

Fibrin stabilisierender Faktor in der menschlichen Aorta

UWE BLEYL

Institut für Allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. W. DOERR)

Eingegangen am 31. Dezember 1966

Fibrin-Stabilizing Factor of the Human Aorta

Summary. In studies comparing coagulation activity and histochemistry proof is presented that the human aorta contains a fibrin-stabilizing factor (FSF) in its intima, media, and adventitia. This factor converts fibrin-s (acetic acid soluble) into an insoluble form (fibrin-i). It is dependent on the presence of Ca^{++} ions and may be inhibited by p-chlormercuric benzoate and the methyl ester of glycine. FSF from the wall of the aorta inhibits the fibrinolytic activity (plasminogen activator) of the aortic endothelium. As may be demonstrated with the method of the socalled fibrinolysis-autograph (TODD), after inhibition of the FSF of aortic tissue origin by p-chlormercuric benzoate, circumscribed regions of fibrinolysis appear above the aortic endothelial cells in the FSF-free, fibrin substrate films. These regions indicate the endothelial cells possess a slight fibrinolytic activity. In contrast, the methyl ester of glycine leads to an inhibition of this activity. Reference is made to the importance of FSF of aortic origin in the pathogenesis and histogenesis of arteriosclerosis.

Zusammenfassung. In gerinnungsanalytischen und vergleichenden histochemischen Untersuchungen wird der Beweis erbracht, daß die menschliche Aorta in Intima, Media und Adventitia einen Fibrin stabilisierenden Faktor (FSF) enthält, der in der Lage ist, ein in Essigsäure lösliches Fibrin s in eine unlösliche Form (Fibrin i) zu überführen. Dieser FSF ist an die Gegenwart von Ca^{++} -Ionen gebunden und läßt sich durch p-Chlormercuribenzoat und Glycinmethylester hemmen. Der gewebeeigene FSF der Aortenwand hemmt die fibrinolytische (Plasminogen-Aktivator-)Aktivität der Aortenendothelien. Nach Inhibition des gewebeeigenen FSF durch p-Chlormercuribenzoat treten bei Verwendung der Methode der sog. Fibrinolyse-Autographie nach TODD im FSF-freien Fibrin-Substratfilm auch über dem Aortenendothel umschriebene Fibrinolyse-Areale als Ausdruck einer diskreten fibrinolytischen Aktivität dieses Endothels auf. Glycinmethylester führt dagegen zu einer Hemmung dieser fibrinolytischen Aktivität. Auf die Bedeutung des gewebeeigenen FSF der Aorta für die Pathogenese und Histogenese der Arteriosklerose wird verwiesen.

Gerinnungsanalytische Untersuchungen und histochemische Befunde haben wahrscheinlich gemacht, daß dort, wo Fibrin im Gewebe auftritt, auch fibrinolytisches Potential zugegen ist, das unter dem Einfluß gewebeeigener Aktivatoren seine fibrinolytische Aktivität zu entfalten vermag. Für die These DUGUIDS (1946, 1948), die Arteriosklerose der großen Körperschlagadern entstehe im wesentlichen durch Inkorporation von auf dem Endothel niedergeschlagenen, dort-selbst aber nicht lysierten Fibrinfilmen in die Gefäßintima, ergibt sich damit die Frage, warum inkorporiertes Fibrin unter dem aktivierenden Einfluß intimaler Cytokininasen nicht alsbald fibrinolytisch verdaut und damit für eine Beeinträchtigung der physiologischen Gefäßwandperfusion (DOERR et al., 1963 a, b; 1964) irrelevant werden. *Lassen sich in der Wandung großer Körperschlagadern anti-fibrinolytische oder Fibrin stabilisierende Faktoren nachweisen?*

Ein im Blutplasma auftretendes, Fibrin stabilisierendes Enzym ist unter den Synonymen Laki-Lorand-Faktor, Faktor XIII, Fibrin stabilisierender Faktor (FSF) und Fibrinase seit langem bekannt. Unlängst gelang TYLER und LACK (1964, 1965) auch der Nachweis eines gewebeeigenen Fibrin stabilisierenden Faktors

im Überstand von Gewebshomogenaten, der in der Lage ist, ein in 2 % Essigsäure, 1 % Monochloressigsäure, 5 M Harnstoff oder streptokinaseaktiviertem Plasmin lösliches Fibrin (Fibrin s) in eine unlösliche, plasminresistenter (BICKFORD und SOKOLOW, 1961) Fibrinbildung (Fibrin i) zu überführen. Durch Aktivitätsuntersuchungen in Verdünnungsreihen ließ sich zeigen, daß der gewebseigene FSF nicht durch Kontamination des Gewebes mit dem FSF des Blutplasma entsteht. Der gewebseigene FSF besitzt vielmehr eine ungleich höhere Aktivität als der FSF des Blutes. Beide Enzyme benötigen die Gegenwart von Ca^{++} -Ionen und sind durch Silberionen und Substanzen, welche SH-Gruppen blockieren, hemmbar.

