

Einbaurate von Enzymeiweißen in das Rattenpankreas nach Adrenalektomie unter Cortison

M. WANKE, K. WEGENER und H. LAHMANN

Pathologisches Institut der Universität Heidelberg (Direktor: Prof. Dr. W. Doerr)

Eingegangen am 25. Mai 1970

The Incorporation of Enzyme-Proteins in the Pancreas of the Adrenalectomized Rat Treated with Cortisone

Summary. Ten days after bilateral adrenalectomy there is a statistically significant decrease (—71 %) in proteolytic enzymes of the pancreatic acinar cells. Application of cortisone on the 10th day after bilateral adrenalectomy is followed 4 hours later by an increase (+ 12 % as compared with controls) of trypsin. Autoradiographic studies show a direct proportionality between the silver grains and the aminoacid incorporation presumed. The grains in the nucleus are negligible. Therefore, participation of the nucleus in the production of proenzymes seems to be of no importance. The experiments demonstrate the close relation between the adrenal cortex and aminoacid uptake of the exocrine cells of the pancreas.

Cortisone-pancreatitis serves as a model. The results are comparable with the situation in humans.

In früheren Untersuchungen gelang es uns, eine biliäre von einer proteolytischen und lipolytischen Pankreatitis zu unterscheiden (Wanke, 1966, 1968; Wanke et al., 1966). Nach Doerr (1959, 1964) entsteht die akute Pankreatitis in der Regel auf vorbereitetem Boden. Vorwiegend metabolisch und seltener duktilär wird auf dem morphologisch und humoral „vorbereiteten Boden“ das akute Geschehen eingeleitet. Dabei kommt der Pankreaslipase eine wesentliche Bedeutung für subakute Exacerbationen der chronisch rezidivierenden Pankreatitis zu (Wanke, 1970). Die humorale Steuerung der exokrinen Pankreassekretion läßt im weiteren Beziehungen zur Nebennierenrinde erkennen.

Auf Grund der Untersuchungen von Evans (1936), Long et al. (1940) sowie White (1949) werden die Glucocorticoide allgemein als katabolische Hormone betrachtet. Indessen konnte in den letzten Jahren auch ein anabolischer Effekt des Cortison auf die Leber nachgewiesen werden (Trémolières et al., 1954; Degenhardt et al., 1961; Eisenstein, 1962; Hübener, 1962; Segal et al., 1962; Geller et al., 1964; Tomkins u. Yielding, 1964 u. a.).

Volk und Lazarus (1960, 1962, 1963) beobachteten am Pankreas nach Steroid-medikation eine Proliferation von Gangepithelien, Vergrößerung der B-Zellen mit Kernschwellung, Glykogeneinlagerung und eine vermehrte Mitoserate. Putzke und Nicsovics (1965) fanden initial eine Anreicherung von Enzymgranula, gesteigerte Tryptophanreaktion und Ergastoplasmaschwund. Cortison-Langzeit-medikation bedingt den Befund der „Cortisonpankreatitis“ (Stumpf und Wilens, 1955; Bencosme und Lazarus, 1956; Carone und Liebow, 1957; Wanke und Horeyseek, 1970); morphologisch ist das Bild der lipolytischen Pankreatitis (Wanke, 1966, 1968) gegeben, wobei eine direkte Relation zwischen Lipasegehalt, Adiposität und Ausdehnung der Pankreasschädigungen zu konkretisieren ist.

Weitere biochemische Untersuchungen ergaben einen regelmäßigen Anstieg der Serumamylase (Stumpf et al., 1956; Challis et al., 1957; Gülzow, 1960), dem eine deutliche Hemmung der Saft- und Amylasesekretion in den Darm unter

Sekretin- oder Sekretin-Mecholytreiz nach parenteral verabreichten Glucocorticoiden gegenübersteht (Pfeffer und Hinton, 1956; Dreiling et al., 1958; Gülzow, 1960). Diesem Geschehen parallel laufend, kommt es zu einem Anstieg der Neutralfette im Blut (Stumpf et al., 1956; Nelp, 1961; Meyer et al., 1965).

Durch bilaterale Adrenalectomie oder Hypophysektomie gelang es, einen näheren Einblick in die Wechselbeziehungen zwischen Pankreas und Nebenniere zu gewinnen (Feher et al., 1958; Sesso und Migliorini, 1959; Gülzow et al., 1960; Nishikawara et al., 1964; Wanke und Nagel, 1968).

Neuere Untersuchungen machen es somit wahrscheinlich, daß das Pankreas nach Cortisonmedikation mit Enzymen und Proenzymen angereichert wird, eine latente Enzymentgleisung vorliegt und eine Behinderung der canaliculären Sekretion gegeben ist (Feigelson und Feigelson, 1964; Nichol und Rosen, 1964; Schinke et al., 1964; Wanke und Horeysek, 1970). Danach handelt es sich bei der „Cortisonpankreatitis“ um eine *Modell-Erkrankung*, die im weitesten Sinne auf die Gegebenheiten beim Menschen übertragen werden kann.

Unter Verwendung von ^3H -DL-Alanin als „Enzymvorläufer“ sollte versucht werden, die Wirkung des Cortison auf die Enzymbildung nach bilateraler Adrenalectomie und einmaliger Cortisonmedikation näher zu analysieren.

Material und Methode

Die Versuche wurden an 90 (70 adrenalectomiert, 20 Kontrollen) männlichen, 180–200 g schweren Wistar-Ratten durchgeführt; einfache Laboratoriumskost (Altromin) und Wasser ad libitum; Einzelkäfige; Bildung von drei Versuchs- und einer Kontrollgruppe.

Gruppe I. 15 Ratten, männlich, 200 g Durchschnittsgewicht, 10 Tage nach bilateraler Adrenalectomie und 12stündiger Nahrungskarenz 2,5 mg/100 g Körpergewicht 17-Hydroxy-11-dehydro-corticosteron-acetat¹ intraperitoneal injiziert; 4 Std später unter Barbituratnarkose Entnahme der lebensfrischen Pankreata. Bauchspeicheldrüsen halbiert, in flüssiger Luft sofort tiefgefroren und jeweils für den Trypsinnachweis und die feingewebliche Untersuchung bestimmt.

Gruppe II. 15 Ratten, männlich, 190 g Durchschnittsgewicht. 10 Tage nach bilateraler Adrenalectomie und 12stündiger Nahrungskarenz 2,5 mg/100 g Körpergewicht 17-Hydroxy-11-dehydro-corticosteron-acetat¹ intraperitoneal injiziert und 2 Std später 250 μCi ^3H -DL-Alanin (Radiochemical Centre Amersham/England) in 0,5 ml H_2O dest. steril. pro Tier intraperitoneal injiziert. 4 Std nach Steroidinjektion weiteres Vorgehen wie in Gruppe I.

