

Zur Wirkung von Hydrocortisonacetat auf den Zellstoffwechsel bei der experimentellen Intimaproliferation der Rattenaorta

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

Effect of Hydrocortisone Acetate on Cell Metabolism in Experimental Intima Proliferation of Rat Aorta

Summary. The influence of hydrocortisone acetate on the incorporation of ^3H -thymidine, ^3H -proline and ^{35}S -sulfate in experimental intima proliferation was investigated.

Intima proliferation was produced by double stenosis of the aorta abdominalis of rats. The following results were obtained:

1. Hydrocortisone acetate caused a considerable inhibition of proliferating intima changes. Moreover, the ^3H -thymidine-index was decreased.

2. After administration of hydrocortisone acetate an increase of grain-density above cells which had incorporated ^3H -thymidine was observed. In addition, these cells were investigated karyometrically. Eventual causes of this phenomenon are discussed.

3. At the maximum of proliferation the incorporation of ^3H -proline and ^{35}S -sulfate in proliferating intima cells was decreased after administration of hydrocortisone acetate.

Zusammenfassung. Es wurde der Einfluß von Hydrocortisonacetat auf den Einbau von ^3H -Thymidin, ^3H -Prolin und ^{35}S -Sulfat in die experimentelle Intimaproliferation untersucht.

Die Intimaproliferation wurde durch doppelte Stenosierung der Aorta abdominalis bei Ratten erzeugt. Die Untersuchungen hatten folgende Ergebnisse:

1. Hydrocortisonacetat bewirkt unter den verwendeten Versuchsbedingungen eine erhebliche Hemmung der proliferativen Intimaveränderungen. Der ^3H -Thymidin-Index ist dabei erniedrigt.

2. Für die nach Hydrocortison-Gaben beobachtete Erhöhung der Silberkorndichte über den mit ^3H -Thymidin markierten Intimazellkernen werden unter Berücksichtigung der Ergebnisse karyometrischer Untersuchungen in Frage kommende Ursachen diskutiert.

3. Zum Zeitpunkt des Proliferationsmaximums ist der Einbau von ^3H -Prolin und ^{35}S -Sulfat in die proliferierte Intima nach Hydrocortisonacetat-Applikation herabgesetzt.

Bei der Therapie obliterierender Angiopathien sind bekanntlich Cortison-derivate von vorrangiger Bedeutung. Dies dürfte mit ihrer proliferationshemmenden Wirkung sowie mit dem hemmenden Effekt der Glucocorticoide auf die Mucopolysaccharid- und Kollagensynthese zusammenhängen. Es können jedoch weder der Wirkungsmechanismus (DELBRÜCK, 1964; SEIFERT u. HILZ, 1966) noch die Auswirkungen der Cortisonbehandlung auf die submikroskopische Zellstruktur (SCHWARZ u. KUTZSCHE, 1966) als völlig geklärt angesehen werden. Unterschiedlich bewertet wird in der Literatur auch der Einfluß von Cortison auf den Ablauf der experimentellen Arteriosklerose (FRIEDMAN u. Mitarb., 1964; GUMBINAS u. Mitarb., 1966). Aus diesen Gründen und wegen der großen klinischen Bedeutung einer weiteren Klärung der Cortisonwirkung bei Angiopathien überprüften wir am Modell der doppelt stenosierten Rattenaorta autoradiographisch den Einfluß von Hydrocortisonacetat auf Proliferation und Stoffwechselverhalten der Intimazellen.

Methodik

Für diese Untersuchungen verwendeten wir 100 männliche, 150 g schwere Ratten (Stamm „Rehbrücke“). Bei ihnen wurden Intimaproliferationen durch doppelte Stenosierung der Aorta abdominalis erzeugt, wie in der vorhergehenden Arbeit beschrieben (16). 50 Tiere dienten als Kontrollen; die verbleibenden 50 Tiere erhielten 7 Tage vor der Operation täglich subcutane Injektionen von Hydrocortisonacetat (Gedeon Richter AG, Budapest), wobei die Injektionsstelle mehrfach gewechselt wurde. Die Einzeldosis betrug 15 mg/kg Körpergewicht. 2 Tage nach der Operation erhielten diese Tiere eine weitere Injektion von Hydrocortisonacetat. Da die Tiere eine deutliche Gewichtsabnahme sowie eine Verschlechterung ihres Allgemeinzustandes aufwiesen, mußte von weiteren Applikationen abgesehen werden.