Für die eigenen Untersuchungen war damit die Frage aufgeworfen, ob in der Wandung menschlicher Aorten ein nicht mit dem FSF der Vasa vasorum identischer Faktor nachweisbar sei, der in der Lage wäre, inkorporiertes Fibrin dem fibrinolytischen Zugriff des an Fibrin gekoppelten Plasmin zu entziehen. Wir sind dieser Frage in gerinnungsanalytischen und vergleichenden histochemischen Untersuchungen nachgegangen. Als Kontrolle diente die an gewebseigenem FSF reiche Leber.

Material und Methode

α) Gerinnungsanalytische Untersuchungen

Um einen Vergleich der gerinnungsanalytischen Befunde zu ermöglichen, wurden den eigenen Untersuchungen die Analyseansätze von TYLER und LACK (1964) zugrundegelegt. Gewebsproben von der mittleren Brustaorta und von der Leber bis zu 12 Std nach dem Tode Obduzierter beiderlei Geschlechts und verschiedener Altersstufen wurden unmittelbar nach Entnahme bei 4° C ausgiebig im Kochsalzbad gewaschen. Nach Abpräparation der aortalen Adventitia unter der Stereolupe wurden die Proben im Verhältnis 1:10 (Gew./Vol.) in sterilisierter 0,9 % NaCl homogenisiert. Nach Zentrifugierung des Homogenates (3000 U/min, 30 min) wurde der Überstand in Visking-Dialysierschlüuchen (Wandstärke 0,02 mm) gegen 0,9 % NaCl dialysiert (4° C, 12 Std, stündlicher Wechsel des Dialyse-Bades).

Menschliches Fibrinogen (Fraktion I nach COHN-Methode 6, Reinigung nach MORRISON et al., 1948) und Rinderfibrinogen (99 % gerinnbar, SERVA Heidelberg) wurden in getrennten Ansätzen mit p-Chlormercuribenzoat (Natriumsalz, 1×10^{-4} M) bei pH 7,4 (Natriumtetraborat-Borsäure-Puffer nach HOLMES) in sterilisierter 0,9 % NaCl gelöst. Zur Reinigung von überschüssigem p-Chlormercuribenzoat und aus der Fraktionierung des Fibrinogen nach MORRISON anfallenden Citrationen erfolgte erschöpfende Dialyse gegen 0,9 % NaCl bei 4° C. Als Thrombinpräparat diente Thrombinum purum (Behringwerke).

Die gerinnungsanalytischen Ansätze sind in der Tabelle I wiedergegeben.

Tabelle I

Ansatz	I	II	III	IV	V
Holmes-Puffer pH 7,4	0,25 ml	+	+	+	+
Fibrinogen + p-Chlormercuribenzoat	0,1 ml	+	+	+	+
Gewebsextrakt	0,2 ml	—	—	+	+
CaCl_2 0,1 M	0,05 ml	—	+	—	+
Thrombinum purum	2 NIH	+	+	+	+
p-Chlormercuribenzoat	0,1 ml	—	—	—	+

Jeder gerinnungsanalytische Ansatz wurde mit im Verhältnis 1:10 gepufferter sterilisierter 0,9 % NaCl auf 1 ml komplettiert. Unmittelbar nach Zugabe von Thrombin wurden die gerinnungsanalytischen Ansätze für 15 min zur Gerinnung in ein Wasserbad bei 37° C eingestellt und anschließend mit 1 ml 2 % Essigsäure überschichtet. Mit einem feinen Glashäkchen wurde das Gerinnsel vom Reagenzglasboden gelöst und der artefiziellen Lyse ausgesetzt.

β) Histochemische Untersuchungen

Die histochemischen Untersuchungen wurden an Kryostatschnitten (Schnittdicke 10 μ) menschlicher Aorten mit einer Modifikation (BLEYL, 1966; BLEYL, GRÖZINGER, NAGEL und WANKE, 1966) der Methode der Fibrinolyse-Autographie nach TODD (1959, 1964) durchgeführt. Als Substratfilm der Fibrinolyse diente in Anlehnung an die Untersuchungen von SAYERS, TYLER und LACK (1965) Plasminogen-haltiges, durch p-Chlormercuribenzoat (1×10^{-4} M) und nachfolgende erschöpfende Dialyse (s. o.) vorbehandeltes und damit FSF-inhibiertes Fibrinogen. Durch Verdünnung mit sterilisierter 0,9 % NaCl wurde die Fibrinogen-Konzentration so eingestellt, daß 1 ml FSF-inhibierte, in NaCl gelöste Stammlösung 10 mg gerinnbares Protein enthielt. Bezüglich der methodischen Einzelheiten der Durchführung der Fibrinolyse-Autographie an Kryostatschnitten kann auf frühere Mitteilungen (BLEYL, 1966; BLEYL et al., 1967) verwiesen werden.

