

Zur vergleichenden Pathologie der Frühformen der Aortensklerose

W. HOFMANN

Staatliches Tierärztliches Untersuchungsamt Heidelberg
(Leiter: Reg.-Vet. Dir. Priv.-Doz. Dr. J. Nassal)

Eingegangen am 30. November 1970

Comparative Pathology of the Early Forms of Arteriosclerosis

Summary. Human, calf, chicken, and pig aortas (ten each) were examined histologically, histochemically, and chromatographically. It was shown that as arteriosclerosis begins to develop the so-called intimal edema is either free of fat or almost free of fat. That means the fat-free intimal edema is able to induce the arteriosclerotic changes, which develop later take place.

Zusammenfassung. Es wurden 10 Aorten von Mensch, Kalb, Huhn und Schwein histologisch, histochemisch und chromatographisch untersucht. Dabei ließ sich zeigen, daß im Anfang der Entwicklung einer Arteriosklerose das sog. Intimaödem fettfrei oder weitgehend fettfrei ist. Auch das fettfreie Ödem der Intima ist geeignet, diejenigen Veränderungen einzuleiten, welche auf den arteriosklerotischen Wandumbau hinauslaufen.

Die von Doerr aufgestellte Perfusionstheorie der Arteriosklerose beinhaltet, daß unter bestimmten Bedingungen ein Flüssigkeitsstrom vom Herzen zur Kreislauf-peripherie und zugleich auch von der Intima zur Adventitia erfolgt. Eine Sklerose der Gefäßwand kann dadurch entstehen, daß der „Transit“ des „Sickerwassers“ gestört oder behindert wird. Die Perfusionstheorie will damit einen Elementarvorgang herausstellen, der die Biorheuse der Arterienwände beherrscht. Je nach der stofflichen Zusammensetzung des zur Einsickerung gebrachten „Blutwassers“, je nach der physikalischen Belastung der inneren Gefäßwandoberfläche, je nach dem Zustand des Eigenstoffwechsels der in der Arterienwand angesiedelten organischen Strukturen, schließlich und naturgemäß auch abhängig von der Unversehrtheit der venolären Vasa vasorum sowie der adventitiellen Lymphbahnen resultieren sehr verschiedene Umbauvorgänge. All deren Folgezustände nennt man „Sklerose“. Die Doerr'sche These will nur *ein* Prinzip herausstellen; sie läßt alle anderen pathogenetischen Möglichkeiten unberührt. Sie impliziert damit, daß es durchaus verschiedene Formen dessen geben muß, was man Arteriosklerose nennen kann. Seit den Arbeiten der älteren russischen Schule (Ignatowski, 1909; Anitschkow, 1913, 1914) spielt die mutmaßliche pathogenetische Leistung infiltrierter Fettstoffe eine außerordentliche Rolle. Aus diesem Grunde soll in vorliegender Studie eine vergleichende Untersuchung bei Mensch und Tier über die Reichlichkeit der Fettausstattung des anfänglichen Intimaödemes vorgelegt werden, besonders auch im Hinblick auf die Tatsache, daß dieses Intimaödem im Anfangsstadium der Umbauten der Aortenwände steht.

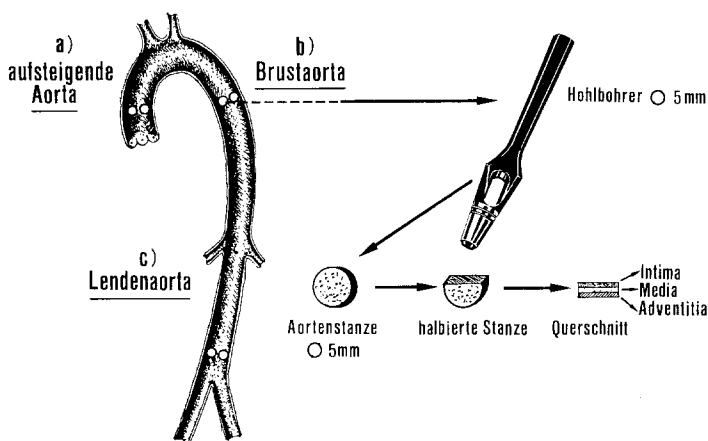


Abb. 1. Herstellung von Aortenstanzen mit Hilfe eines Hohlbohrers für chromatographische und histologische Untersuchungen

