

## Autoradiographische Untersuchungen zur Synthese von DNS, Kollagen und Mucopolysacchariden bei der experimentellen Proliferation der Aortenintima

J. KUNZ, D. KRANZ und O. KEIM

Pathologisches Institut der Humboldt-Universität Berlin,  
dem Rudolf-Virchow-Haus der Charité (Direktor: Prof. Dr. L. H. KETTLER)

Eingegangen am 5. Mai 1967

### *Autoradiographic Studies of the Synthesis of DNA, Collagen and Mucopolysaccharides in Experimentally-Induced Proliferation of Aortic Intima*

*Summary.* The development of obliterating endangiopathy in double stenosed aorta abdominalis of the rat was investigated histologically and autoradiographically.

Intima cell proliferations which narrowed the vessel lumen were observed in 69 per cent of the operated rats. 24 hours post operative the first DNA-synthesizing cells could be observed at the level of endothelial cells by means of  $^3\text{H}$ -thymidine. The maximum of intima cell proliferation was demonstrated at the 7th day as determined by the  $^3\text{H}$ -thymidine-index. At this time the output of  $^3\text{H}$ -proline-marked material from the proliferated intima cells could be shown by varying the intervals between administration of radioactive amino acid and sacrifice of the experimental animals. A considerable incorporation of  $^{35}\text{S}$ -sulfate in proliferating cells was measured photometrically.

The origin of these cells and their role in the beginning synthesis of collagenous fibres and in production of sulfated mucopolysaccharides are discussed.

*Zusammenfassung.* Am Modell der doppelt stenosierte Aorta abdominalis der Ratte wurde die Entwicklung der obliterierenden Endangiopathie histologisch und autoradiographisch untersucht.

Stenosierende Intimaproliferationen fanden sich bei 69% der Versuchstiere ( $n=84$ ). Bereits 24 Std post operationem konnten die ersten DNS-synthetisierenden Zellen im Endothelbereich des eingeeengten Gefäßanteiles festgestellt werden. Das Maximum der Proliferation von Intimazellen lag am 7. Tag, wie die Bestimmung des  $^3\text{H}$ -Thymidin-Index ergab. Durch Variation der radioaktiven Versuchszeit konnte zum Zeitpunkt des Proliferationsmaximums die Ausschleusung  $^3\text{H}$ -Prolin-markierten Materials aus den gewucherten Intimazellen nachgewiesen werden. Außerdem wurde photometrisch ein beträchtlicher Einbau von  $^{35}\text{S}$ -Sulfat in die proliferierte Intima festgestellt.

Die Bedeutung dieser Zellen in der Initialphase der Kollagenfaserbildung sowie bei der Produktion sulfatierter Mucopolysaccharide wird hervorgehoben.

Zellproliferationen der Intima sind nicht nur ein wesentliches Merkmal verschiedener Angiitisformen und der Thrombusorganisation, sondern auch ein wichtiger Teilvorgang bei der experimentellen und menschlichen Arteriosklerose.

Obwohl seit langem lichtmikroskopische und neuerdings elektronenmikroskopische Befunde darüber vorliegen, daß die gewucherten Intimazellen transformierte, in den subendothelialen Raum eingewanderte Muskelzellen der Media darstellen (BUCK, 1961; HACKENSELLNER u. Mitarb., 1965), werden mitunter Intimazellwucherungen bei der Arteriosklerose oder bei verschiedenen experimentellen Angiopathien von den Endothelzellen hergeleitet (FRIEDMAN u. BYERS, 1965). Die Rolle der proliferierten Intimazellen bei der Bildung von kollagenen

Fasern und Mucopolysacchariden ist insbesondere im Zusammenhang mit der Entstehung der Intimafibrose von Interesse. Durch histologisch-histochemische Untersuchungen konnte diese bei der Erörterung der Genese von Angiopathien schon klassische Frage nicht befriedigend gelöst werden.