Zur Entfernung aller den Objektträgern anhaftenden Calciumspuren wurden die Objektträger vor der Überschichtung mit Thrombinum purum für 24 Std in Aethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA 1×10^{-4} M) eingelegt und nach anschließender sorgfältiger Waschung in Aqua dest. mit Alkohol entfettet. Zur Hemmung des gewebeseigenen FSF verwendeter Glycinmethylester (Glycinmethylester-HCL — EGA-Chemie, Steinheim) wurde mit verdünnter NaOH neutralisiert und mit NaCl auf eine 0,12 M Stammlösung in 0,9 % NaCl eingestellt. Zur Ausschaltung der gewebeseigenen Plasminogen-Aktivatoren wurde Epsilon-Aminocapronsäure (EACA, 0,3 M Stammlösung, gelöst in 0,9 % NaCl, im Verhältnis 1:10 gepuffert) in den Substratfilm eingeführt.

Die definitive Zusammensetzung der Substratfilme der histochemischen Versuchsansätze ist aus Tabelle 2 zu entnehmen. Sämtliche Substratfilmsätze wurden mit 0,9 % NaCl auf ein Gesamtvolumen von 6 ml zur Einhaltung einer Fibrinogen-Endkonzentration von 5 mg/ml aufgefüllt.

Tabelle 2

Ansatz	I	II	III	IV	V
Fibrinogen + p-Chlormercuribenzoat	3 ml	+	+	+	+
Holmes-Puffer pH 7,4	0,5 ml	+	+	+	+
CaCl ₂ (0,1 M)	0,5 ml	—	+	+	+
Epsilon-Aminocapronsäure (0,3 M)	0,5 ml	—	—	—	—
Glycinmethylester (0,12 M)	0,5 ml	—	—	—	—
p-Chlormercuribenzoat (6×10^{-4} M)	0,5 ml	—	—	—	+

Nach Ausbreitung der Substratfilme über den Kryostatschnitten und nachfolgender Fibrinbildung unter dem Einfluß des auf den Objektträgern ausgestrichenen Thrombins wurden die Schnitte in der feuchten Kammer bei 37° C für 30—60 min bebrütet. Ein Teil der Schnitte wurde nach Abbruch der Incubation in 5 % neutralem Formalin fixiert, ein anderer vor der Fixierung zur Differenzierung zwischen Fibrin s und Fibrin i in 2 % Essigsäure der artifiziellen Lyse ausgesetzt. Nach Fixierung und Wässerung wurden die Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und nach Dehydrierung in der aufsteigenden Alkoholreihe in DePeX (GURR, London) eingedeckt.

Zur gerinnungsanalytischen Kontrolle der histochemischen Versuche wurde jeweils 1 ml der Substratfilm-Ansätze ohne Zugabe von Gewebsextrakten im Reagenzglas mit 2 NIH Thrombin zur Gerinnung gebracht und der anschließenden Lyse mit 1 ml 2 % Essigsäure ausgesetzt. Damit konnte für jeden Versuchsansatz die totale Hemmung des im Fibrinogen auftretenden FSF des Blutplasma belegt werden.

Ergebnisse

α) Gerinnungsanalytische Untersuchungen

Die zur Kontrolle der gerinnungsanalytischen Untersuchungen stets mitgeführten Versuchsansätze I und II (Tabelle 1) weisen aus, daß der in den Fibrinogen-Fraktionen auftretende und nicht abtrennbare FSF des Blutplasma durch

Zugabe von p-Chlormercuribenzoat als SH-Gruppen-blockierendem Agens total gehemmt werden kann und somit den Nachweis Fibrin stabilisierender Aktivitäten in Gewebsextrakten nach erschöpfernder Dialyse nicht mehr beeinträchtigt. Die Versuchsansätze I und II zeigten stets eine vollständige Auflösung der Fibringerinnsel innerhalb von 10 min nach der Überschichtung durch 2 % Essigsäure.

Nach Zugabe von *Leber-Extrakt* zum Incubationsansatz fand sich eine totale Auflösung des Fibrines innerhalb von 10 min auch in den Versuchsgruppen III und V. Das unter dem Einfluß von Thrombin in Gegenwart von Leberextrakten entstehende Fibrin war also einerseits bei Fehlen von Calcium-Ionen im Reaktionsgemisch wieder vollständig lösbar, andererseits trat auch dann eine lösliche Fibringelbildung auf, wenn den Versuchsansätzen überschüssiges, damit zugleich aber den gewebseigenen FSF hemmendes p-Chlormercuribenzoat angeboten wurde. Unlösliches Fibrin (Fibrin i) trat nur in Versuchsansatz IV auf, d.h. in Gegenwart von Ca^{++} -Ionen und bei Fehlen von überschüssigem, fermentblockierendem p-Chlormercuribenzoat. Unsere Kontrollversuche mit Leber-Extrakt zeigten damit in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von TYLER und LACK (1964), daß im Überstand von homogenisiertem menschlichem Lebergewebe ein durch SH-Gruppen-blockierende Reagentien hemmbarer, an die Gegenwart von Ca^{++} -Ionen gebundener Faktor nachweisbar ist, der eine lösliche Fibrininformation in ein unlösliches Fibringel überführt.