Am 7. Tag nach der Operation, dem in den vorausgehenden Untersuchungen (16) ermittelten Proliferationsmaximum, erhielten je 24 Tiere (12 Kontrollen, 12 Hydrocortisonacetat-behandelte Ratten) ^3H -Thymidin (The Radiochemical Centre Amersham, Buckinghamshire, England; Thymidine-6-T(n), spez. Akt.: 12 Ci/mMol; Dosis: 2 $\mu\text{Ci}/\text{g}$ Körpergewicht), ^3H -Prolin [L-Proline-T(G), Amersham, England; spez. Akt.: 460 mCi/mMol; Dosis: 500 $\mu\text{Ci}/100 \text{ g}$ Körpergewicht) sowie ^{35}S -Sulfat (Isocommerz, Dresden-Rossendorf; $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$, trägerfrei; Dosis: 500 $\mu\text{Ci}/100 \text{ g}$ Körpergewicht) injiziert. ^3H -Thymidin und ^{35}S -Sulfat wurden intraperitoneal, ^3H -Prolin intrakardial verabfolgt. Die radioaktive Versuchszeit betrug nach Gabe von ^3H -Thymidin 60 min, nach Gabe von ^{35}S -Sulfat 24 Std. Nach der Applikation von ^3H -Prolin wurden je 8 Tiere (4 Kontrollen und 4 Hydrocortisonacetat-behandelte Ratten) nach 15 min, 60 min und 4 Std getötet.

Nach der Tötung der Tiere und der histologischen Aufarbeitung des eingeengten Aortenanteiles, einschließlich der proximal und distal davon gelegenen Aortenabschnitte, wurden durch Stufenschmitt-Technik — in gleicher Weise wie zuvor beschrieben (KUNZ u. Mitarb., 1967) — geeignete Schnitte ausgewählt und von diesen Autoradiogramme hergestellt. Es wurden folgende Emulsionen verwendet: K 5 und K 6 (ORWO) sowie G 5 (Ilford). Die Expositionszeiten betrugen 1—14 Tage. Nach der Entwicklung und Fixierung wurden die Autoradiogramme mit HE gefärbt. Die für die Photometrie vorgesehenen Autoradiogramme nach ^{35}S -Sulfatgabe blieben ungefärbt. Zur Auswertung der Autoradiogramme nach ^3H -Thymidin-Injektion wurde der ^3H -Thymidin-Index sowie die Silberkornzahl pro Kernflächeneinheit bestimmt. Die dazu erforderlichen karyometrischen Messungen wurden mit dem Okularmikrometer ausgeführt und die Kernfläche nach $F = \frac{\pi}{4} l \times k$ errechnet (l = Längs-, k = Querdurchmesser). Auf diese Weise wurden die Kornzahlen und Kernflächen von allen markierten Zellen innerhalb der Intimaproliferationen bestimmt. Die Auswertung der Autoradiogramme nach ^3H -Prolin-Applikation erfolgte durch Ermittlung der Silberkornzahlen pro 100 Zellen, nach ^{35}S -Sulfatgabe durch photometrische Bestimmung der Schwärzungintensität von Intima und Media bei 554 nm (Leitz-Mikroskop-Photometer) und Errechnung des Quotienten aus beiden Werten.

Ergebnisse

Die 8mal mit einer Hydrocortisonacetat-Dosis von 15 mg pro kg Körpergewicht behandelten Ratten zeigen eine kontinuierliche mittlere Gewichtsabnahme von 25 g bei einem Ausgangsgewicht von 150 g, während die Kontrollen nach anfänglich leichtem Gewichtsanstieg in der postoperativen Phase nur einen geringfügigen Gewichtsverlust erkennen lassen. Die Gesamt mortalität war bei den Kontrollen mit 36% deutlich höher als bei den Tieren, die Hydrocortisonacetat erhalten hatten (=26%). Diese Differenz ergab sich hauptsächlich durch eine größere Mortalität bei den Kontrollen in der postoperativen Phase, ein Befund, der sicher zum Teil mit einer geringeren postoperativen Kreislaufbelastung bei den mit Hydrocortison behandelten Tieren zusammenhängt.