Der ungenügend bekannte zeitliche Ablauf der Intimazellproliferation, die noch nicht endgültig geklärte Herkunft der proliferierten Zellen sowie ihre umstrittene Beteiligung bei der Synthese von Kollagen und Mucopolysacchariden veranlaßten uns zu den vorliegenden autoradiographischen Untersuchungen.

Zur Erzeugung von Intimazellwucherungen erwies sich die doppelte Einengung der Aorta abdominalis der Ratte als geeignetes Modell. Durch diese Form der experimentellen Aortenstenose konnten wir auch bei der für die vorgesehenen Isotopenuntersuchungen gut geeigneten Ratte in einem hohen Prozentsatz zellige Intimaprolierationen hervorrufen, während bei der Bearbeitung ähnlicher Fragestellungen mit anderer Methodik hauptsächlich Kaninchen verwendet wurden (SPARAGEN u. Mitarb., 1962; HACKENSELLNER u. TÖPELMANN, 1965).

### Methodik

Es wurden 84 männliche, 150 g schwere Ratten vom Stamm „Rehbrücke“ verwendet. Die Tiere wurden in Äthernarkose operiert; dabei wurde der infrarenale Abschnitt der Aorta abdominalis doppelt eingeengt (Abb. 1). Die Stenosierung erfolgte mit Perlorgarn.

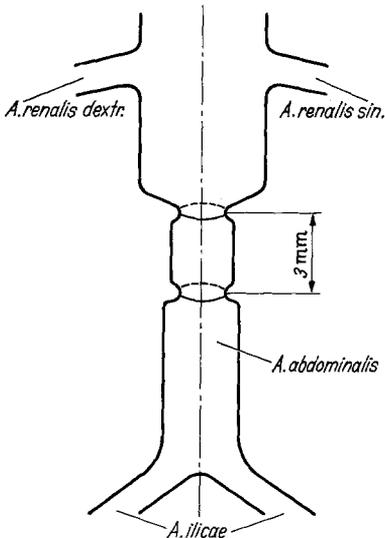


Abb. 1. Schema der doppelten Stenosierung der Aorta abdominalis

**DNS-Synthese.** 12 Tiere erhielten am 7. Tag post op.  $^3\text{H}$ -Thymidin (gleiche Dosis wie bei Versuch 1) 60 min vor der Tötung i. p. appliziert. Außerdem wurden je 3 Tiere 24 und 48 Std, 1 weiteres 96 Std nach der  $^3\text{H}$ -Thymidin-Injektion, die ebenfalls am 7. Versuchstag erfolgte, getötet.

**Kollagensynthese.** 12 Ratten erhielten am 7. Tag post op.  $^3\text{H}$ -Prolin (TRA 82, L-Proline-T (G), The Radiochemical Centre Amersham, Buckinghamshire, England) in einer Dosis von  $500\mu\text{Ci}/100\text{ g}$  Körpergewicht (spez. Akt.:  $460\text{ mCi}/\text{mMol}$ ) intracardial injiziert. Davon wurden je 4 Ratten nach 15, 60 und 240 min getötet. 2 weitere Tiere bekamen die gleiche Aktivitätsdosis  $^3\text{H}$ -Prolin am 14. Tag post. op. appliziert; sie wurden 15 min danach getötet.

Zur Erzeugung gleichmäßiger Einengungen wurde eine Kanüle (Nr. 20) eingebunden und letztere sofort nach der Ligatur wieder entfernt. Der Abstand zwischen den stenosierte Stellen betrug etwa 3 mm. Stets wurde die craniale Stenose zuerst angelegt. Verschuß des Bauchdeckenschnittes durch Klammerung.

#### Versuch 1

Zum Studium des Ablaufes der Zellproliferation wurden Gruppen von je 3 Tieren in folgenden Abständen getötet: Nach 12 Std, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14, und 21 Tagen. Alle Tiere erhielten  $^3\text{H}$ -Thymidin (Thymidine-6-T (n), The Radiochemical Centre Amersham, Buckinghamshire, England) in einer Dosis von  $2\mu\text{Ci}/\text{g}$  Körpergewicht (spez. Akt.:  $16\text{ Ci}/\text{mMol}$ ) 60 min vor der Tötung i. p. injiziert.