Versuche mit adventitiatfreien Aortenwandextrakten führten zunächst zu abweichenden Ergebnissen. In allen *Aorten-Extrakt* enthaltenden Versuchsansätzen (Ansatz III, IV) trat Fibrin i auf, wenn nicht p-Chlormercuribenzoat dem Reaktionsgemisch im Überschuß angeboten wurde (Ansatz V). Extreme Extraktverdünnungen (32fach) führten zwar in Ansatz III zu löslichen Fibrininformationen, gleichzeitig aber trat auch eine totale Fibrinauflösung in Ansatz IV auf.

Die Möglichkeit, eine Ausbildung von Fibrin i durch p-Chlormercuribenzoat zu unterdrücken, bewies zunächst, daß die Aortenwand einen Fibrin stabilisierenden Faktor besitzt, der durch SH-Gruppen-Blockade vollständig hemmbar ist. (Ansatz V). Andererseits zeigte Versuchsansatz III in Aortenwandextrakten die Existenz eines weiteren Faktors auf, der in Lebergewebe nicht — oder nur in Spuren — vorhanden ist, die Ausbildung von Fibrin i durch Aortenwandextrakte aber maßgeblich beeinflußt.

Durch 24stündige Dialyse wurde das Reaktionsergebnis in Ansatz III nicht verändert. Allerdings ließ sich bei gemeinsamer Dialyse von Aortenwand- und Leberextrakten im selben Dialysebad zeigen, daß der in Ansatz III der Aortenserie wirksam werdende Faktor partiell dialysierbar ist, denn unter diesen Voraussetzungen traten auch in Ansatz III der Leberextrakt-Versuche unlösliche Fibrinpräcipitate auf.

In der Annahme, daß für die Fibrin i-Bildung in Ansatz III der hohe Ca^{++} -Gehalt menschlicher Aorten verantwortlich sei, wurde EDTA in $1 \times 10^{-4}\text{M}$ Konzentration als Chelatbildner und Calciumfänger in das Dialysebad (0,9 % NaCl, pH-Stabilisierung) des Gewebshomogenates eingeführt. Erst nach Dialyse gegen EDTA zeigte auch Ansatz III in 4 Versuchen die Ausbildung in 10 min löslicher Fibringerinnsel. Bei 3 dieser 4 Versuche stammte das homogenisierte Aortenmaterial von Obduktionen Jugendlicher.

Unsere gerinnungsanalytischen Befunde beweisen die Existenz eines Fibrin stabilisierenden Faktors in der menschlichen Aortenwand. Dieser FSF ist durch SH-Gruppen-Blockade vollständig hemmbar, überführt aber in Gegenwart von Ca^{++} -Ionen lösliches Fibrin in ein unlösliches Gel. Die Reaktion wird durch den mit zunehmendem Alter ansteigenden Calciumgehalt der menschlichen Aorta wesentlich beeinflußt.

β) Histochemische Untersuchungen

Das histotopochemische Verteilungsmuster der charakteristischen, einigermaßen scharf umschriebenen Lyseareale über den Vasa vasorum der Adventitia

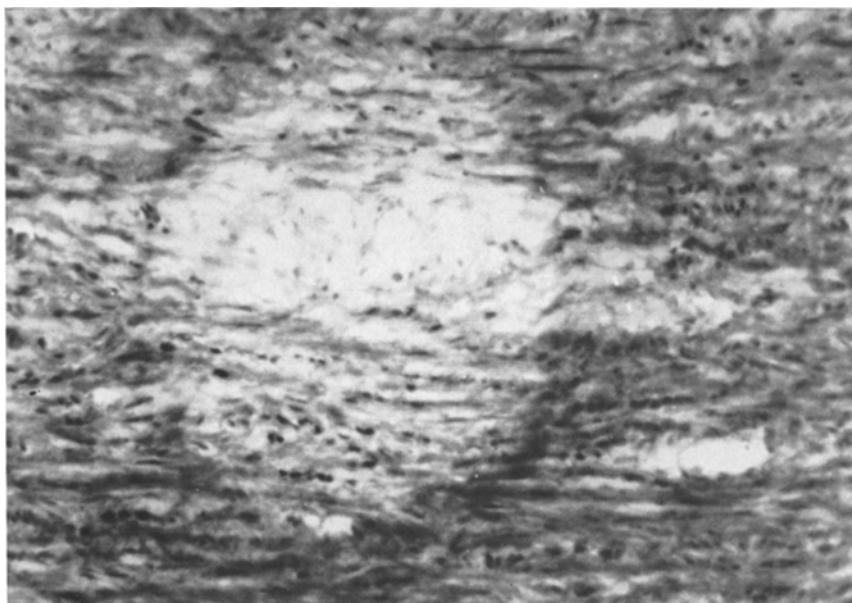


Abb. 1. Aorta, Kryostatschnitt. Scharf von dem *über* dem umgebenden Gewebe liegenden Substratfilm abgesetzte Fibrinolyse in der Umgebung der Vasa vasorum der Media, Focussierung auf das unter dem Substratfilm liegende Gewebe. Fibrinolyse-Autographie mit p-Chlormercuribenzoat zur Ausschaltung des plasmatischen FSF (Versuchsansatz I). HE. Mikrophotogramm 1:120