Material und Methodik

Es wurden je 10 Aorten von *Menschen* im Alter von 1 Woche bis 73 Jahren, von *Kälbern* im Alter von 8—12 Wochen, von *Hühnern* im Alter von 5—18 Monaten und von *Schweinen* im Alter von 6 Monaten bis 5 Jahren untersucht. Von aufsteigender Brust- und Lendenaorta wurden mit Hilfe eines Hohlbohrers von 5 mm Durchmesser (Breitenecker und Holczabek, 1966) je dreimal 2 zylindrische Stanzen entnommen, in 10%igem Formalin fixiert und als Gefrierschnitte histologisch, histochemisch und chromatographisch aufbereitet (Abb. 1). Schließlich wurden die ganzen Aorten nach den Angaben von Hueck (1939), Linzbach (1957) und Doerr (1963 und 1964) eingerollt und total geschnitten. Der Lipidnachweis wurde durch folgende histochemische Reaktionen zu erbringen versucht:

1. Sudan III.
2. Cholesterinreaktion nach Schultz.
3. Phosphatid-Darstellung nach Baker mit Hilfe einer 5%igen Cr_2O_5 -Chromierung.
4. Benzpyren-Coffein-Methode nach Berg.
5. UV-Schiff-Reaktion nach Belt und Hayes zum Nachweis ungesättigter Fette.

Die 10 μ starken Gefrierschnitte wurden der Weigertschen Elastikafärbung und der Einschlußfärberei mit 0,03%igem Toluidinblau zur Darstellung der sauren Mucopolysaccharide unterzogen.

Die Dünnschichtchromatographie erfolgte nach Breitenecker und Holczabek (1966) an 15—20 μ dicken Gefrierschnitten, die aus den halbierten Stanzen hergestellt wurden (Abb. 1). Es standen für histochemische, histologische und chromatographische Untersuchungen stets korrespondierende Stellen zur Verfügung. Die Lipide wurden chromatographisch unter Verwendung von DC-Fertigplatten Kieselgel 20 \times 20 mm der Firma Merck, Schichtdicke 0,2 mm, nach folgendem Verfahren getrennt:

1. Aktivierung der Platten 30 min im Trockenschrank bei 105°C.
2. Herstellung kleiner rechteckiger Aussparungen auf der Startlinie.
3. Aufbringen der Gefrierschnitte in die Aussparungen und Überdecken der Schnitte mit einer Kieselgelaufschwemmung, nivellieren, lufttrocknen lassen.
4. Einbringen der Platten in äquilibrierte Trockenkammer (Fließmittel 45 ml Petroläther, 55—75°C und 5 ml Methyl-Äthylketon) ca. 25—30 min; Steighöhe des Lösungsmittels 14—15 cm.
5. Trocknen der Platten 15 min bei 50°C im Brutschrank.

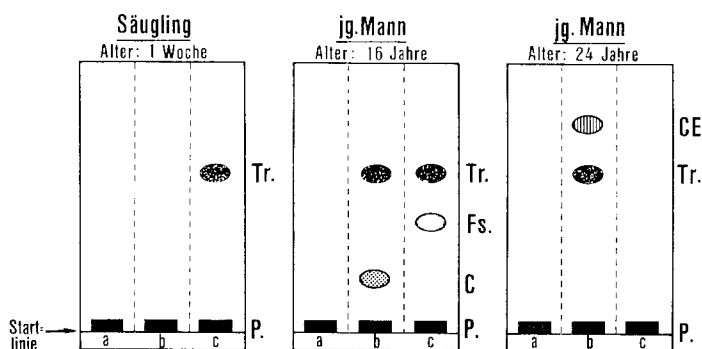


Abb. 2. Chromatographische Trennung von Lipiden in Gewebeschnitten von aufsteigender Brust- und Lendenaorta beim Menschen. Abkürzungen für Abb. 1 und 2. *a* Aufsteigende Aorta, *b* Brustaorta, *c* Lendenaorta, *P* Phospholipide, *C* Cholesterin, *Fs* freie Fettsäuren, *Tr* Triglyceride, *CE* Cholesterinester