#### Versuch 2

In diesem Versuch wurde der Zellstoffwechsel zum Proliferationsmaximum und in nachfolgenden Stadien untersucht.

*Mucopolysaccharidsynthese.* Hierfür wurde 18 Tieren trägerfreies  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$  (Isocommerz, Dresden-Rossendorf) in einer Dosis von  $500\mu\text{Ci}/100\text{ g}$  Körpergewicht 24 Std vor der Tötung i. p. injiziert. Davon befanden sich 12 Ratten am 7. Tag und je 3 am 14. und 21. Tag post op.

Von allen Tieren wurde unmittelbar nach der Tötung der eingengte *Aortenabschnitt* entnommen. Nach 24stündiger Fixierung in 4%igem gepuffertem Formalin und Paraffineinbettung wurden von jedem Block 8 Stufen geschnitten. Jede Stufe umfaßte 20 Schnitte. Pro Tier wurden also insgesamt 160 Schnitte hergestellt. Jeweils der erste und letzte Schnitt jeder Stufe wurden nach HE-Färbung histologisch beurteilt und diejenige Stufe mit der maximalen Intimaproliferation für die autoradiographische Untersuchung ausgewählt.

Es wurden die Emulsionen K 5 und K 6 (VEB ORWO) sowie G 5 (Ilford) verwendet. Nach der unter strenger Konstanz der Bedingungen vorgenommenen Exposition, Entwicklung und Fixierung wurden die Autoradiogramme mit HE gefärbt. Die Auswertung erfolgte nach  $^3\text{H}$ -Thymidin-Gabe durch Auszählung der markierten Zellen, durch Bestimmung des Prozentsatzes der markierten Zellen und Ermittlung der Silberkorndichte pro  $20\mu^2$  Kernfläche, nach  $^3\text{H}$ -Prolin-Applikation durch vergleichende subjektive Beurteilung und nach  $^{35}\text{S}$ -Sulfatgabe durch Photometrie bei 554 nm (Leitz-Mikroskop-Photometer). Stets wurden Autoradiogramme mit gleicher Expositionszeit ausgewertet; diese betragen nach  $^3\text{H}$ -Thymidin-Gabe 2 bzw. 17 Tage, nach  $^3\text{H}$ -Prolin-Gabe 14 Tage und nach  $^{35}\text{S}$ -Sulfat-Gabe 4 Tage.

## Ergebnisse

### *Histologische Befunde*

Insgesamt fanden wir bei 58 von 84 Versuchstieren (=69%) Intimazellproliferationen (Abb. 2). Sie entwickelten sich in unterschiedlicher Ausprägung, abhängig vom Operationszeitpunkt, hauptsächlich im Bereich des eingengten Gefäßsegmentes, wie bereits von BUCK (1961) nach doppelter Ligatur der Arteria carotis communis der Ratte ausführlich beschrieben wurde. Die zellig verbreiterte Intima und auch die Media zeigten gelegentlich lockere leukocytäre oder