und Media menschlicher Aorten unterscheidet sich bei Hemmung des plasmatischen FSF der Fibrinogen-Fraktionen durch p-Chlormercuribenzoat *nicht* von früher (BLEYL, 1966) erhobenen Befunden mit FSF-haltigem Substratfilm. Die menschliche Intima und insbesondere das Aortenendothel lassen auch bei langfristiger Bebrütung der Kryostatschnitte in der feuchten Kammer weder im FSF-haltigen noch im FSF-freien Fibrinfilm (Ansatz I und II) eine lytische Aktivität erkennen (Abb. 1). In Gegenwart von Epsilon-Aminocapronsäure als kompetitivem Inhibitor des Plasminogen-Aktivators wird andererseits die Substratfilm-auflösung sowohl im FSF-haltigen, als auch im FSF-freien Fibrinfilm unterdrückt, über Adventitia und Media der menschlichen Aorten werden keine Lyseareale mehr sichtbar (Ansatz III).

Im Gegensatz dazu stehen die histochemischen Befunde an menschlichen Aorten mit Substratfilmen, deren plasmatischer FSF durch p-Chlormercuribenzoat zunächst vollständig gehemmt worden war, bevor nach erschöpfender Dialyse erneut p-Chlormercuribenzoat oder Glycinmethylester in den Versuchsansatz eingebracht wurden. In diesen Versuchsansätzen (Ansatz IV und V) lagen während der Incubation in der feuchten Kammer ständig Inhibitoren des plasmatischen FSF (TYLER und LACK, 1964; LORAND, KONISHI und JACOBSEN, 1962) und



Abb. 2. Aorta, Kryostatschnitt. Beginnende Fibrinolyse mit zarten, kreisförmigen Lysearealen in der Umgebung der Aortenendothelien bei homogenem Fibrinfilm über der Intima. Fibrinolyse-Autographie mit p-Chlormercuribenzoat zur Ausschaltung des plasmatischen und des gewebseigenen FSF (Versuchsansatz V). HE. Mikrophotogramm 1:120

des gewebseigenen FSF (SAYERS, TYLER und LACK, 1956) vor. In beiden Versuchsansätzen war der Durchmesser der Lyseareale im Substratfilm über den Vasa vasorum der Adventitia und Media deutlich größer als die entsprechenden Durchmesser der Substratfilmauflösung von Parallelschnitten der Versuchsansätze I und II. In Gegenwart von p-Chlormercuribenzoat und Glycinmethylester waren die Lysebezirke über den Vasa vasorum der Adventitia und Media vielfach breitflächig konfluierend, so daß eine breite Fibrin-freie Zone über Adventitia und Media sichtbar wurde.

Darüber hinaus aber zeigten in den Versuchsansätzen der Gruppe V auch die Aortenendothelien eine, wenn auch geringe, fibrinolytische Aktivität (Abb. 2). Die einzelnen Endothelzellen waren von halbkreisförmigen, scharf umschriebenen, wie ausgestanzt erscheinenden Lysearealen umgeben, die bei längerer Bebrütungsdauer zunehmend konfluierend und schließlich ein schmales, lytisch abgedautes Band über dem Aortenendothel bildeten. In Gegenwart von Glycinmethyl-

ester als FSF-Inhibitor wurden solche Lyseareale über den Endothelien der Aorta dagegen nicht beobachtet.

Wie ein Negativbild zu diesen Befunden am Substratfilm in Gegenwart verschiedener Plasminogen-Aktivator- und FSF-Inhibitoren erscheinen die Ergeb-