Gruppe III. 40 Ratten, männlich, 180 g Durchschnittsgewicht. 10 Tage nach bilateraler Adrenalectomie und 12stündiger Nahrungskarenz bei 25 Tieren unter Barbituratnarkose Entnahme des lebensfrischen Pankreas und Vorgehen wie in Gruppe I. 15 Tieren 2 Std vor Pankreasentnahme 250 μCi ^3H -DL-Alanin in 0,5 ml H_2O dest. steril. pro Tier intraperitoneal injiziert. Weiteres Vorgehen wie in Gruppe I.

Kontrolle. 20 Ratten, männlich, 180 g Durchschnittsgewicht unter entsprechenden Bedingungen 10 Tage gehalten; nach 12stündiger Nahrungskarenz unter Barbituratnarkose Entnahme des lebensfrischen Pankreas und Einfrieren in flüssiger Luft.

Behandlung des Pankreasgewebes wie folgt. a) Histologische Aufarbeitung: jeweils die eine Gewebshälfte wurde im weiteren formalinfixiert und über die aufsteigende Alkoholreihe entwässert und in Paraplast eingebettet. 5 μ Stufenschnitte wurden mit HE sowie nach Masson-Goldner gefärbt.

b) Bestimmung des Trypsingehaltes im Pankreasgewebe²:

1. 5%ige Pankreas-homogenate in 0,1 M Tris-Puffer, pH 7,8 (enthaltend 0,025 CaCl_2).

1 Cortison CIBA®.

2 Herrn Priv.-Doz. Dr. W. Nagel, Chefarzt des Zentrallabors Pforzheim, danken wir an dieser Stelle verbindlichst für die erwiesene Hilfe bei Durchführung der Trypsinbestimmung.

2. Enteropeptidase³ 1 mg/ml im gleichen Puffer.
3. Gleiche Volumina 5%iges Homogenat und Enteropeptidaselösung werden vermischt und für 60 min bei 30° C inkubiert (vollständige Aktivierung von Trypsinogen nach 60 min erreicht; bei längerer Inkubationszeit nahm die Trypsinaktivität — wohl infolge Autolyse — wieder ab). Danach wurden dem Ansatz 0,5 ml entnommen und auf 10 ml mit dem angegebenen Puffer verdünnt.
4. 0,5 ml des so verdünnten Homogenates wurden zur Trypsinbestimmung eingesetzt: 0,5 ml verdünntes Homogenat werden mit 0,5 ml des oben angegebenen Tris-Puffers vermischt. Nach Ansatz von 0,1 ml der Substratlösung (= 121,75 mg N-benzoyl-arginin-p-nitroanilid in 5 ml wasserfreiem Dimethylformamid) erfolgt die Inkubation bei 30° C für 15 min. Die Unterbrechung der Reaktion geschieht durch Zusatz von 2 ml 40%iger Trichloressigsäure. Vom Filtrat wird 1 ml entnommen und dann die Diazotierung und Koppelung nach Bratton und Marshall (1939) durchgeführt; danach bildet sich ein roter Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum von 550 nm.
5. Die photometrische Bestimmung erfolgte im Elko III (Zeiss), Filter S 55 E (Hg 546 nm), Schichtdicke 0,5 cm. Die Messung erfolgte gegen einen gleich behandelten Standard, bei dem das aktivierte Pankreashomogenat direkt in Trichloressigsäure gegeben wurde; dann erfolgte der Zusatz von Substrat wie in dem eigentlichen Meßansatz. Die Eichung der Methode erfolgte mit kristallinem Trypsin nach der von Nagel et al. (1965) angegebenen Methode.
6. Die erhaltenen Extinktionswerte wurden auf mg Trypsin pro g Pankreasfeuchtgewicht umgerechnet.

Von sämtlichen Ergebnissen der verschiedenen Gruppen wurden der durchschnittliche Trypsingehalt des Pankreas und die Standardabweichung ermittelt.

c) Ein Teil der unter a) gewonnenen Schnitte wurde zu Autoradiogrammen verarbeitet. *Autoradiographie*: Kodak autoradiographie stripping plates AR 10 London. Exposition der Präparate 125 Tage bei 4° C. Die Kornzählung erfolgte bei Ölimmersion (800:1). In Anlehnung an die Methode von Citoler et al. (1966) wurden in 50 Planquadraten (40:40 μ) Silberkornzählungen durchgeführt und folgende Größen bestimmt:

1. Mittlere Korndichte pro Planquadrat über den Acinuskomplexen ohne Differenzierung zwischen Kern und Cytoplasma.
2. Mittlere Kornzahl pro Acinuszellkern.
3. Mittlere Zahl der Silberkörner über allen Acinuszellkernen pro Planquadrat.
4. Die mittlere Kornzahl pro Planquadrat über dem gesamten Cytoplasma der Acini und
5. Nulleffekt pro Planquadrat.

Von den entsprechenden Größen wurden die Mittelwerte und die Standardabweichung ermittelt.

Befunde

a) *Histologisch*

Gruppe III. 10 Tage nach bilateraler Adrenalektomie imponiert bereits makroskopisch eine deutliche Verkleinerung des Pankreas. Feingeweblich gelangen dichtliegende, zymogenarme Acinusgruppen zur Darstellung. Arealweise ist eine ausgeprägte Vakuolisierung der Acinusepithelien gegeben. Besonders zymogenarme Lobuli lassen nur noch periinsulär zymogenhaltige Acinusepithelien erkennen. Das sog. Halo-Phänomen tritt betont hervor, während relativ zymogenreiche Lobuli eine bevorzugte Zymogenentblößung der lobulus-peripheren Acinuseinheiten — inselfern — aufweisen. Vereinzelt ist der Zellverband dissoziiert. Die Zellgrenzen sind unscharf gezeichnet (Abb. 1). Ausmaß der Vakuolisierung und Zymogengehalt verhalten sich annähernd umgekehrt proportional (Abb. 2). Insgesamt lassen sich pro Planquadrat im Vergleich zu den Kontrolltieren mehr Acinusepithelien auszählen. Je dichter der Zellverband gepackt liegt, desto deutlicher tritt das Halo-Phänomen hervor.

3 Für die großzügige Überlassung von kristallinem Trypsin und gereinigter Enteropeptidase haben wir Herrn Dr. F. H. Schmidt von der Firma Boehringer & Söhne, Mannheim, sehr zu danken.

