach Ca^{++} -Zusatz zum Substratfilm trat die perivasale fibrinolytische Aktivität auch über den Venen und Venolen des exkretorischen Parenchyms erst nach langfristiger Schnittinkubation auf, bei kurzfristiger Bebrütung blieb der Fibrinfilm über Parenchym wie Interstitium homogen eosinophil. Damit war im Hinblick auf die Fragestellung unserer histochemischen Untersuchungen erwiesen, daß Ca^{++} nicht zu einer sekundären, erst bei Inkubationsbeginn einsetzenden Enzymaktivierung im Acinusepithel führt, andererseits aber die fibrinolytische Andauung des Substratfilms durch Plasmin verzögert.

Bei den Versuchstier-Pankreaten zeigte sich dagegen bereits nach kurzfristiger Schnittinkubation neben der perivasalen Fibrinolyse eine zunächst scharf auf nekrobiotische, aber noch nicht enzymatisch „ausgebrannte“ Acini beschränkte Proteolyse im Ca^{++} -freien Substratfilm. Bei langfristiger Schnittinkubation waren

die lobuluszentralen Proteolysezonen im Substratfilm vielfach mit inter- und intralobären Fibrinolysearealen über den Venen und einzelnen Arterien konfluiert, zudem zeigten nun auch primär nicht der pankreatitischen Autodigestion anheimgefallene Parenchymbezirke in der Umgebung initialer Proteolyseherde eine rasch um sich greifende sekundäre proteolytische Andauung mit dem charakteristischen Kernschwund der Acini. Im Ca^{++} -haltigen Substratfilm schließlich traten die Proteolysezonen über dem exkretorischen Parenchym in unveränderter Ausdehnung auf, dagegen waren die Fibrinolysezonen, bei kurzfristiger Inkubation nicht nachweisbar, bei längerer Bebrütung deutlich kleiner als im Ca^{++} -freien Substratfilm.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen damit den Einfluß der Proteolyse auf den Ablauf der experimentellen autodigestiven Pankreatitis. Die während der cellulären Schädigung freiwerdenden aktivierten proteolytischen Enzyme verdauen bei der von uns gewählten Versuchsanordnung in vitro nicht nur das benachbarte, primär nicht geschädigte Parenchym, sondern auch den über ihnen liegenden Substratfilm. Die Enzymaktivierung und -freisetzung ist bei der experimentellen „Olivenöl-Pankreatitis“ regelmäßig nur *disseminiert* im exokrinen Parenchym nachweisbar. *Nicht pankreatitische und nekrotische Parenchymareale sind proteolytisch stumm*, das enzymatische Potential ist entweder noch nicht aktiviert oder erschöpft.

Unsere Befunde geben allerdings keine gesicherte Auskunft über die Frage, ob die Substratfilm-Auflösung über dem exkretorischen Parenchym Folge einer überschießenden Plasminanflutung im Substratfilm nach Proteinase-bedingter Plasminogen-Aktivierung ist, oder ob die aktivierten und aus dem Schnitt freiwerdenden Proteinasen „unspezifisch“ zu einer Fibrinauflösung führen. Plasmin besitzt neben seiner spezifisch gegen Fibrin gerichteten und zu charakteristischen Peptidformationen führenden „fibrinolytischen“ Aktivität eine „unspezifische“ proteolytische Aktivität. Kasein und Gelatine, aber auch synthetische Ester werden von Plasmin „unspezifisch“ aufgespalten (REMMERT und COHEN, 1949; CHRISTENSEN, 1945), wenngleich die Affinität und fibrinolytische Kapazität des Plasmin gegenüber Fibrin und Fibrinogen wesentlich größer ist als die proteolytische Kapazität gegenüber Kasein und Gelatine (MACKAY, 1964). Die Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin durch Proteasen soll nach SHERRY und ALKJAERSIG (1957) außerordentlich langsam (2—4 Std) ablaufen. Bei den eigenen Versuchen fanden sich dagegen bereits nach 10 min über dem exkretorischen Parenchym im Ca^{++} -haltigen wie Ca^{++} -freien Substratfilm die charakteristischen Proteolyseareale. Die rasche Substratfilm-Andauung läßt damit vermuten, daß der Substratfilm „unspezifisch“ proteolytisch, d.h. ohne Zwischenschaltung einer Plasminogen-Aktivierung abläuft.