Diese geringere Kreislaufbelastung nach Hydrocortisongabe läßt sich vor allem aus dem Ergebnis der vergleichenden histologischen Beurteilung der Intimaproliferation im Bereich der stenosierten Aortenanteile herleiten (Abb. 1). Dabei

entspricht der Intensitätsgrad 1 in Abb. 1 einer geringfügigen, nur aus wenigen Zellagen bestehenden Intimaverbreiterung, der Intensitätsgrad 2 einer Intimaproliferation, die etwa ein Drittel der ursprünglichen Lichtung erfaßt, und der Intensitätsgrad 3 einer zelligen Intimawucherung, die mehr als die Hälfte des

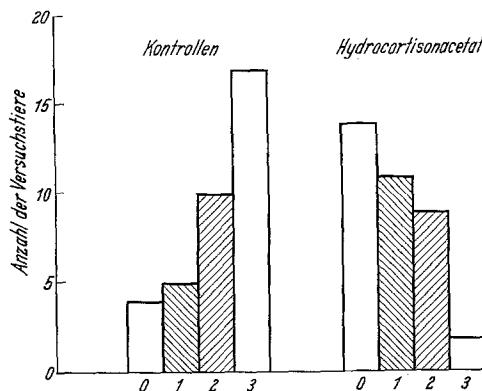


Abb. 1. Intensität der Intimaproliferationen 7 Tage nach doppelter Stenosierung der Aorta abdom. bei Kontrollen und Hydrocortisonacetat-behandelten Ratten. (Einteilung der Intensitätsgrade s. Text)

Gefäßlumens einnimmt. Es ist offensichtlich, daß die Hydrocortison-Applikation zu einer beträchtlichen Hemmung der proliferativen Intimaveränderungen — im Vergleich zu den Kontrollen — geführt hat. So finden sich mittlere bis starke Intimaproliferationen bei 11 von 36 Cortison-behandelten Ratten, bei den Kontrollen dagegen bei 27 von 36 Tieren. Die Gegenüberstellung der ^3H -Thymidin-Indices von Versuchstieren und Kontrollen ergibt eine Verminderung des prozentualen Anteils DNS-synthetisierender Zellen nach Hydrocortison-Gabe (Tabelle).

Die Bestimmung der Silberkornzahl pro Zellkern mit Hilfe der Emulsion K 6 (Abb. 2, 3) läßt bei den behandelten Tieren und bei den Kontrollen eine deutliche

Zunahme der Kornzahl pro Zellkern mit zunehmender Kerngröße erkennen. Auffälligerweise zeigen die Regressionsgeraden der Hydrocortison-behandelten Tiere einen steileren Anstieg als die der Kontrollen (Abb. 4). Diese Differenz in der Steilheit der Regressionsgeraden ist nach dem U-Test von MANN und WHITNEY signifikant¹. Die Berechnung der Silberkorndichte pro $20\mu^2$ Kernfläche ergibt signifikant höhere Werte bei den Hydrocortison-behandelten Ratten (Abb. 5). Zwischen den beiden zu vergleichenden Tiergruppen wurden keine Unterschiede in der Größe der ausgemessenen Kernflächen der markierten Intimazellen festgestellt.

Tabelle. ^3H -Thymidin-Indices der Intimaproliferationen von 6 Ratten

Kontrollen	Hydrocortisonacetat
18,8	7,1
19,8	14,7
18,0	10,9

¹ Für die statistische Beratung danken wir Herrn Dr. KLEMM, Hygiene-Institut der Humboldt-Universität Berlin.