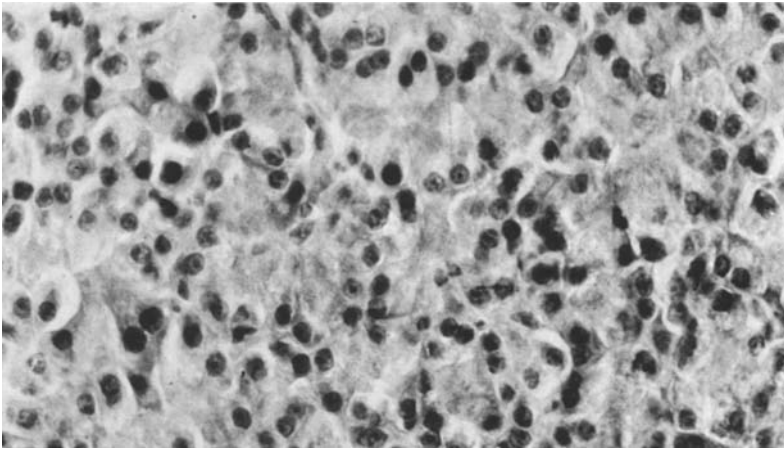


Abb. 1. Rattenpankreas 10 Tage nach doppelseitiger Adrenalectomie. Acinuszellverbände dicht beisammen liegend, zymogenarm, Zellgröße reduziert. Färbung: HE; Vergr. 600:1

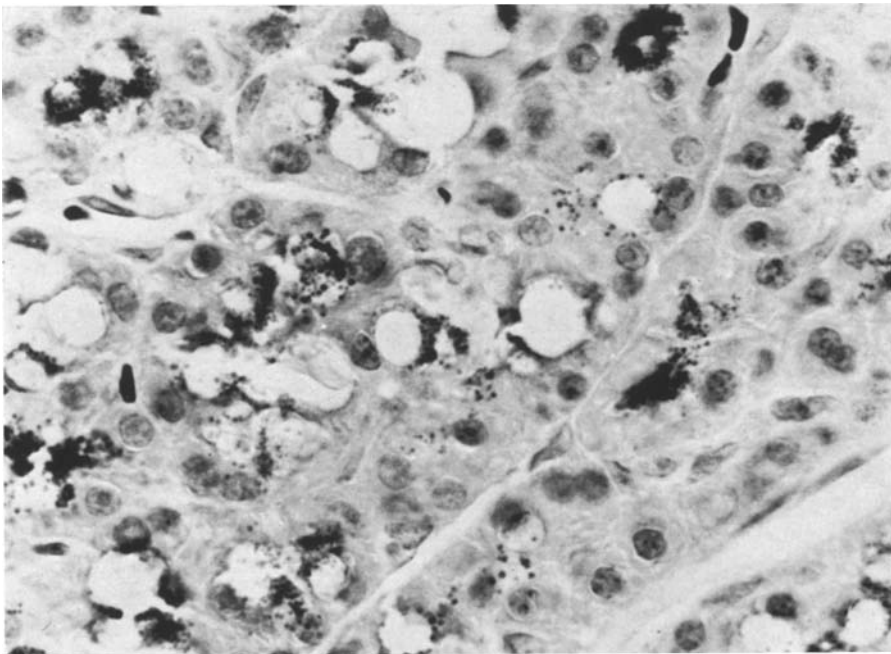


Abb. 2. Rattenpankreas 10 Tage nach doppelseitiger Adrenalectomie. Grobe Vakuolisierung einzelner Acinusepithelien, Reduktion der Zymogengranula. Färbung: nach Masson-Goldner; Vergr. 800:1

Gruppe I und II. 10 Tage nach bilateraler Adrenalectomie und 4 Std nach intraperitonealer Injektion von 2,5 mg/100 g Körpergewicht Cortison wird gegenüber den Tieren der Gruppe III eine deutliche Zunahme des Zymogengranulagehaltes nachweisbar. In verschiedenen Bezirken sind die Acinusepithelien massiv

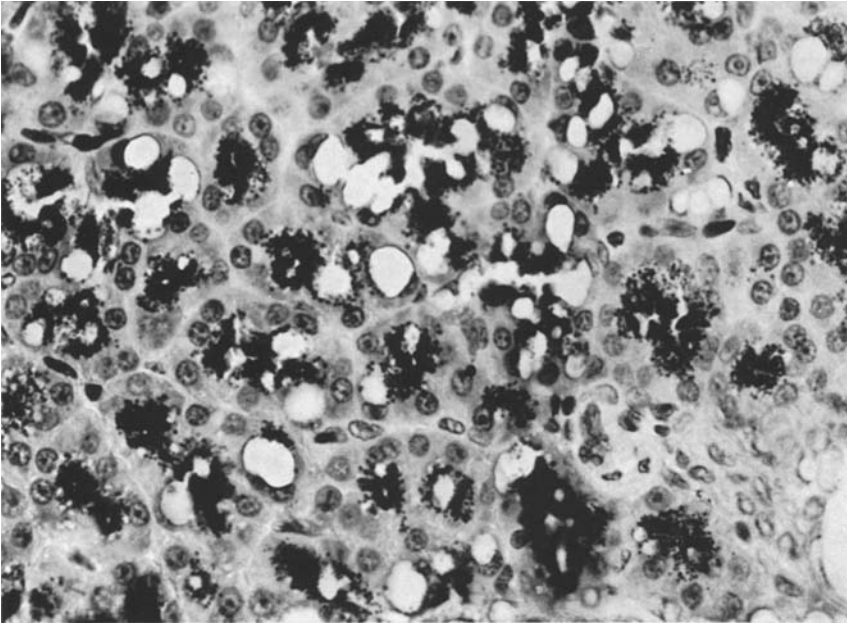


Abb. 3. Rattenpankreas 10 Tage nach doppelseitiger Adrenalectomie und einmaliger Injektion von Cortison (2,5 mg/100 g i. p.) 4 Std vor Tötung. Zwischen stark vakuolisierten Acinusverbänden Gruppen zymogenreicher Acinusepithelien. Färbung: nach Masson-Goldner; Vergr. 600:1

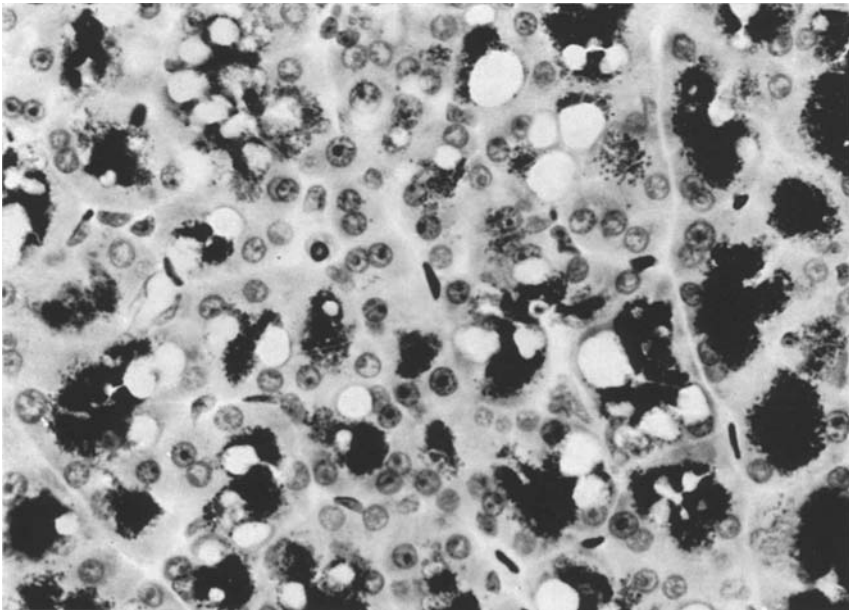


Abb. 4. Rattenpankreas 10 Tage nach doppelseitiger Adrenalectomie und einmaliger Injektion von Cortison (2,5 mg/100 g i. p.) 4 Std vor Tötung. Von links oben nach rechts unten Zunahme der Zymogenbeladung; Randbezirk eines stark vakuolisierten Acinuskomplexes. Färbung: nach Masson-Goldner; Vergr. 600:1