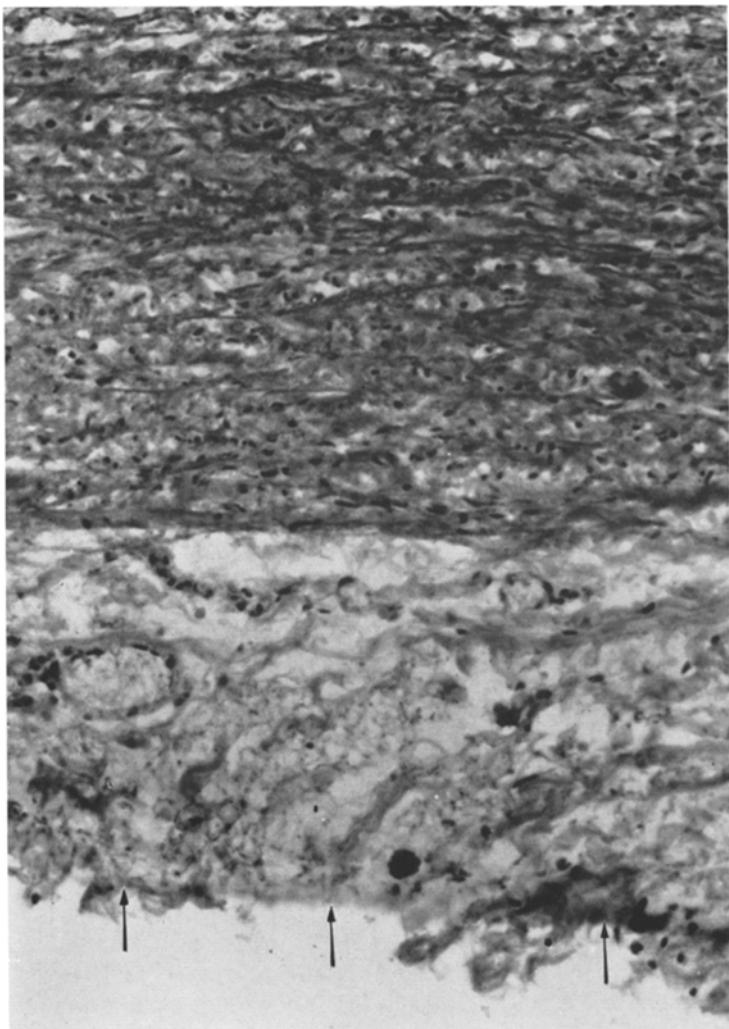


Abb. 3. Aorta, Kryostatschnitt. Histochemischer Nachweis des gewebseigenen FSF über Media und Adventitia bei Ausschaltung der Plasminogen-Aktivatoren der Vasa vasorum durch Epsilon-Aminocapronsäure (Versuchsgruppe III). Zarter, durch Essigsäure nicht gelöster Fibrin-i-Film über Media und Intima mit scharfer Begrenzung gegenüber schnittfreien, vor Essigsäure-Behandlung von Fibrin s bedeckten Objektträgerbezirken, HE. Mikrophotogramm 1:120 (→ = Fibrin-i-Begrenzung)

nisse unserer Untersuchungen nach *artefizieller Lyse des Fibrinfilmes* durch 2% Essigsäure. Diese Untersuchungsreihen sollten klären, über welchen Schnittarealen unter dem Einfluß eines gewebseigenen FSF Fibrin i gebildet wird. Schon

kurz nach dem Einbringen der Schnitte in Essigsäure wird sichtbar, daß über allen nicht von Schnitten bedeckten Objektträgerbezirken der Versuchsansätze I-V der Fibrinfilm vollständig gelöst wird. Über schnittfreien Bezirken wird ein Fibrin s ausgebildet. Das entspricht der totalen Lyse der im Reagenzglas zur Kontrolle histochemischen Versuche durchgeführten Essigsäure-Behandlung gewebefreier Versuchsansätze. Eine vollständige Substratfilmauflösung über schnittfreien Bezirken und über den Kryostatschnitten menschlicher Aorten fand sich auch in den Versuchsansätzen der Gruppen IV und V, d.h. nach Hemmung des gewebs-eigenen FSF. Dagegen zeigten sich in Gegenwart von Epsilon-Aminocapronsäure als Inhibitor des Plasminogen-Aktivators in scharfer Begrenzung gegenüber schnittfreien Objektträgerbezirken über allen Aortenwandschichten in Essigsäure nicht mehr lösliche Fibrin-i-Formationen (Abb. 3). Diese zarten Fibrin-i-Filme schlossen sich über der Intima unmittelbar an das Aortenendothel an und reichten bis zum periadventitiellen Fettgewebe. Über den einzelnen Wandschichten der Aorta ließen sich keine Konzentrationsunterschiede in den Fibrinfilmern erkennen, andererseits waren durch die Hemmung des Plasminogen-Aktivators über den Vasa vasorum auch keine Lyseareale in den Fibrinfilmern nachweisbar.

Eine gleichzeitige Erfassung des Plasminogen-Aktivators und des gewebs-eigenen FSF gestatteten die Versuchsansätze I und II. Hier traten über Adventitia und Media erneut scharf ausgestanzte Lyseareale in der Umgebung der Vasa vasorum auf, während unlösliche Fibrin-i-Filme nur über gefäßfreien Adventitia- und Mediabezirken sowie über der gesamten Intima sichtbar wurden.

Zwischen den Versuchsansätzen I und II konnten weder nach Essigsäure-Behandlung noch bei sofort an die Inkubation der Schnitte angeschlossener Formalin-Fixierung Differenzen in der Ausbildung von Fibrin-i-Formationen beobachtet werden. Damit bestätigt sich die bereits im Rahmen der gerinnungsanalytischen Untersuchungen gemachte Erfahrung, daß der hohe Ca^{++} -Gehalt menschlicher Aorten für die Entfaltung der Aktivität des gewebs-eigenen FSF vollständig ausreicht.