Unsere Befunde erlauben derzeit noch keine Aussage über die Natur der über eben „gezündeten“ pankreatitischen Schnittbezirken freiwerdenden und zur Andauung des Substratfilms führenden Proteasen. *Der biochemische Nachweis nicht mit Trypsin oder Chymotrypsin identischer „proteolytischer Restaktivitäten“* (NAGEL und WILLIG, 1964) *macht aber sehr wahrscheinlich, daß die unter diesem Terminus subsummierten Enzyme eine entscheidende Bedeutung für die Substratfilm-Andauung besitzen.*

Zusammenfassung

Mit einer Modifikation der Substratfilm-Methode der „fibrinolysis autographs“ zum histochemischen Nachweis gewebseigener Plasminogen-Aktivatoren und -Proaktivatoren läßt sich an Kryostat-Schnitten die bei der akuten autodigestiven Pankreatitis auftretende proteolytische Enzymaktivität histochemisch demonstrieren. Fibrinfilme als Substrate der bei der Pankreatitis freiwerdenden Proteasen zeigen bei der experimentellen „Olivenöl-Pankreatitis“ des Hundes über frisch der Nekrobiose unterworfenen Acini und Lobuli scharf umschriebene, ausgestanzte Lyseareale. Dagegen fehlt über integeren und vollständig nekrotischen, „ausgebrannten“ Parenchymbezirken die proteolytische Substratfilm-Aufhellung.

Die initiale proteolytische Substratfilm-Andauung läßt sich von der perivasalen, d.h. an die Nachbarschaft von Endothelzellen gebundenen Fibrinolyse nach Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin durch die gewebseigenen Aktivatoren aufgrund ihrer topochemischen Beziehung zu „quasispezifischen tryptischen Parenchymnekrosen“ abgrenzen. Bei längerer Schnitt-Inkubation dagegen konfluieren Proteolyse- und Fibrinolyse-Bezirke. Nach Ca^{++} -Zusatz tritt die Plasminogen-bedingte Fibrinolyse infolge Fibrin-Vernetzung verzögert auf, die unspezifische Proteolyse über frischen autodigestiven Parenchymnekrosen wird nicht verzögert. Die Befunde beweisen die Bedeutung der im Gewebe freiwerdenden Proteasen für die Pathogenese der autodigestiven Pankreatitis.

Histochemical Proteolytic Enzymes in Experimental Autodigestive Pancreatitis

Summary

Proteolytic enzyme activities in acute autodigestive pancreatitis were demonstrated histochemically by a modified “fibrinolysis autograph” technique, a substrate-film method used to localize plasminogen activators and proactivators in cryostat sections. In the “olive-oil pancreatitis” of the dog proteolytic enzymes released from acini and lobuli by necrobiosis diffused into the substrate films during incubation and produced sharply defined, punched out areas of lysis in the overlying films by liquefying the bovine fibrin. The proteolytic digestion of the substrate differed from perivascular (near endothelial cells) plasmin-induced fibrinolysis by its relationship to areas of “quasi-specific, tryptic necrosis” of the parenchyma. The proteolytic substrate-film digestion was absent over integer and completely necrotic, “exhausted” areas of the exocrine pancreas. The longer cryostat sections were incubated the more regions of proteolysis and fibrinolysis fused. After Ca^{++} was added the plasminogen activated fibrinolysis occurred more slowly because of the fibrin network formed. In contrast, non-specific proteolysis was not delayed over fresh regions of autodigestive parenchymal necrosis. The results indicate how important proteases released from tissues are in the pathogenesis of autodigestive pancreatitis.

Literatur

- ADAMS, C. W. M., and N. A. TUQAN: The histochemical demonstration of protease by a gelatine-silver film substrate. *J. Histochem. Cytochem.* **9**, 469—472 (1961).
ASTRUP, T.: Die Bedeutung der Fibrinolyse. In: K. FR. BAUER, *Medizinische Grundlagenforschung*, Bd. II, S. 195—221. Stuttgart: Georg Thieme 1959.
—, and I. STERNDOFF: Fibrinolytic activity of tissue extracts and of trypsin. *Nature (Lond.)* **170**, 981—982 (1952).