6. Besprühen der Platten mit Bromthymolblau (40 mg in 100 ml 1/100 nNaOH) aus 70 cm Entfernung.

7. Markieren der Fraktionen sofort nach dem Besprühen mit einer Nadel¹.

Ergebnisse

a) Mensch. An allen menschlichen Aorten (aufsteigende Aorta, Brust- und Lendenaorta) ist ein mehr oder weniger ausgeprägtes Ödem anzutreffen. Es liegt entweder in der Intima oder aber an der Intima-Mediagrenze. Der sog. Mesenchym-schwamm ist aufgelockert. Die innere elastische Grenzlamelle zeigt an manchen Stellen eine feine Aufsplitterung. „Amputationsstümpfe“ elastischer Mediaplatten sind nur vereinzelt nachzuweisen. Bemerkenswert ist eine schwache Auflockerung der Intimastrukturen bei einem 8 Tage alten Säugling sowie ein incipientes Ödem in der Intima bei einem 16- und einem 24jährigen jungen Manne. Ausgehend von den Ergebnissen der Dünnschichtchromatographie sind paradigmatisch in den 3 jugendlichen Aorten (1 Woche, 16, 24 Jahre) folgende Lipide vorhanden (s. Abb. 2).

Beim Säugling zeigt nur die Lendenaorta eine geringe Fraktion an Triglyceriden. Mit Hilfe einer kolloidalen Sudan III-Färbung lassen sich nur in der Adventitia traubig aussehende Fett-Tröpfchen lokalisieren. Hingegen liegen bei dem 16- und dem 24jährigen Manne Spuren von Fett in der Intima sowohl der Brust- als der Lendenaorta. Sie sind mit Sudan III als feindisperse Tröpfchen in ganz geringen Mengen sichtbar zu machen; offenbar handelt es sich um Triglyceride (s. Abb. 3).

Cholesterin findet man mit dem Schultzschen Nachweis in der Intima als tiefblaugrüne Partikel nur bei dem 24jährigen bzw. bei allen älteren Personen. Dagegen sind beim Säugling sowie bei dem 16jährigen Jungen keine cholesterinhaltigen Lipide nachzuweisen. Die UV Schiff-Reaktion nach Belt und Hayes zum Nachweis ungesättigter Fette verläuft im Gegensatz zu den Ergebnissen der Chromatographie in allen 3 Fällen negativ. Mit der Benzpyren-Coffeinfärbung nach Berg markieren sich keine Fette, die sich jedoch bei Menschen

¹ Herrn Priv.-Doz. Dr. Berlet sei für die Beratung bei der Dünnschichtchromatographie herzlichst gedankt.