Diskussion

Histochemische Untersuchungen der menschlichen Aorta auf ihren Gehalt an Plasminogenaktivatoren und -Proaktivatoren mit der Methode der sog. Fibrinolyse-Autographie haben zu widersprüchlichen Ergebnissen geführt. TODD (1959) hatte darauf aufmerksam gemacht, daß sich im Aortenendothel keine Plasminogen-Aktivatoren, wohl aber Proaktivatoren nachweisen lassen. Unter Verwendung auf Objektträgern aufgefrorener Häutchenpräparate des Aortenendothels hatte andererseits WARREN (1964) auch über Aortenendothelien eine, wenngleich diskrete, Substratfilm-Auflösung beobachten können. WARREN hatte angesichts dieses Widerspruches die Frage aufgeworfen, ob nicht ein im Gewebe auftretender Inhibitor der Plasminogen-Aktivator-Aktivität für den negativen Ausfall der Fibrinolyse über Aortenendothelien an Gefrierschnitten verantwortlich zu machen sei.

Die vorliegenden gerinnungsanalytischen und histochemischen Befunde beweisen die Existenz eines Fibrin stabilisierenden Faktors in der Wandung menschlicher Aorten. Dieser Fibrin stabilisierende Faktor der Aortenwand ist in der Lage, ein in 2 % Essigsäure, 1 % Monochloressigsäure oder 5 M Harnstoff lösliches Fi-

brins in ein unlösliches, damit zugleich aber Plasmin-resistenteres (BICKFORD und SOKOLOW, 1961) Fibrin i zu überführen. Der gewebseigene FSF der menschlichen Aorta lässt sich durch p-Chlormercuribenzoat oder Glycinmethylester hemmen und benötigt zur Entfaltung seiner Fibrin stabilisierenden Aktivität die Gegenwart von Calciumionen. Die in Anlehnung an das methodische Vorgehen von SAYERS, TYLER und LACK (1965) durchgeführten histochemischen Untersuchungen lassen keine Aktivitätsunterschiede des gewebseigenen FSF in Intima, Media und Adventitia erkennen.

Einer Interpretation bedürfen die histochemischen Befunde mit der Fibrinolyse-Autographie nach Hemmung dieses gewebseigenen Fibrin stabilisierenden Faktors. Glycinmethylester, ein außerordentlich starker Inhibitor des plasmatischen (LORAND, KONISHI und JACOBSEN, 1962) und des gewebseigenen (SAYERS, TYLER und LACK, 1965) Fibrin stabilisierenden Faktors, führte bei nachfolgender artefizieller Lyse des Substratfilms in Essigsäure wie p-Chlormercuribenzoat zu vollständiger Auflösung des Fibrinfilms über allen Aortenschichten; beide Inhibitoren hatten durch Blockade des gewebseigenen FSF die Ausbildung von Fibrin induziert. Bei der Kontrolle dieses Befundes durch die Fibrinolyse-Autographie *ohne* anschließende Fibrinolyse in Essigsäure waren bei beiden Inhibitoren über den Vasa vasorum der Adventitia und Media der Aorta auch vergrößerte Lyseareale im Substratfilm aufgetreten. In Gegenwart von Glycinmethylester waren — in Parallele zu den Befunden von TODD (1959—1964) an der menschlichen und tierischen Aorta mit FSF-haltigem Substratfilm — über dem Aortenendothel keine Plasminogen-Aktivator-Aktivitäten sichtbar geworden.

Im Gegensatz zu diesen Befunden mit Glycinmethylester als dem Inhibitor des gewebseigenen FSF stehen aber unsere Befunde mit dem von SAYERS et al. *nicht* als Hemmer des gewebseigenen FSF verwendeten p-Chlormercuribenzoat. In Gegenwart von p-Chlormercuribenzoat trat im Fibrin-Substratfilm auch *über den Aortenendothelien eine Plasminogen-Aktivator-Aktivität* und damit eine zwar diskrete, aber doch deutlich sichtbar werdende Fibrinolyse auf.

Diese differierenden Versuchsergebnisse mit p-Chlormercuribenzoat und Glycinmethylester als Inhibitoren des gewebseigenen Fibrin stabilisierenden Faktors lassen sich durch bisher unveröffentlichte Befunde von TYLER erklären. In biochemischen Versuchen mit Casein als Substrat der Plasmin-Proteolyse konnte TYLER nachweisen, daß Glycinmethylester neben seiner Inhibitoraktivität gegenüber dem Fibrin stabilisierenden Faktor des Blutplasmas und des Gewebes auch eine *Hemmung gegenüber der Aktivierung von Plasminogen* zu Plasmin durch gewebseigene Plasminogen-Aktivatoren entfaltet. Dieser Inhibitoreffekt gegenüber den Plasminogen-Aktivatoren tritt bei der Plasmin-Caseinolyse oberhalb 0,01 molarer Konzentration auf. Bei den eigenen Versuchsansätzen wie bei den Untersuchungen von SAYERS, TYLER und LACK wurde der Glycinmethylester in 0,02 molarer Konzentration als FSF-Inhibitor verwendet, konnte also bis zu einem gewissen Grade auch zu einer Hemmung der Plasminogen-Aktivator-Aktivität über den Endothelien der Aorta führen, ohne daß die wesentlich intensivere Aktivator-Aktivität über dem Endothel der Vasa vasorum bereits beeinträchtigt wurde.