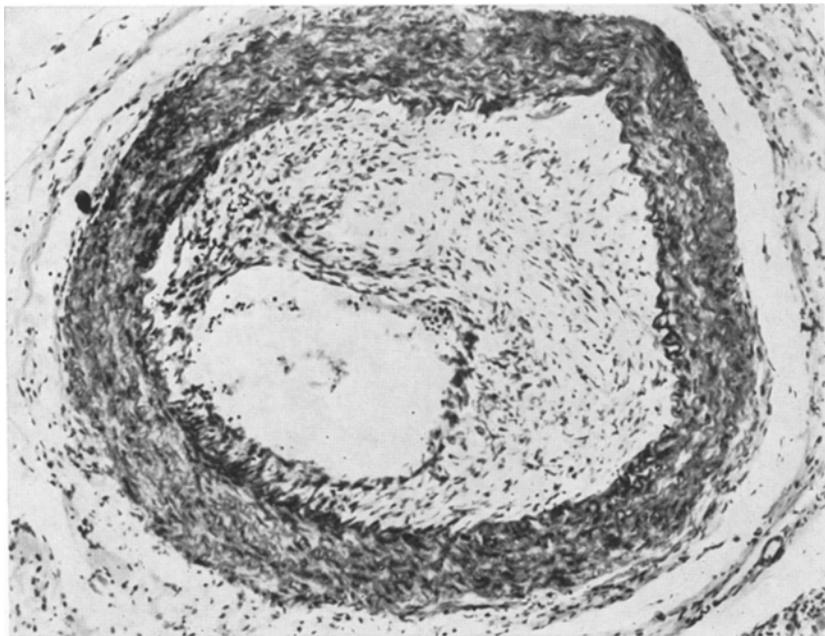


Abb. 2. Hochgradige Lichtungseinengung der Aorta abdominalis durch erhebliche Intimazellproliferation 7 Tage nach doppelter Stenosierung, HE, 114  $\times$

rundzellige Infiltrate. Mehrfach fanden sich sektorförmige Medianekrosen. Häufig wurde eine entzündliche Reaktion in der Umgebung der stenosierten Aorten beobachtet. Gelegentlich traten Abscedierungen und Thrombosierungen auf.

#### *Autoradiographische Befunde*

Die ersten DNS-synthetisierenden Zellen zeigten sich 24 Std post op. im Bereich des Endothels. 12 Std nach dem Eingriff waren noch keine markierten Zellen erkennbar. Mehrere DNS-synthetisierende Zellen waren 2 Tage post op. im Endothelniveau nachweisbar (Abb. 3). In den folgenden Tagen bestand eine deutliche

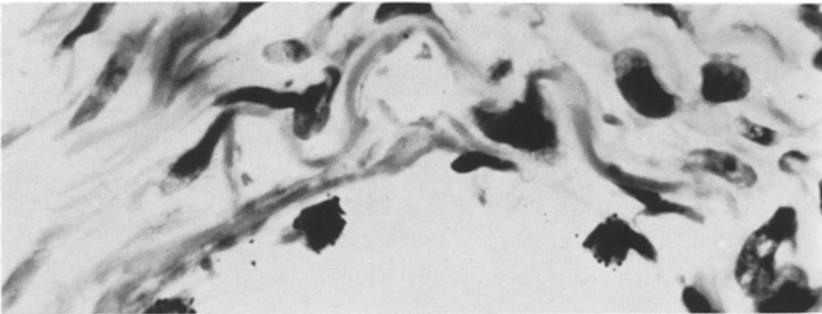


Abb. 3. Drei markierte, im Endothelniveau liegende Zellen 2 Tage post operationem.  $^3\text{H}$ -Thymidin. Radioaktive Versuchszeit: 60 min. HE, 960  $\times$

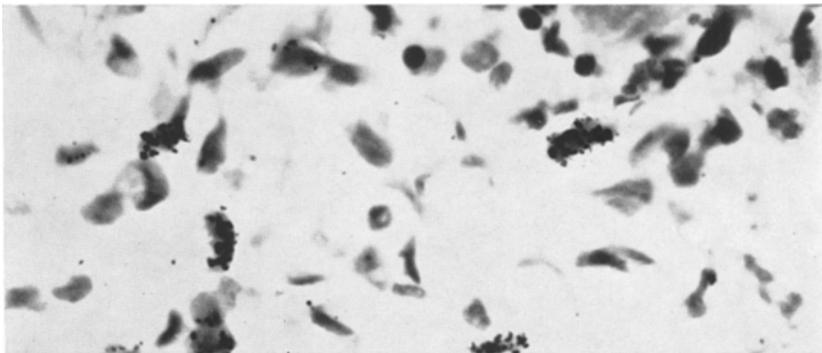


Abb. 4. Zahlreiche DNS-synthetisierende Zellen im Bereich der proliferierten Intima 6 Tage post operationem.  $^3\text{H}$ -Thymidin. Radioaktive Versuchszeit: 60 min. HE, 800  $\times$