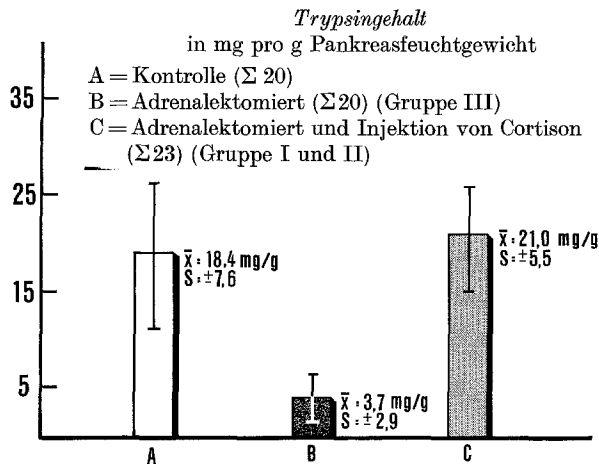


Abb. 5. Trypsingehalt (mg/g Pankreasfeuchtgewicht) im Pankreashomogenat. *A* Gesunde Kontrollen, *B* 10 Tage nach bilateraler Adrenalectomie, *C* 10 Tage nach bilateraler Adrenalectomie und 4 Std nach einmaliger Cortisoninjektion (2,5 mg/100 g Körpergewicht i. p.)

mit Zymogen „beladen“ (Abb. 3). Insbesondere in Nachbarschaft vakuolisierter Acinusepithelien findet man Gruppen zymogenreicher Acinuskomplexe (Abb. 4). Nach Cortisoninjektion tritt das Halo-Phänomen deutlich hervor, indem wiederum die periinsulären Acinuskomplexe sich bevorzugt mit Zymogen „aufladen“.

b) Trypsinbestimmung im Pankreashomogenat

Dem morphologischen Befund nach Adrenalectomie entspricht eine ausgeprägte Reduktion des Trypsingehaltes im Pankreashomogenat (Gruppe III). Verglichen mit den Kontrollen, ist der Trypsingehalt im Mittel um 80% reduziert. Demgegenüber liegen die Mittelwerte nach Adrenalectomie und folgender Cortisoninjektion für Trypsin um 12% höher als bei den Kontrolltieren (Abb. 5).

Der nach Weber modifizierte *t*-Test ergab bei Prüfung auf Signifikanz *A* (gesunde Kontrollen): *B* (adrenalectomiert) und *B*: *C* (Cortisonmedikation) jeweils einen Wert für *p* 0,01.

c) Autoradiographisch

Die Silberkornzählungen über Kern und Cytoplasma von morphologisch regelmäßigen Acinuskomplexen ergaben die in Abb. 6 wiedergegebenen Werte.

Der Null-Effekt entspricht in beiden Gruppen (II und III) einem vernachlässigbaren Wert (Abb. 6).

Die mittlere Zahl der Silberkörner über dem gesamten Cytoplasma eines Planquadrates liegt bei den mit Cortison behandelten Tieren (Gruppe II) 2 Std nach der Injektion der markierten Aminosäure nahezu um das $3\frac{1}{2}$ -fache höher als bei den adrenalectomierten Tieren ohne Cortison-Injektion (Abb. 6).

Der nach Weber modifizierte *t*-Test ergab bei Prüfung auf Signifikanz einen Wert für *p* 0,01.

Setzt man die mittlere Silberkorndichte für das Cytoplasma der Acinusepithelien bei Tieren der Gruppe II gleich 100%, so ergibt dieses Verhältnis für