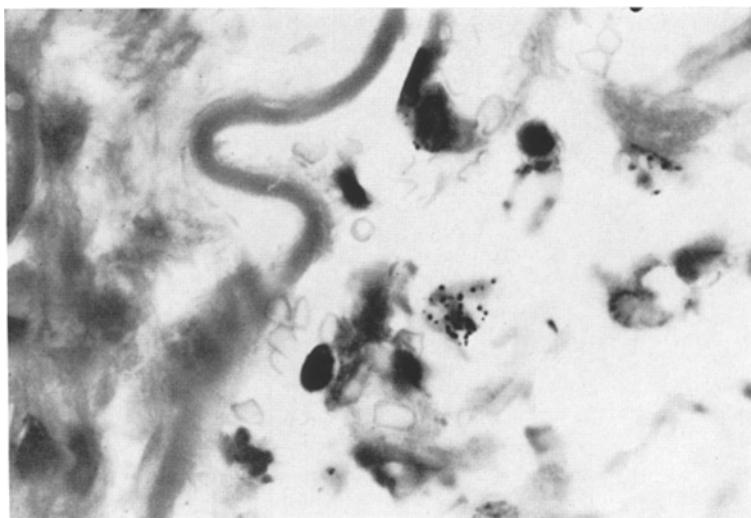


Abb. 2. Einzelne DNS-synthetisierende Intimazellen 7 Tage nach doppelter Stenosierung der Aorta abdom. der Ratte. ^3H -Thymidin. Radioaktive Versuchszeit: 60 min. Emulsion K 6 (ORWO), Expos.-Zeit: 2 Tage, HE, Vergr. 1620 \times

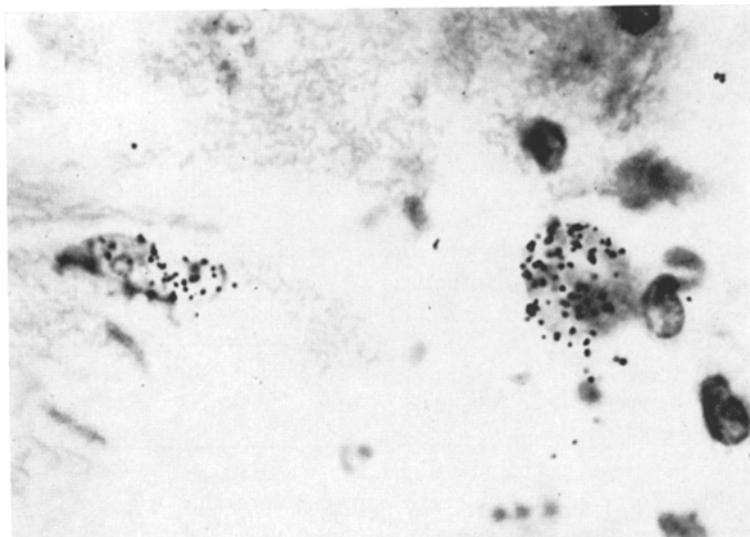


Abb. 3. Zwei DNS-synthetisierende Intimazellen 7 Tage nach doppelter Stenosierung der Aorta abdom. der Ratte. Hydrocortisonacetat-Behandlung. ^3H -Thymidin. Radioaktive Versuchszeit: 60 min. Emulsion K 6 (ORWO), Expos.-Zeit: 2 Tage, HE, Vergr. 1620 \times

Nach ^3H -Prolin-Applikation findet sich unter Hydrocortisoneinfluß eine gegenüber den Kontrollen deutlich verminderte Kornzahl über der proliferierten Aortenintima, wie entsprechende Kornzählungen bei allen zur Verfügung stehenden Autoradiogrammen nach einstündiger radioaktiver Versuchszeit ergeben. Hinweise für eine durch das Cortisonderivat bedingte Änderung in der Ausschleusungsgeschwindigkeit ^3H -Prolin-haltigen Materials aus den proliferierten Intima-