Zunahme markierter Zellen (Abb. 4). Das Maximum lag am 7. Tag. Der  $^3\text{H}$ -Thymidin-Index betrug zu diesem Zeitpunkt 18,8. Danach kam es zu einer rapiden Abnahme und am 21. Tag post op. waren nur ganz vereinzelt markierte Zellen feststellbar (Abb. 5). In der Media waren ebenfalls nur ganz selten einzelne markierte Zellen erkennbar. Außerhalb des Operationsgebietes fanden sich in keinem Fall DNS-synthetisierende Zellen in der Aorta. Die Silberkorndichte pro Kernflächeneinheit nahm — offenbar als Ausdruck der der DNS-Synthese folgenden Zellteilung — mit zunehmender radioaktiver Versuchszeit ab; insbesondere konnten wir nach Intervallen von 48 und 96 Std eine beträchtliche Reduktion der Silberkornzahl pro Kernflächeneinheit im Vergleich zu den Werten nach 1 und 24 Std feststellen.

Die Untersuchungen mit dem Kollagenvorläufer  $^3\text{H}$ -Prolin ergaben eine erhebliche Aktivität im Bereich der proliferierten Intimazellen und nur eine außerordentlich geringe Inkorporation der radioaktiven Aminosäure in die Media

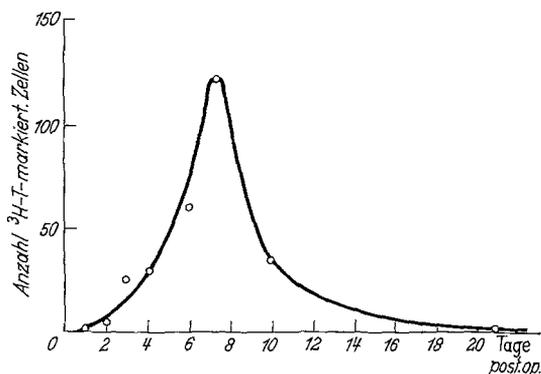


Abb. 5. Abhängigkeit der Anzahl DNS-synthetisierender Intimazellen vom Operationszeitpunkt. Deutliches Proliferationsmaximum um den 7. Versuchstag