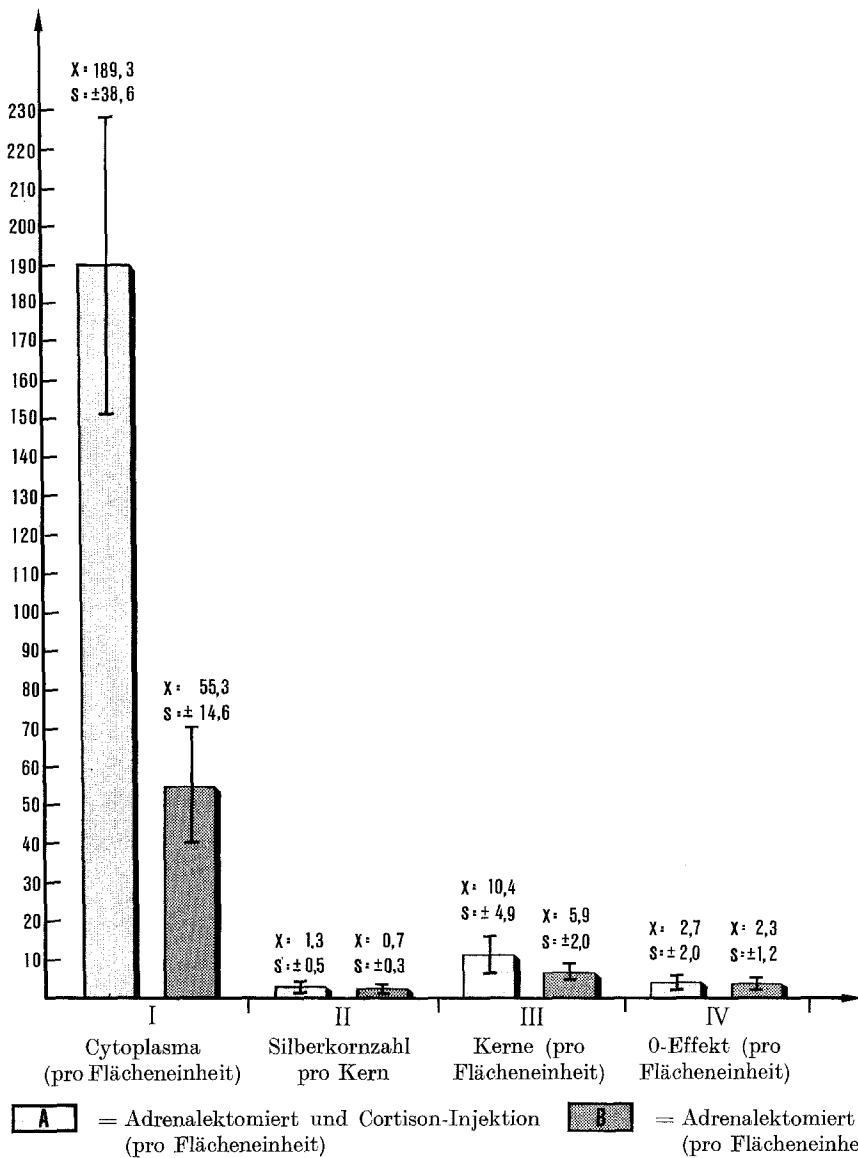


Abb. 6. Silberkornzahlen im Rattenpankreas 10 Tage nach bilateraler Adrenalektomie über Stripping-Film-Autoradiogrammen von *A* 4 Std nach einmaliger Cortisoninjektion (2,5 mg/100 g Körpergewicht i. p.) getöteten und *B* unbehandelten Tieren. Als radioaktive Substanz pro Tier 250 μCi ^3H -DL-Alanin 2 Std vor Tötung i. p. Exposition 125 Tage

die gegenübergestellte Gruppe III eine Reduktion um 71 % (vergleiche auch Abb. 5, Verhältnis des Trypsingehaltes der einzelnen Gruppen untereinander!).

Die Mittelwerte der Kornzahl pro Zellkern zeigen für beide Gruppen ein Verhältnis von annähernd 2:1 (Gruppe II:III) und sind mit $\bar{x}=1,3$ ($s=\pm 0,5$) und $\bar{x}=0,7$ ($s=\pm 0,3$) sehr gering.

Wertet man die Kornzahlen über sämtlichen Kernen eines Planquadrates ($1600 \mu^2$), so ergeben sich für die Cytoplasma-Kern-Aktivitäts-Relation bei räumlich regelloser Anordnung der Zellkerne im Gewebe Werte von 18,2 (Gruppe II) und 9,4 (Gruppe III).

Dieser Quotient der Kornzahlen über dem gesamten Cytoplasma und über allen Kernen eines Planquadrates darf gleich dem mittleren Verhältnis der ^3H -Aktivität im gesamten Cytoplasma einer Acinuszelle zur ^3H -Aktivität des ganzen Kernes der Acinuszelle gesetzt werden (Citoler et al., 1966; Schultze, 1968).

Diskussion der Befunde

Typus und Ablauf akuter Pankreatitiden werden durch die anatomisch gegebenen Wechselbeziehungen zwischen Ductus Wirsungianus und Ductus choledochus sowie durch das in den Acinusepithelien selbst angereicherte Enzymgemisch entscheidend beeinflusst (Brown et al., 1965; Mulder et al., 1965; Wanke und Nagel, 1968; Wanke und Horeysek, 1970).

Das quantitative Verhältnis der einzelnen Enzyme untereinander wird durch die Nahrung (Ben Abdeljlil, 1966; Desnuelle, 1966; Lemire und Iber, 1967; Richterich, 1961; Lindsay et al., 1948) und endokrine Faktoren wesentlich bestimmt.

Nach bilateraler Adrenalektomie resultiert bei der Ratte eine statistisch zu sichernde Atrophie des Pankreas (Sesso und Migliorini, 1959). Sie wird biochemisch durch einen Abfall des Amylase- (Gülzow et al., 1960) und Proteasenspiegels (Wanke und Nagel, 1968) verdeutlicht. Diese Enzymreduktion vermag durch Corticoidgaben weitgehend kompensiert zu werden (Feher et al., 1958, u. a.).

Die 10 Tage nach doppelseitiger Adrenalektomie deutliche Abnahme der Zymogengranula wurde unter Corticoidgaben innerhalb von 4 Std vollständig ausgeglichen. Die arealweise überschießende Phase der Zymogenproduktion spricht für eine Anreicherung des Pankreas mit Proenzymen unter Cortison. Damit dürfte über basal einströmende Aminosäuren das Zymogendefizit durch Cortisonapplikation rasch wieder ausgeglichen worden sein. Caro und Palade (1964) zeigten anhand von ^3H -Leucin als Markierungssubstanz, daß bereits 5 min nach Injektion der Tracer aus dem strömenden Blut in die Zelle aufgenommen wird und an der Oberfläche des endoplasmatischen Reticulum nachweisbar wird. Nach weiteren 15 min befindet sie sich in der Golgiregion und im Verlauf 1 Std in den Zymogengranula selbst. Danach kann unter Cortison über einen intensivierten Einstrom von Aminosäuren eine Neusynthese von Proenzymen erfolgen. Dieser lebhafte Proteinstoffwechsel kommt in den autoradiographischen Befunden durch die Cytoplasma-Kern-Aktivitäts-Relation im Verhältnis von annähernd 2:1 (Gruppe II:III) deutlich zum Ausdruck.

Nach Gülzow et al. (1960) ist die erhebliche Einschränkung der Enzymproduktion im Pankreas, die im Laufe der Nebennierenrindeninsuffizienz zunimmt und durch Cortisonsubstitution vollständig ausgeglichen werden kann, mit einer gesetzmäßigen Reaktion des Pankreas auf den Einfluß des Cortison auf den Proteinstoffwechsel zu erklären. Damit wird der Angriffspunkt in die enzymproduzierende Zelle selbst verlegt. Die Organspezifität dieser Reaktion wird durch Experimente von Baker und Abrams (1955) belegt, wonach ACTH und Cortison die Reduktion der Amylase- und Proteasenproduktion zu kompen-

sieren vermögen; danach wirkt die Hypophyse via Nebennierenrinde — insbesondere deren Zona fasciculata — stimulierend auf die Zymogenbildung des exokrinen Pankreas. Freie Corticosteroide sind im Serum von Ratten 4 Std nach Entfernung der Nebennieren nicht mehr nachweisbar (Fortier, 1959); zu diesem Zeitpunkt ist bereits eine „exkretorische Insuffizienz“ biochemisch erfaßbar.

Intensität der Hemmung oder Stimulierung einer Enzymsynthese können durch Bestimmung der Inkorporationsrate markierter Aminosäuren bestimmt werden. Die Befunde der Autoradiographie sprechen in Verbindung mit dem biochemischen Nachweis der Protease Trypsin (nach Enteropeptidase-Aktivierung) im Pankreashomogenat für die Möglichkeit, die Sekretproteine in den Proenzymen mit ^3H -DL-Alanin zu markieren, zumal bekannt ist, daß die Acinuszelle aus dem Plasma nur die einzelnen Aminosäuren aufnimmt und seine Sekretproteine selbst synthetisiert (Hirsch, 1962). Bereits 2 Std nach intraperitonealer Injektion von ^3H -DL-Alanin und 4 Std nach Cortisongabe erscheint der Tracer in den Cytoplasmaanteilen und im Zellkern, wobei die Beteiligung des Kernes bei der mit Cortison behandelten Tiergruppe nur 5,5% der Cytoplasmaaktivität beträgt. Die Kontrollen ohne Cortisongabe weisen eine Aktivität des Kernes im Vergleich zum Cytoplasma von nahezu 11% auf. Ein Zeichen dafür, daß bei diesen Tieren eine höhere Kernaktivität durch diese Versuche resultierte, wenn man die Parenchymzellen zueinander in Relation setzt.