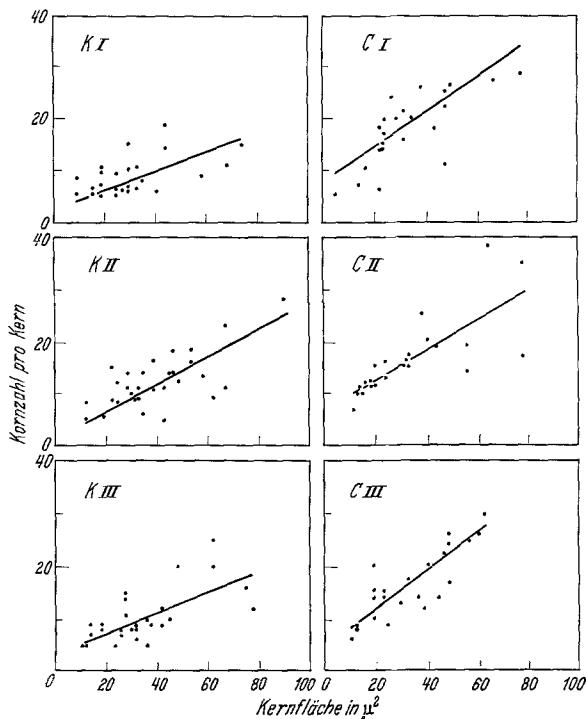


Abb. 4. Abhängigkeit der Silberkorndichte pro Zellkern von der Größe der gemessenen Kernfläche bei Kontrollen (K) und Hydrocortisonacetat-behandelten Ratten (C)

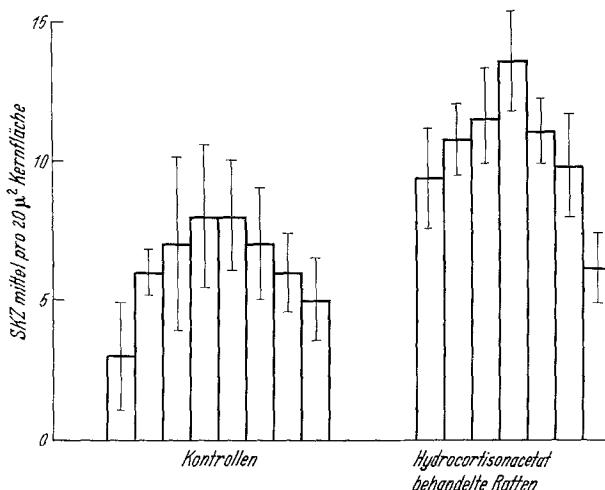


Abb. 5. Mittlere Silberkornzahl pro $20 \mu^2$ Kernfläche bei Kontrollen und Hydrocortisonacetat-behandelten Ratten

zellen, die durch die vorgenommene Variation der radioaktiven Versuchszeit erfaßbar sein müßte, finden sich nicht. Wie in den vorangegangenen Untersuchungen, sind bei allen untersuchten Tieren nach einem Intervall von 15 min zwischen

Injektion der radioaktiven Aminosäure und Tötung der Tiere die Silbergranula hauptsächlich über dem Zytoplasma, nach 1stündigem Intervall vor allem über der Zellperipherie und nach 4ständigem Intervall vorzugsweise über dem Interzellularraum lokalisiert. Unter Hydrocortison-Einwirkung konnte ferner — als Ergebnis der photometrischen Bestimmung der Schwärzungsintensität der Autoradiogramme — ein verminderter Einbau von ^{35}S -Sulfat in die proliferierte Intima festgestellt werden. Dies äußerte sich in einer Abnahme des mittleren Intima-Media-Quotienten auf 1,4 nach Hydrocortisongabe gegenüber einem mittleren Quotienten von 2,0 bei den Kontrollen. Eine herabgesetzte ^{35}S -Sulfat-Inkorporation nach Hydrocortisonacetat-Gabe fand sich auch in den außerhalb des Operationsgebietes gelegenen Aortenanteilen. Zur Kontrolle des Einbaues von ^{35}S -Sulfat in die Mukopolysaccharide wurde aus diesen Gefäßwandabschnitten durch Säulenchromatographie die Chondroitinsulfatfraktion isoliert. Deren spezifische Aktivität war bei den Kontrollen um den Faktor 3 höher als bei den Hydrocortison-behandelten Tieren. Dies weist darauf hin, daß die durch Hydrocortisonacetat bedingte Einbauhemmung von ^{35}S -Sulfat in die proliferierte Intima noch größer ist, als durch die oben angegebene Abnahme des Intima-Media-Quotienten zum Ausdruck kommt.