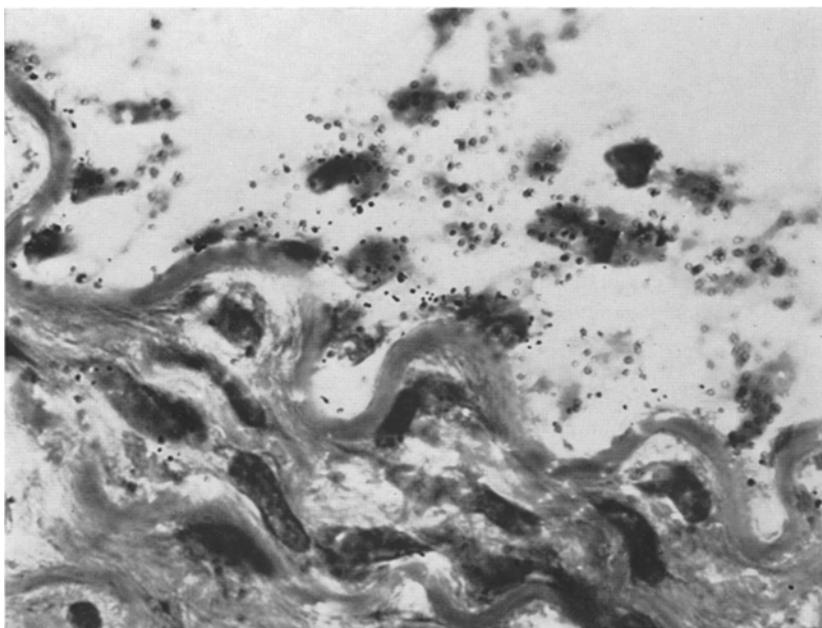


Abb. 6. Deutlicher Einbau von  $^3\text{H}$ -Prolin fast ausschließlich im Bereich proliferierter Intimazellen. Lokalisation der Silberkörner über dem kernnahen Cytoplasma. Radioaktive Versuchszeit: 15 min. HE, 1620 $\times$

(Abb. 6). Dieser Unterschied in der relativen Größe der Kollagensynthese dürfte als real anzusehen sein, da innerhalb der Gefäßwand wohl kaum mit verschiedenen spezifischen Aktivitäten des Vorläuferpools zu rechnen ist. Die Lokalisation der Silbergranula innerhalb der proliferierten Intimazellen war stark abhängig von

der radioaktiven Versuchszeit. Nach einem Intervall von 15 min zwischen Applikation von  $^3\text{H}$ -Prolin und Tötung fanden sich die Körner hauptsächlich über dem kernnahen Cytoplasma, nach einstündigem Intervall vorwiegend in der Zellperipherie, während nach einem Intervall von 4 Std die Granula im wesentlichen im intercellulären Raum lokalisiert waren. Es bestand kein auffälliger Unterschied in der Silberkorndichte zwischen den Präparaten nach 7 und 14 Tagen post op.

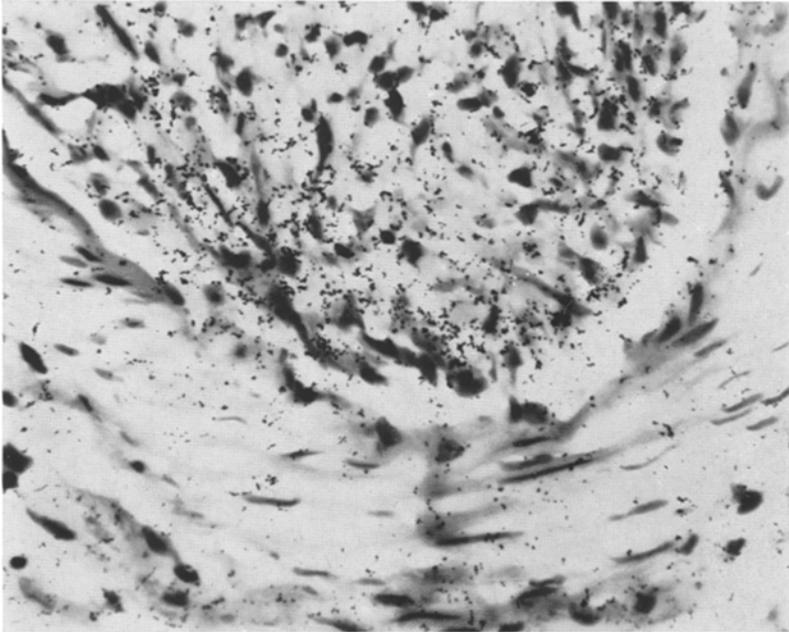


Abb. 7. Erheblicher Einbau von  $^{35}\text{S}$ -Sulfat in die proliferierte Intima. Nur geringgradiger Radiosulfateinbau in die Media. Radioaktive Versuchszeit: 24 Std. HE,  $560\times$

Nach  $^{35}\text{S}$ -Sulfat-Applikation fand sich regelmäßig neben einer mäßigen Inkorporation im Mediabereich ein beträchtlicher Einbau in die proliferierte Intima, ohne daß in jedem Falle eine Zuordnung der Silbergranula zu den einzelnen Zellen möglich war (Abb. 7). Photometrisch wurde bei diesen Präparaten die Schwärzungsintensität über der proliferierten Intima sowie über der Aortenmedia ermittelt, wobei der mittlere Quotient Intima: Media 2,0 betrug. Es wurden keine wesentlichen Schwankungen in der Einbauhöhe von  $^{35}\text{S}$ -Sulfat 7, 14 und 21 Tage post op. festgestellt.