Die Zelldichte entspricht dem Bilde der durch Adrenalektomie bedingten Alterationen des Pankreasgewebes und wird durch die kurze Cortisonwirkung nicht beeinflusst. Entsprechend spiegeln die Silberkornzahlen pro Zellkern das erwähnte Verhältnis der Einbauraten in das Caryoplasma pro Flächeneinheit wider (Lit. Schultze, 1968). Die Cytoplasmaaktivitäten sind demgegenüber absolut dominierend und bieten ein prägnantes Kriterium zur Beurteilung der Eiweißeinbaurate.

Eine Untersuchung der aus kondensierten Vacuolen gebildeten Zymogengranula (fraktioniert gewonnen) nach ^{14}C -Leucin-Markierung ergibt eine stetig zunehmende Ansammlung radioaktiver Proteine in dieser Fraktion (Jamieson und Palade, 1967).

Der Weg der Sekretproteine von den Zisternen des endoplasmatischen Reticulum zu den kondensierten Vacuolen des Golgikomplexes weist darauf hin, daß eine Beteiligung des Zellkerns an der Eiweißsynthese gering ist (s. dagegen ältere Lit. bei V. Becker, 1957). Die annähernd doppelt so hohe Kernaktivität bei den unbehandelten, indessen adrenalektomierten Tieren könnte dafür sprechen, daß die infolge Cortisonmangel eintretende Störung im Proteinstoffwechsel der Acinuszelle zunächst durch eine erhöhte Kernaktivität partiell kompensiert wird und die Aufrechterhaltung eines mäßigen Enzymcyclus gewährleistet bleibt. Der Weg markierter Aminosäuren von der Zellbasis bis zum apikalen Zellpol (Zymogengranula) wird von Ghiara (1962), Palade et al. (1962) sowie Caro und Palade (1964) entsprechend angegeben.

Die autoradiographischen Ergebnisse weisen darauf hin, daß eine Beteiligung des Zellkerns an der Produktion von Enzymeiweiß von untergeordneter Bedeutung ist. Unsere in Tabelle 6 niedergelegten Befunde lassen den Schluß zu, daß nach Cortisonsubstitution adrenalektomierter Ratten eine signifikant erhöhte Aminosäureaktivität ($3\frac{1}{2}$ fach) im Cytoplasma der Acinuszelle gegenüber den adrenalektomierten, nicht-substituierten Tieren resultiert. Die Erhöhung der

Cytoplasma-Kern-Aktivitäts-Relation um etwa das Doppelte bei Gruppe II gegenüber III kann unter der Voraussetzung einer unmittelbaren Proportionalität zur Größe der Eiweißsynthese in der Zelle als eine gesteigerte Neubildung von Enzymeiweißen unter den gegebenen Versuchsbedingungen gewertet werden. Setzt man die Cytoplasma-Kern-Aktivitäts-Relation zwischen Gruppe II und III als Maß für die Synthese von Enzymeiweiß und die Cytoplasmaaktivität der lebhaften Einbaurate in der Acinuszelle gleich, so ist ein signifikanter Einfluß des Cortison auf die Neusynthese von Enzymen erkennbar. Diese Überlegungen sind — strenggenommen — nur erlaubt, wenn gesichert ist, daß bei beiden Tiergruppen die mittlere spezifische Aktivität (s mittel) des DL-Alanin am Ort des Einbaues gleich groß ist (Lit. Schultze, 1968). Die direkte Bestimmung dieser Größe ist indessen im Pankreas kaum durchführbar und die indirekte nach der Methode von Müller und Maurer (1965) bei unseren Versuchen nicht möglich, da die übrigen großen parenchymatösen Organe unter Cortison ähnliche Eiweißstoffwechseländerungen erfahren wie das Pankreas. Da morphologische, biochemische und autoradiographische Befunde indessen einander entsprechen, halten wir es für legitim, die Ergebnisse der Silberkornzählungen wie dargelegt zu interpretieren.

Die Intensivierung der Cytoplasmaaktivität spricht für einen induktiven Effekt des Cortison auf den Cyclus des Cytoplasmastoffwechsels bei mäßiger Kernbeteiligung. Damit kommt den Steroiden ein regulatorischer Funktionsmechanismus bezüglich des aktuellen Enzympool der Acinuszelle zu.

Der Umfang des Eiweißstoffwechsels verschiedener Zellarten des Organismus weist darauf hin, daß markierte Aminosäuren unabhängig von ihrer chemischen Beschaffenheit die gleiche relative Einbaurate in das Zelleiweiß gesunder Tiere besitzen (Citoler et al., 1966); dabei ist die Syntheserate im gesamten Cytoplasma einer Zelle um einen nahezu konstanten Faktor größer als im Kern. Die relative Einbaurate markierter Aminosäuren ist im Pankreas am höchsten und ergibt bereits 60 min nach Verabreichung verschiedener ^3H -Aminosäuren eine intensive Korndichte im Bereich der apikal gelegenen Zymogengranula. Nichol und Rosen (1964) nehmen an, daß aus der Abhängigkeit vom Plasmaspiegel, der Aktivierungsrate von Aminosäuren und Zusammenspiel zwischen Ribosomen und Transfer-RNS eine Freigabe der Messenger-RNS resultieren kann.

Die Erhöhung der RNS und Proteinsynthese nach Steroidverabreichung soll sekundär auf eine initiale Induktion der Proteinsynthese folgen (Dingmann und Sporn, 1965); dabei ist eine positive Beziehung zwischen RNS-Gehalt des Zellkerns und seiner Kapazität, RNS zu synthetisieren, gegeben. Die Beziehung zu einem signifikanten Abfall im RNS/DNS-Verhältnis des Zellkerns als physiologische Zwischenaktion nach Cortisonapplikation wird dabei zur Diskussion gestellt. Die durch Corticosteroide hervorgerufene Induktion der Enzymsynthese wird überwiegend auf eine beschleunigte Bildung von Messenger-RNS zurückgeführt (Feigelson und Feigelson, 1964; Nichol und Rosen, 1964), während die Hemmung im metabolischen Ablauf als „feed-back“-Hemmung bezeichnet wird, in deren Ablauf eine Akkumulation eines Syntheseprodukts seine eigene Bildung zu begrenzen vermag.

Ungeklärt ist, warum Cortison in dem einen Fall die Enzymsynthese induziert oder intensiviert und auf der anderen Seite bestimmte Enzyme in ihren Bindungs-

phasen zu blockieren vermag. Im Falle der Induktion bieten adrenaletomierte Tiere eine gesteigerte Rückantwort.