Der Nachweis fibrinolytischer Aktivitäten über dem Endothel menschlicher Aorten bei Hemmung des gewebseigenen FSF der Aortenwand durch p-Chlormercuribenzoat bestätigt somit die These WARRENS, der negative Ausfall der Fibrinolyse-Reaktion im FSF-haltigen Fibrin-Substratfilm sei möglicherweise Ausdruck einer in den Wandschichten der Aorta wirksam werdenden antifibrinolytischen Inhibitoraktivität. Die vorliegenden Befunde schlagen damit die Brücke zwischen den Befunden WARRENS an accessoriafreien Häutchenpräparaten des Aortenendothels und den Versuchsergebnissen von TODD (1959—1964) an Gefrierschnitten menschlicher Aorten, d.h. in Gegenwart des gewebseigenen Fibrin stabilisierenden Faktors von Intima, Media und Adventitia. Aus dem in den vorliegenden Versuchsergebnissen möglichen Vergleich zwischen der fibrinolytischen Aktivität über dem Aortenendothel einerseits und über dem Endothel der Vasa vasorum der Media und Adventitia andererseits läßt sich allerdings schließen, daß die fibrinolytische Aktivität des Aortenendothels wesentlich geringer ist als die der Endothelien der Vasa vasorum. Zu gleicher Aussage berechtigt ein Vergleich zwischen der Hemmbarkeit der fibrinolytischen Aktivität des Aortenendothels und der Unbeeinflußbarkeit der fibrinolytischen Aktivität über den Vasa vasorum von Media und Adventitia durch Glycinmethylester als FSF-Inhibitor.

TYLER und LACK (1965) haben für den *plasmatischen* FSF eine Inhibitor-Aktivität gegenüber der Aktivierbarkeit des Plasminogen zu Plasmin festgestellt. Die vorliegenden Befunde weisen dem *gewebseigenen* FSF einen gleichen Angriffspunkt zu. Auf die Bedeutung eines Fibrin stabilisierenden Faktors in der menschlichen Aorta für die Pathogenese und Histogenese der Arteriosklerose, für die Abheilung gereinigter arteriosklerotischer Exulcerationen durch Fibrinabdeckung und fortschreitende Hyalinisierung des Fibrins, aber auch für die Inkorporation parietaler Fibrin thromben im Sinne DUGUIDS, kann im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen nur verwiesen werden.

Literatur

BICKFORD, A. F., and SOKOLOW, M.: Fibrinolysis as related to the urea solubility of fibrin. Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttg.) **5**, 480—488 (1961).

BLEYL, U.: Fibrinolyse-Autographie und Proteolyse-Autographie. Tagg. d. Nord- und Westdeutschen Pathologen, 4.—6. 11. 1966, Gießen (im Druck).

—, GRÖZINGER, K.-H., W. NAGEL u. M. WANKE: Histochemische Darstellung der proteolytischen Aktivität bei der akuten experimentellen Pankreatitis. Klin. Wschr. **44**, 282—283 (1966).

— — — Histotopochemie aktiver proteolytischer Enzyme bei der experimentellen auto-digestiven Pankreatitis. Virchows Arch. path. Anat. **342**, 26—37 (1967).

DOERR, W.: Perfusionstheorie der Arteriosklerose. Zwangl. Abhandl. aus dem Gebiet der normalen und patholog. Anatomie, Heft 13. Stuttgart: Georg Thieme 1963.

— Arteriosklerose als somatisches Fatum. Veröffentl. der Schlesw.-Holst. Universitäts-Gesellschaft — Neue Folge. Kiel: Ferdinand Hirt 1963.

— Gangarten der Arteriosklerose. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1964.

DUGUID, J. B.: Thrombosis as a factor in the pathogenesis of coronary atherosclerosis. J. Path. Bact. **58**, 207—212 (1946).

— Thrombosis as a factor in the pathogenesis of aortic atherosclerosis. J. Path. Bact. **60**, 57—61 (1948).

LORAND, L., K. KONISHI, and A. JACOBSEN: Transpeptidation mechanism in blood clotting. *Nature (Lond.)* **194**, 1148—1149 (1962).

SAYERS, D.C.J., TYLER, H.M. and C.H. LACK: The histological demonstration of cytoxinase and tissue fibrin-stabilising factor. *J. Path. Bact.* **90**, 551—556 (1965).

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 (ed.), *Thrombosis and anticoagulant therapy*, p. 25. London: Livingstone Co., 1960.

— Localization of fibrinolytic activity in tissue. *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).

WARREN, B.A.: Fibrinolytic activity of vascular endothelium. *Brit. med. Bull.* **20**, 213—216 (1964).

Dr. U. BLEYL

Institut für Allgemeine Pathologie und
pathologische Anatomie der Universität
69 Heidelberg, Berliner Straße 5