- BECKER, V.: Tryptische Pankreatitis und tryptische Nekrose. Dtsch. med. Wschr. **89**, 671—676 (1964).
- BENDITT, E. P., and ARASE: An enzyme in mast cells with properties like chymotrypsin. J. exp. Med. **110**, 451—460 (1959).
- BICKFORD, A. F., and M. SOKOLOV: Fibrinolysis as related to the urea solubility of fibrin. Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttg.) **5**, 480—488 (1961).
- CHRISTENSEN, L. R.: Streptococcal fibrinolysis: A proteolytic reaction due to a serum enzyme activated by streptococcal fibrinolysin. J. gen. Physiol. **28**, 363 (1945).
- DESNUELLE, P., and M. ROVERY: The proteins of the exocrine pancreas. Advanc. Protein Chem. **16**, 139—195 (1961).
- DOERR, W.: Pathogenese der akuten und chronischen Pankreatitis. Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. **70**. Kongr. 1964, S. 718—758.
- P. B. DIEZEL, K. H. GRÖZINGER, H. G. LASCH, W. NAGEL, J. ROSSNER, M. WANKE u. F. WILLIG: Pathogenese der experimentellen autodigestiven Pankreatitis. Klin. Wschr. **43**, 125—136 (1965).
- ELLIOTT, D. W., R. A. WILLIAMS, and R. M. ZOLLINGER: Alterations in the pancreatic resistance to bile in the pathogenesis of acute pancreatitis. Ann. Surg. **146**, 669—682 (1957).
- FEARNLEY, G. R.: Physiology and pharmacology of fibrinolysis. Brit. med. Bull. **20**, 185—188 (1964).
- FORELL, M. M., u. W. DOBOVICNIK: Tierexperimentelle Untersuchungen mit Trasylol. In K. HEINKEL u. H. SCHÖN (Herausg.), Pathogenese, Diagnostik, Klinik und Therapie der Erkrankungen des exokrinen Pankreas, S. 331—335. Stuttgart: F. K. Schattauer 1964.
- GLENNER, G. G., and L. A. COHEN: Histochemical demonstration of a species-specific trypsin-like enzyme in mast cells. Nature (Lond.) **185**, 846—847 (1960).
- V. K. HOPSU, and L. A. COHEN: Histochemical demonstration of a trypsin-like esterase activity in mast cells. J. Histochem. **10**, 109—110 (1962).
- GOTTLIEB, S. F., D. R. CELANDER, and M. M. GUEST: Cation requirement for insolubility of fibrin in monochloroacetic acid. Arch. Biochem. Biophys. **92**, 201—205 (1961).
- GRÖLL, H.: Kernschwund und Protoplasmagerinnung bei der Koagulationsnekrose. Virchows Arch. path. Anat. **316**, 384—419 (1949).
- HÄVERBACK, B. J., B. DYCE, H. BUNDY, and H. A. EDMONDSON: Trypsin, trypsinogen and trypsin inhibition in human pancreatic juice. Amer. J. Med. **29**, 424—433 (1960).
- JACOBSON, K.: Studies on the proteolytic and antiproteolytic activity of blood serum. I. Activation of plasminogen with trypsin. Acta chem. scand. **7**, 430—433 (1953).
- KOCHOLATY, W., W. W. ELLIS, and H. JENSEN: Activation of plasminogen by trypsin and plasmin. Blood **7**, 882 (1952).
- KOPPER, P. H.: Role of calcium in fibrin formation. Nature (Lond.) **198**, 493—494 (1963).
- KWAAN, H. C.: A histochemical study of fibrinolytic activity and content of protease in mast cells. Amer. J. clin. Path. **41**, 604—608 (1964).
- LACK, CH. H.: Proteolytic activity and connective tissue. Brit. med. Bull. **20**, 217—222 (1964).
- LAGUNOFF, D., and E. P. BENDITT: Proteolytic enzymes of mast cells. Ann. N.Y. Acad. Sci. **103**, 185—197 (1963).
- LAKI, K., and L. LORAND: On the solubility of fibrin clots. Science **108**, 280 (1948).
- LASCH, H. G.: Habil.-Schr. Heidelberg 1959.
- LEWIS, J. H., and J. H. FERGUSON: Studies on a proteolytic enzyme system of blood. V. Activation of profibrinolysin by trypsin. Amer. J. Physiol. **170**, 636—638 (1952).
- MACKAY, M.: Fractionation and standardization of plasma fibrinolytic components. Brit. med. Bull. **20**, 189—194 (1964).
- NAGEL, W., u. F. WILLIG: Proteolytische Enzyme im Pankreas unter normalen und pathologischen Bedingungen. Klin. Wschr. **42**, 400—402 (1964).
- REMMERT, L. F., and P. P. COHEN: Partial purification and properties of a proteolytic enzyme of human serum. J. biol. Chem. **181**, 431 (1949).
- ROMPEL, K., u. G. SCOMAZZONI: Zur Brauchbarkeit eines histochemischen Trypsinnachweises. Ann. Histochem. **8**, 391—394 (1963).
- SHERRY, S., and N. ALKJAERSG: Studies on the fibrinolytic enzyme of human plasma. Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttg.) **1**, 264 (1957).

- TODD, A. S.: The histological localization of fibrinolysin activator. *J. Path. Bact.* **78**, 281—283 (1959).
- The tissue activator of plasminogen and thrombosis. In: W. WALKER (Hersg.), *Thrombosis and anticoagulant therapy*, p. 25. London: Livingstone Co. 1960.
- Localization of fibrinolytic activity in tissues. *Brit. med. Bull.* **20**, 210—212 (1964).
- TYLER, H. M., and C. H. LACK: A tissue fibrin-stabilizing factor and fibrinolytic inhibition. *Nature (Lond.)* **202**, 1114—1115 (1964).
- WANKE, M., W. NAGEL, u. F. WILLIG: Formen der experimentellen Pankreatitis patho-anatomisch gesehen. *Frankfurt. Z. Path.* **75**, 207—227 (1966).
- WARREN, B. A.: Fibrinolytic activity of vascular endothelium. *Brit. med. Bull.* **20**, 213—216 (1964).

Dr. U. BLEYL, PD Dr. M. WANKE
Pathologisches Institut der Universität
69 Heidelberg, Berliner Straße 5
Dr. K. H. GRÖZINGER
Chirurgische Univ.-Klinik
PD. Dr. W. NAGEL
Physiologisch-Chemisches-Institut