Cortison verursacht eine weitgehende Hemmung der Inkorporationsrate von ^{14}C -Glycin in die RNS des Thymus und der Milz, während das Hormon den Einbau des Tracer in die Leber-RNS signifikant stimuliert (Feigelson und Feigelson, 1964). Die entsprechenden, indessen geringeren Effekte von Cortison zeigten sich hinsichtlich des Proteinmetabolismus. Erhöht war die Einbaurate ebenso in die Mikrosomen, den Zellkern, die Mitochondrien und weitere subcelluläre Fraktionen der Hepatocyten; Cortison verursachte weiterhin einen deutlichen Anstieg des ATP-Spiegels. Damit ist die Möglichkeit einer Regulation der Rate des makromolekularen Metabolismus mittels der Kontrolle dieser ATP-Aktivität zu erwägen.

Die parallelen Größenverhältnisse der Einbauraten von ^3H -DL-Alanin und des Trypsingehaltes im Rattenpankreashomogenat nach Enteropeptidaseaktivierung zwischen adrenaletomierten-unbehandelten und adrenaletomierten-cortisonbehandelten Tieren zeigen eine klare Einflußnahme des Cortison auf die intracellulären Phasen der Proteinsynthese und Proenzymbildung. Wählt man als Basis der Beurteilung die Cytoplasmaaktivität in Relation zur Aminosäureinkorporation im Zellkern, liegt die Gesamtleistung dieser „Arbeitsgänge“ vorzugsweise im Cytoplasma. Die Cytoplasma-Kern-Aktivitäts-Relation spiegelt die Induktion und Steigerung der Enzymsynthese unter Cortisonapplikation wider. Damit haben die Untersuchungen ergeben, daß dem Cortison ein regulatorischer Einfluß auf die Einbaurate von Aminosäuren und Synthese zu Enzymeiweißen im Pankreas im Sinne der Steigerung zugeschrieben werden kann.

Literatur

- Baker, B. L., Abrams, G. D.: Effect of hypophysectomy on cytology of fundic glands of stomach and on secretion of pepsin. *Amer. J. Physiol.* **177**, 409—412 (1954).
- Becker, V.: Sekretionsstudien am Pankreas. Stuttgart: Thieme 1957.
- Ben Abdeljlil, A.: Adaption of the enzymes of exocrine pancreas in response to alimentary and hormonal stimuli. *Gut* **7**, 298 (1966).
- Bencosme, S. A., Lazarus, S. S.: The pancreas of cortisone-treated rabbits. A pathogenetic study. *Arch. Path.* **62**, 285—295 (1956).
- Bratton, A. C., Marschall, K. E.: A new coupling component for sulfanil-amide determination. *J. biol. Chem.* **128**, 537—550 (1939).
- Brown, R. A., Hodges, D., Thompson, A. G.: The role of zymogen granules and storage enzymes in experimental hemorrhagic pancreatitis. *Surg. forum* **16**, 377—379 (1965).
- Caro, L. G., Palade, G. E.: Protein synthesis, storage and discharge in the pancreatic exocrine cell. An autoradiographic study. *J. Cell Biol.* **20**, 473—495 (1964).
- Carone, F. A., Liebow, A. A.: Acute pancreatic lesions in patients treated with ACTH and adrenal corticoids. *New Engl. J. Med.* **257**, 690—697 (1957).
- Challist, T. W., Davis, D. A., Wahl, O. A., Hinton, J. W.: Clinical and experimental studies to determine the role of the pancreas in serum amylase formation. *Amer. Surg.* **23**, 43—49 (1957).
- Citoler, P., Citoler, K., Hempel, K., Schultze, B., Maurer, W.: Autoradiographische Untersuchungen mit zwölf ^3H - und fünf ^{14}C -markierten Aminosäuren zur Größe des nucleären und cytoplasmatischen Eiweißstoffwechsels bei verschiedenen Zellarten von Maus und Ratte. *Z. Zellforsch.* **70**, 419—448 (1966).
- Degenhardt, G., Hübener, H. J., Alester, L.: Über den Wirkungsmechanismus der Glucocorticoide. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **323**, 278—284 (1961).
- Desnuelle, P.: Adaption of the enzymes of exocrine pancreas in terms of biosynthesis. *Gut* **7**, 298 (1966).

- Dingman, C. W., Sporn, M. B.: Actinomycin D and hydrocortisone: intracellular binding in rat liver. *Science* **149**, 1251—1254 (1965).
- Doerr, W.: Pankreatitis, Pathogenese, Formen, Häufigkeit. *Langenbecks Arch. klin. Chir.* **292**, 552—588 (1959).
- Pathogenese der akuten und chronischen Pankreatitis. *Verh. dtsch. Ges. inn. Med.* **70**, 718—758 (1964).
- Dreiling, D. A., Janowitz, H. D., Rolbin, H.: Effect of ACTH and adrenocortical steroids on external pancreatic secretion in man. *New Engl. J. Med.* **258**, 603—605 (1958).
- Eisenstein, A. B.: Effect of cortisol on liver phosphorylase activity. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **109**, 839—843 (1962).
- Evans, G. T.: Zit. nach Feigelson und Feigelson.
- Feher, J., Döklen, A., Kertai, P.: The effect of cortisone and DOCA on pancreatic amylase production. *Exp. Med. Surg.* **16**, 277—282 (1958).
- Feigelson, P., Feigelson, M.: Studies on the mechanism of cortisone action. In: Litwack, G., D. Kritchevsky, Action of hormones on molecular progresses, p. 218—233. New York-London-Sydney: Wiley & Sons 1964.
- Fortier, C.: Pituitary ACTH and plasma free corticosteroids following bilateral adrenalectomy in the rat. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **100**, 13—16 (1959).
- Gabourel, J. D., Fox, K. E.: Effect of hydrocortisone on the rise of rat thymus polysomes. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **18**, 81—86 (1965).
- Ghiara, G.: Attiva di sinesti proteica e costituzione di granuli di secrezione: ricerche autoradiografiche e di microscopia elettronica sul pancreas esocrino. *Boll. Zool.* **29**, 73 (1962).
- Gülzow, M.: Treatment of pancreatitis with corticosteroids. Pankreatitis caused by corticosteroid treatment. *Dtsch. Z. Verdau.- u. Stoffwechselkr.* **20**, 168—180 (1960).
- Trettin, H. J., Divok, K.: Wirkung der Adrenalektomie auf die exkretorische Pankreasfunktion. *Z. ges. exp. Med.* **134**, 95—108 (1960).
- Hirsch, G. C.: Konstruktion und adaptative Umkonstruktion in den Zellen des exokrinen Pankreas. *Mat. med. Nord.* **49**, 1—39 (1964).
- Hübener, H. J.: Die physiologischen Funktionen der Nebennierenrinden-Hormone als Enzyminduktoren. *Dtsch. med. Wschr.* **87**, 438—445 (1962).
- Jamieson, J. D., Palade, G. E.: Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell. II. Transport to condensing vacuoles and zymogen granules. *J. Cell Biol.* **34**, 597—615 (1967).
- Lahmann, H.: Untersuchungen über die Einbaurate von Enzymeiweißen in das Rattenpankreas nach Adrenalektomie unter Cortison. Inaugural-Dissertation, Heidelberg 1969.
- Lemire, S., Iber, F. L.: Pancreatic secretion in rats with protein malnutrition. *John Hopkins Med. J.* **120**, 21 (1967).
- Lindsay, S. C., Entenman, C., Chaikoff, I. L.: Pancreatitis accompanying hepatic disease in dogs fed a high fat, low protein diet. *Arch. Path.* **45**, 635—638 (1948).
- Long, C. N. H., Katzin, B., Fry, E. G.: Zit. nach Feigelson und Feigelson.
- Meyer, F., Bosch, J. van den, Byers, S. O., George, S. S.: Effects of cortisone on lipid and cholesterol metabolism in the rabbit and rat. *Amer. J. Physiol.* **208**, 94 (1965).
- Mulder, S., Brown, R. A., Thompson, A. G., Gurt, F. N.: Acute hypotension in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Surg. Forum.* **16**, 380—382 (1965).
- Müller, D., Maurer, W.: Autoradiographische Untersuchung über den Eiweißstoffwechsel der Niere bei der Ratte nach Nephrektomie. *Beitr. path. Anat.* **131**, 121—136 (1965).
- Nagel, W., Willig, F., Peschke, W., Schmidt, F. H.: Über die Bestimmung von Trypsin und Chymotrypsin mit Aminosäure-p-nitroaniliden. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **340**, 1—10 (1965).
- Nelp, W. B.: Acute pancreatitis associated with steroid therapy. *Arch. intern. Med.* **108**, 702—710 (1961).
- Nichol, C. A., Rosen, F.: Adaptive changes in enzymatic activity induced by glucocorticoides. In: Litwack, G., D. Kritchevsky, Action of hormones on molecular processes, p. 234—256. New York-London-Sydney: Wiley & Sons 1964.
- Nisihikawara, M. T., Hawkins, R. D., Haist, R. E.: The effect of ACTH, cortisone, desoxycorticosterone and ACTH plus thyroid on the amylolytic activity of the pancreas in hypophysectomized and intact rats. *Canad. J. Physiol. Pharmacol.* **42**, 65—73 (1964).