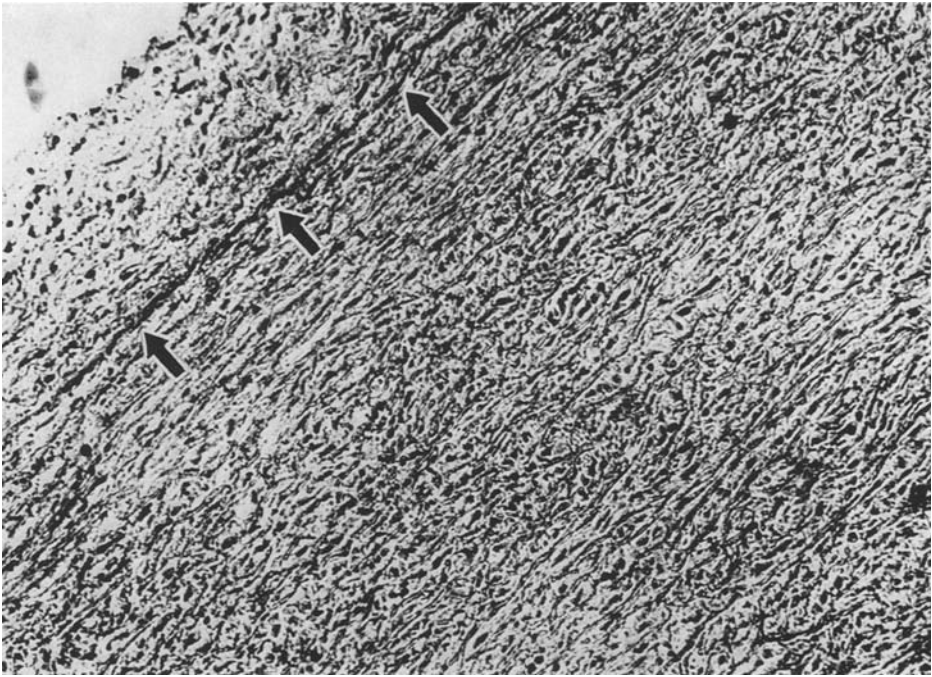


Abb. 3. Spuren sudanophiler Substanzen an der Intima-Mediagrenze (Pfeile) eines 24jährigen jungen Mannes. (Sudan III, Vergr. 90fach)

höherer Altersklassen unter UV-Licht als blaue längsgerichtete Streifen in Intima, Media und Adventitia darstellen lassen. Sie liegen gewöhnlich zwischen den elastischen Platten. Die Phospholipide lokalisieren sich in den Langhanszellen der Intima sowie in der glatten Muskulatur der Media (s. Abb. 4).

Saure Mucopolysaccharide sind als violette metachromatische Substanzen in fein verteilter bandförmiger Aggregation in Intima und an der Intima-Mediagrenze zu beobachten. Die histochemischen Befunde an menschlichen Aorten mittleren Alters zeigen eine stärkere Metachromasie an der Intima-Mediagrenze, die sich in einer Verbreiterung der bandförmigen Grundsubstanzaggregate abzeichnet. Ebenso ist eine starke Einlagerung feiner bis dicktropfiger Fette zu beobachten. In gleicher Weise nehmen mit steigendem Alter Cholesterin bzw. Cholesterinester zu. Eine Differenzierung von homogenem und wabigem Ödem vermag ich nicht vorzunehmen.

b) Kalb. Die Ödeme an der schwächtigen Intima des Kalbes sind sehr schwach ausgeprägt. Sie liegen in der auf- und absteigenden Brust- und der Lendenaorta in den subendothelialen Bezirken, in der Intima und an der Intima-Mediagrenze. Auch hier sind keine „Amputationsstümpfe“ zu sehen. Die chromatographischen Ergebnisse zeigen eine nur schwache Fraktion von Triglyceriden. Mit der Sudan III-Färbung lassen sich grobtropfige Fette in der Adventitia nachweisen. Intima und Media sind vollständig frei von Fetten. Cholesterine sind in geringen Mengen in der Media zu finden (Nachweis nach Schultz). Die UV Schiff-Reaktion