#### Diskussion

Besonders die nach  $^3\text{H}$ -Prolin- und  $^{35}\text{S}$ -Sulfat-Gabe erhobenen Befunde zeigen, daß die proliferierten Intimazellen bestimmte metabolische Merkmale aktivierter Bindegewebszellen des Granulationsgewebes (KUNZ u. BRASELMANN, 1967) besitzen. Durch den autoradiographischen Nachweis des Ausschleusungsprozesses  $^3\text{H}$ -Prolin-markierten Materials aus diesen Zellen wird ihre bedeutsame Rolle bei der Entstehung der Intimafibrose unterstrichen. Wenngleich der genaue zeitliche Ablauf dieser Syntheseleistungen der gewucherten Intimazellen nicht eingehender untersucht werden konnte, dürften die bisher erhobenen Befunde mit der u. a.

von BREDT (1957, 1961) vertretenen Auffassung einer vorwiegend acellulären Genese der Intimafibrose nicht zu vereinbaren sein. Denn gerade in der Initialphase der Kollagenfaserbildung kommt den proliferierten Zellen der Intima, wie aus den Befunden nach Applikation des Kollagenvorläufers  $^3\text{H}$ -Prolin hervorgeht, eine entscheidende Bedeutung zu.

Die bereits früher von uns beobachtete (KUNZ, 1965) starke Inkorporation von  $^{35}\text{S}$ -Sulfat in die proliferierte Intima dürfte auch unter den vorliegenden Versuchsbedingungen eine gegenüber der Media gesteigerte Sulfomukopolysaccharidsynthese widerspiegeln. Die Intimazellwucherungen sind somit als verantwortlich für die vielfach histochemisch nachgewiesene Vermehrung sulfatierter Mukopolysaccharide in dieser Gefäßwandschicht anzusehen. Erhöhte Perfusion oder gealtertes Insudateiweiß als dessen alleinige Ursache anzuführen (MITTELMAIER, 1959), scheint uns daher nicht vertretbar zu sein.

Die Herkunft der gewucherten, autoradiographisch als „Fibroblasten“ zu charakterisierenden Intimazellen kann auch durch die vorliegenden Ergebnisse nicht als geklärt angesehen werden. Die Entstehung dieser „myointimalen“ Zellen (BUCK, 1961) aus transformierten Media-Muskelzellen ist für einen Teil der experimentell induzierten oder spontanen Angiopathien auf Grund elektronenmikroskopischer Kriterien keineswegs zu bezweifeln. Andererseits lassen sich manche Befunde von FRIEDMAN (1963) und FRIEDMAN u. BYERS (1965) bei der Cholesterinatheromatose des Kaninchens sowie das Auftreten einer beträchtlichen Intimazellproliferation im Gefolge einer vollständigen Zerstörung der darunter gelegenen Media-Muskelzellen durch Säureverätzung (HÜTTNER u. Mitarb., 1965) oder nach Strahleneinwirkung (KUNZ u. Mitarb., 1965) nur schwer mit dieser These in Einklang bringen. Unsere Beobachtung, daß die ersten markierten Zellen nach  $^3\text{H}$ -Thymidin-Gabe 24 Std nach der Einengung im Niveau des Endothels auftreten, kann verbindlich nur durch weitere elektronenmikroskopisch-autoradiographische Untersuchungen gedeutet werden. Zur Zeit muß neben der Möglichkeit einer primären DNS-Synthesesteigerung von echten Endothelzellen auch erwogen werden, daß Media-Muskelzellen in den Endothelbereich einwandern, um erst hier ihre proliferative Aktivität zu entfalten. Subendotheliale Bindegewebszellen können nicht als Ausgangspunkt der Intimazellwucherungen angesehen werden, da solche Zellen nach den elektronenmikroskopischen Untersuchungen von PEASE und PAULE (1960) in der Rattenaorta nicht vorkommen. Ungeachtet der noch nicht klar zu definierenden Herkunft aller proliferierenden Intimazellen ergaben unsere Untersuchungen, daß diese sich zu „Fibroblasten“ differenzierenden Zellelemente ein Proliferationsmaximum am 7. Tag nach der operativen Aorteneinengung aufweisen. Es entwickelt sich demnach mit einer zeitlichen Verzögerung von 3 Tagen gegenüber den Verhältnissen beim Granulationsgewebe, das sich nach subcutaner Implantation von PVC-Würfeln ausbildet (KUNZ u. BRASELMANN, 1967).