Diskussion

Bei der Erörterung unserer Ergebnisse sollen zwei Befunde besonders herausgestellt werden: 1. die Hemmung der Intimaproliferation und 2. die Erhöhung der Silberkorndichte über den Kernen der markierten Intimazellen bei den Hydrocortison-behandelten Ratten nach Injektion von ^3H -Thymidin.

Zu 1: Die beobachtete deutliche Hemmung der experimentell induzierten Intimaproliferation durch Hydrocortisonacetat entspricht der bekannten Wirkung dieses Cortisonderivates auf die Entwicklung des Granulationsgewebes, bei der Wundheilung, bei der experimentellen Arteriosklerose sowie auf das Fibroblastenwachstum *in vitro* (FRIEDMAN u. Mitarb., 1964; JUNGE-HÜLSING, 1965). Der herabgesetzte ^3H -Thymidin-Index in der proliferierten Intima nach Hydrocortisongabe stimmt mit diesen Befunden überein und könnte möglicherweise durch eine Verlängerung der Generationszeit oder einer ihrer Teilphasen bedingt sein, deren Bestimmung bei mesenchymalen Zellen bekanntlich besondere Schwierigkeiten entgegenstehen (WOLFART, 1964).

Zu 2: Die erhöhte Silberkorndichte pro Kernflächeneinheit nach Hydrocortisongabe darf unseres Erachtens nicht ohne weiteres als Ausdruck einer gesteigerten DNS-Syntheserate gewertet werden; denn neben der Möglichkeit, daß unterschiedliche Ploidiestufen der Kerne zu diesem Effekt führen, muß auch eine herabgesetzte Selbstdabsorption von β -Teilchen, z. B. infolge gesteigerter Hydratation der Kerne, in Betracht gezogen werden (MAURER u. PRIMBSCH, 1964). Allerdings ergaben unsere Kernmessungen keine Anhaltspunkte für eine durch Hydrocortison bedingte Kernvergrößerung. Eine gesteigerte Kornzahl pro Kern kann auch als Folge eines Proliferationsreizes, z. B. nach temporärer Ischämie der Ratteniere, beobachtet werden (STÖCKER u. HEINE, 1965). In diesem Falle liegt eine echte Steigerung der DNS-Syntheserate vor, die mit einer Verkürzung der S-Phasen-Dauer gekoppelt ist. Inwieweit in unseren Versuchen sekundäre Fakto-

ren, wie z.B. Infektionen, einen solchen Effekt ausgelöst haben, läßt sich auf Grund der vorliegenden Befunde nicht entscheiden.

Es bleibt schließlich zu fragen, ob möglicherweise ein echter Anstieg der DNS-Syntheserate in den proliferierten Intimazellen infolge des vorzeitigen Absetzens der Hydrocortison-Applikation vorliegt. Eine solche Interpretation muß besonders im Hinblick auf die Ergebnisse von SEIFERT u. HILS (1966) in der Fibroblastenkultur mit erwogen werden, die einen deutlichen Wiederanstieg der Zellproliferation nach vorübergehender Hemmung durch Cortisolzusatz zu den Kulturen fanden. Zur Klärung dieses Befundes sind weitere Untersuchungen mit verschiedenen Cortisondosen und unterschiedlichen Versuchsstadien erforderlich.

Die beobachtete Einbauhemmung von ^3H -Prolin und ^{35}S -Sulfat in die gewucherten Intimazellen nach Hydrocortisongabe stimmt mit Literaturangaben überein, die auf eine Hemmung der Kollagen- und MPS-Synthese in anderen aktivierten Bindegewebszellen durch bestimmte Cortisonerivate hinweisen (BOSTRÖM u. Mitarb., 1964; LÖWE, 1966). Für die Mukopolysaccharide wurde unter Cortisoleinwirkung zusätzlich eine Abbauhemmung festgestellt (JUNGE-HÜLSING, 1965).