- Palade, G. E., Siekevitz, P., Caro, L. G.: Structure, chemistry and function of the pancreatic exocrine cell. In: Ciba foundation symposium on the exocrine pancreas, normal and abnormal functions, p. 23—49. London: Churchill LTD 1962.
- Pfeffer, R. B., Hinton, L. W.: Some relationship between adrenal medullary and cortical substances and exocrine function of the pancreas in man. *Gastroenterology* **31**, 746—757 (1956).
- Putzke, H. P., Nicosovics, K.: Enzymhistochemische und ultramikroskopische Untersuchungen der Wirkung von ACTH und Prednison auf die Kinetik der Bauchspeichelbildung bei der Ratte. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **107**, 414—421 (1965).
- Richterich, R.: Die Physiologie der Pankreassekretion. In: *Leber- und Pankreasenzymologie*, S. 107—119, Hrsg. Martini, G. G., E. Hafter. Basel: Karger 1961.
- Schimke, R. T., Sweney, E. W., Berlin, C. M.: An analysis of the kinetics of rat liver tryptophan pyrrolase induction: the significance of both enzyme synthesis and degradation. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **15**, 214—219 (1964).
- Schultze, B.: Die Orthologie und Pathologie des Nucleinsäure- und Eiweißstoffwechsels der Zelle im Autoradiogramm. In: *Handbuch der allgemeinen Pathologie*, Bd. II/5, S. 466—670. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1968.
- Segal, H. L., Beattie, D. S., Hopper, S.: Purification and properties of liver glutamic alanine transaminase from normal and corticoid-treated rats. *J. biol. Chem.* **237**, 1914—1920 (1962).
- Sesso, A., Migliorini, R.: Nucleic acid content and amylase activity in the pancreas of the rat following adrenalectomy and cortisone administration. *Acta physiol. lat. amer.* **9**, 5—12 (1959).
- Stumpf, H. H., Wilens, S. L.: Pancreatic lesions and peripancreatic fat necrosis in cortisone-treated rabbits. *Amer. J. Path.* **31**, 563 (1955).
- — Somoza, J. G.: Pancreatic lesions and peripancreatic fat necrosis in cortisone-treated rabbits. *J. Lab. Invest.* **5**, 224—235 (1956).
- Tomkins, G. M., Yielding, K. L.: Action of steroid hormones on glutamic dehydrogenase. In: Litwack, G., D. Kritchevsky, Action of hormones on molecular processes, p. 209—217. New York-London-Sydney: Wiley & Sons 1964.
- Trémolières, J., Derache, R., Griffaton, G.: Effects de la cortisone sur la synthèse des protéines hépatiques. *Ann. Endocr. (Paris)* **15**, 694—707 (1954).
- Volk, B. W., Lazarus, S. S.: Rabbit pancreas in protein malnutrition (experimental kwashiorkor) and after cortisone administration. *Amer. J. Path.* **37**, 121—135 (1960).
- — Protection by cortisone pretreatment against alloxan diabetes. *Arch. Path.* **73**, 363—370 (1962).
- — Ultramicroscopic studies of rabbit pancreas during cortisone treatment. *Diabetes* **12**, 162—173 (1963).
- Wanke, M.: Pathologico-anatomical results with acute pancreatitis. The proceedings of the 3rd world congr. of Gastroenterology, Tokyo 1966, vol. IV, p. 335—339. Tokyo 1967.
- Experimentelle Pankreatitis. Proteolytische, lipolytische und biliäre Form. Stuttgart: Thieme 1968.
- Experimental acute pancreatitis. In: *Current topics in pathology*, vol. 52, p. 64—142. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1970.
- Horeysek, G.: Beziehungen zwischen Nebennierenrinde und lipolytischer Pankreatitis. Demonstriert am Modell der „Cortisonpankreatitis“. *Z. Gastroent.* **8**, 86—95 (1970).
- Nagel, W.: Degranulierung des exkretorischen Pankreas und autodigestive Pankreatitis. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **52**, 311—316 (1968).
- Willig, F.: Formen experimenteller Pankreatitis. Pathoanatomisch gesehen. Frankfurt. *Z. Path.* **75**, 207—227 (1966).
- White, A.: Zit. bei Feigelson und Feigelson.

Priv.-Doz. Dr. M. Wanke
 Priv.-Doz. Dr. K. Wegener
 Pathologisches Institut der Universität Heidelberg
 D-6900 Heidelberg, Berliner Straße 5