#### Literatur

- BREDT, H.: Die Morphologie der Arteriosklerose. Verh. Dtsch. Ges. Path. **41**, 11—24 (1957). — In: G. SCHEITLER, Arteriosklerose, Ätiologie, Pathologie, Klinik und Therapie. Stuttgart: Georg Thieme 1961.
- BUCK, R. C.: Intima thickening after ligation of arteries. Circulat. Res. **9**, 418—426 (1961).
- FRIEDMAN, M.: Pathogenesis of spontan atherosclerotic plaque. Arch. Path. **76**, 318—329 (1963).

- FRIEDMAN, M., and S. O. BYERS: Aortic atherosclerosis intensification in rabbits by prior endothelial denudation. *Arch. Path.* **79**, 345—356 (1965).
- HACKENSELNER, H. A., H. DAVID, u. I. UERLINGS: Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an doppelt ligierten Arterien (A. carotis des Kaninchens). *Acta biol. med. germ.* **14**, 34—51 (1965).
- , u. I. TÖPELMANN: Das Flächenbild des Endothels der doppelt ligierten Arteria carotis des Kaninchens. *Acta morph.* **13**, 359—375 (1965).
- HÜTTNER, J., H. JELLINEK, P. SÓTONYI, A. TÓTH u. Z. MAKÓI: Enzymhistochemische Untersuchungen der Aortaregeneration in Tierexperimenten. *Acta histochem. (Jena)* **21**, 219—227 (1965).
- KUNZ, J.: Autoradiographische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Aortenmukopolysaccharide nach lokaler Einwirkung von  $^{90}\text{Sr}$ — $^{90}\text{Y}$ -Betastrahlen. *Acta histochem. (Jena)* **22**, 16—26 (1965).
- , u. H. BRASELMANN: Autoradiographische Untersuchungen zur DNS-, Kollagen- und Mukopolysaccharidsynthese im Granulationsgewebe. *Exp. Path.* **1**, 95—108 (1967).
- A. HECHT u. H. HEGEWALD: Morphologische und fermenthistochemische Untersuchungen der Aorta des Kaninchens nach lokaler Einwirkung von  $^{90}\text{Sr}$ — $^{90}\text{Y}$ -Betastrahlen. *Frankfurt. Z. Path.* **74**, 293—306 (1965).
- MITTELMAIER, H.: In: H. HESS, Die obliterierenden Gefäßerkrankungen. München u. Berlin: Urban & Schwarzenberg 1959.
- PEASE, D. C., and W. J. PAULE: Electron microscopy of elastic arteries; the thoracic aorta of the rat. *J. Ultrastruct. Res.* **3**, 469—483 (1960).
- SPARAGEN, S. C., V. P. BOND, and L. K. DAHL: Role of hyperplasia in vascular lesions of cholesterol-fed rabbits studied with Thymidine- $\text{H}^3$ -autoradiography. *Circulat. Res.* **11**, 329—336 (1962).

Doz. Dr. J. KUNZ, Dr. D. KRANZ und O. KEIM  
Pathologisches Institut der  
Humboldt-Universität, Isotopenabteilung  
X 105 Berlin, Schumannstraße 20/21