Die Hemmung der proliferativen Aktivität der Intimazellen und ihrer Fähigkeit, Kollagenfaservorstufen und Mukopolysaccharide zu produzieren, dürfte somit als wichtige Ursache für die klinisch nach Cortisongabe beobachtete günstige Beeinflussung obliterierender Angiopathien (BIRKHEAD u. Mitarb., 1957; KAISER, 1957; GÖDER u. Mitarb., 1966) anzusehen sein, wenngleich schon wegen der von uns verwendeten hohen Cortisondosis eine kritiklose Übertragung der Ergebnisse auf die Verhältnisse beim Menschen nicht statthaft ist.

Literatur

- BIRKHEAD, N. C., H. P. WAGENER, and R. M. SHICK: Treatment of temporal arteritis with adrenal corticosteroids. *J. Amer. med. Ass.* **163**, 821—827 (1957).
- BOSTRÖM, H., K. BERNTSEN, and M. W. WHITEHOUSE: Biochemical properties of anti-inflammatory drugs. II. Some effects on sulfat- ^{35}S metabolism in vivo. *Biochem. Pharmacol.* **13**, 413—420 (1964).
- DELBRÜCK, A.: Zur Enzymologie der Bindegewebe. *Enzymol. biol. clin.* **4**, 84—106 (1964).
- FRIEDMAN, M., S. BYERS, and S. ST. GEORGE: Cortisone and experimental atherosclerosis. *Arch. Path.* **77**, 142—158 (1964).
- GÖDER, G., H. DAVID u. I. UERLINGS: Elektronenmikroskopische Befunde an der Gefäßwand bei Arteriitis temporalis. *Albrecht v. Graefes Arch. Ophthal.* **169**, 12—29 (1966).
- GUMBINAS, M., R. J. KRONE, and D. J. FERGUSON: Treatment of experimental pulmonary arteriosclerosis with cortisone, heparin and fibrinolysin. *J. Atheroscler. Res.* **6**, 381—385 (1966).
- JUNGE-HÜLSING, G.: Untersuchungen zur Pathophysiologie des Bindegewebes. Heidelberg: Dr. Alfred Hüthig 1965.
- KAISER, H.: Cortisonerivate in Klinik und Praxis. Darmstadt: E. Merck A. G. 1957.
- KUNZ, J., D. KRAZ u. O. KEIM: Autoradiographische Untersuchungen der Synthese von DNS, Kollagen und Mukopolysacchariden bei der experimentellen Proliferation der Aortenintima. *Virchows Arch. path. Anat.* (1967) (im Druck).
- LÖWE, H.: Das Kollagen und die Beeinflussung seiner Synthese und Strukturierung durch Cortisonerivate. *Dtsch. Gesundh.-Wes.* **21**, 1279—1284 (1966).
- MAURER, W., u. E. PRIMBSCH: Größe der β -Selbstabsorption bei der H^3 -Autoradiographie zur Massenbelegung. *Exp. Cell Res.* **33**, 8—18 (1964).

- SCHWARZ, W., u. A. KUTZSCHE: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die anabole und katabole Wirkung von Dexamethason und Methenolester auf Fibroblasten in vitro. *Klin. Wschr.* **44**, 979—982 (1966).
- SEIFERT, R., and H. HILZ: Selective and reversible inhibition of proliferation and influence on metabolic functions in L cells by low cortisol concentrations. *Acta endocr. (Kbh.)* **53**, 189—204 (1966).
- STÖCKER, E., u. W. D. HEINE: Über die Proliferation von Nieren- und Leberepithel unter normalen und pathologischen Bedingungen. *Beitr. path. Anat.* **131**, 410—434 (1965).
- WOLFART, W.: Histoautoradiographische Untersuchungen zum Stoffwechsel und zur Genese des tuberkulösen Granulationsgewebes. *Beitr. path. Anat.* **129**, 436—483 (1963/64).

Doz. Dr. J. KUNZ, Dr. D. KRAHN, O. KEIM
Pathologisches Institut der
Humboldt-Universität, Isotopenabteilung
X105 Berlin, Schumannstraße 20/21