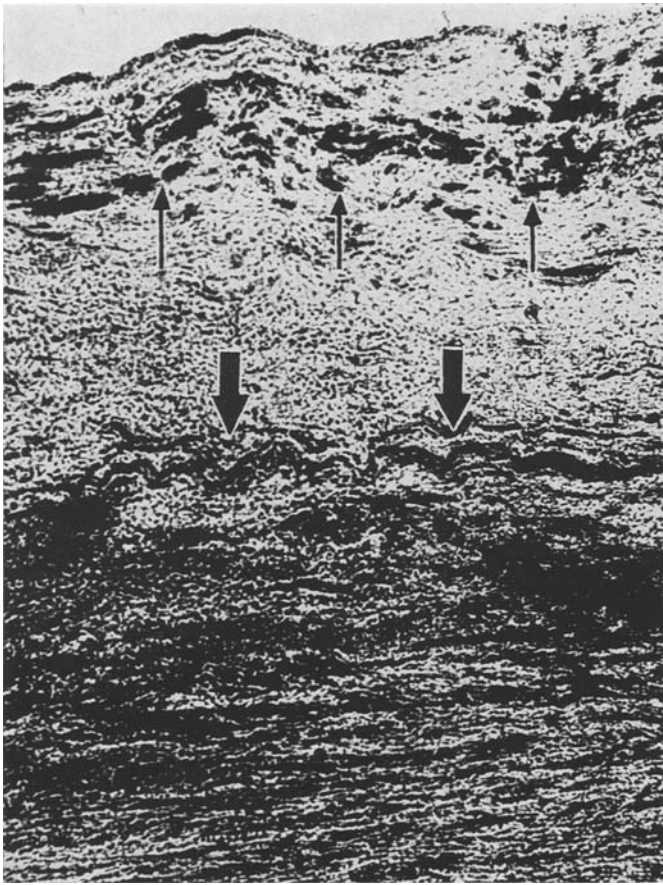


Abb. 4. Phospholipidnachweis nach Baker in der Aorta eines 73jährigen Mannes. Die Phospholipide markieren sich schwarz in den Langhanszellen der Intima (dünne Pfeile) und der glatten Muskulatur der Media (dicke Pfeile). (Vergr. 90fach)

nach Belt und Hayes zum Nachweis ungesättigter Fette verläuft fast immer negativ. Phospholipide erscheinen nach der Methode von Baker als homogene blauschwarze Anfärbungen in der glatten Muskulatur der Media. Mäßige bandförmige metachromatische Aggregate von sauren Mucopolysacchariden liegen vorwiegend in der Media.

c) *Schwein*. Beim Schwein ist in der vergleichsweise breiteren Intima in allen Fällen ein beginnendes Ödem mit Auflockerung des sog. Mesenchymschwammes sichtbar zu machen. Bei den drei 4—5jährigen Schweinen ist das Ödem an der Intima-Mediagrenze deutlicher ausgeprägt. Chromatographisch findet man bei jungen Schweinen geringe Mengen an Triglyceriden; bei alten Schweinen hingegen nehmen sie stark zu, insbesondere in der Lendenaorta. Mit der Sudan III-Färbung findet man Fette subendothelial, in der Media und vor allem in der Adventitia. Cholesterin ist mit Ausnahme einiger Cholesterinester bei jungen Schweinen nicht anzutreffen. Bei den 3 älteren Schweinen jedoch liegen Cholesterine in Form

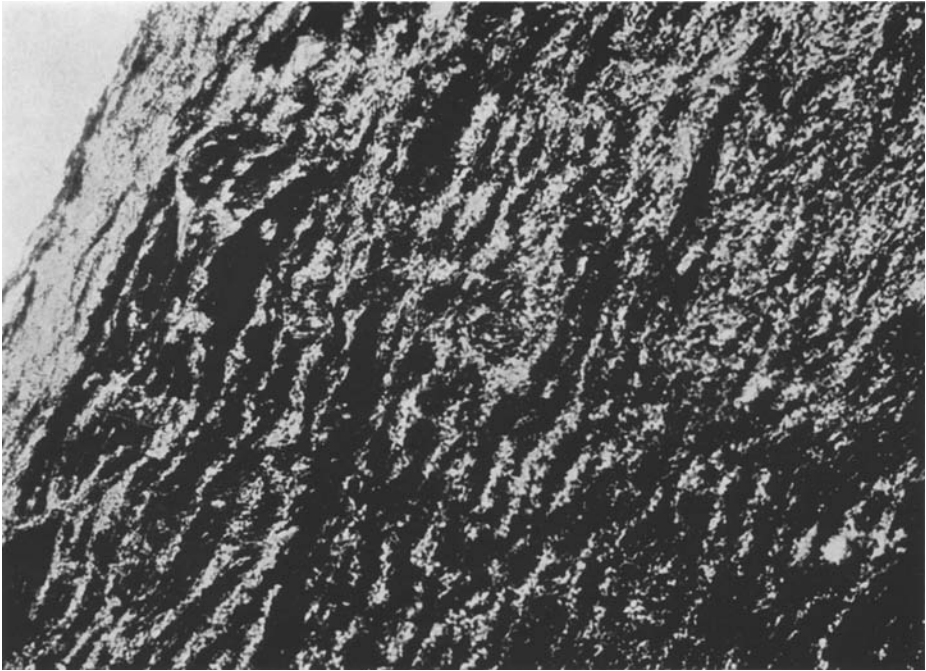


Abb. 5. Phospholipide in der Aorta eines 4 Jahre alten Schweines. (Baker, Vergr. 90fach)

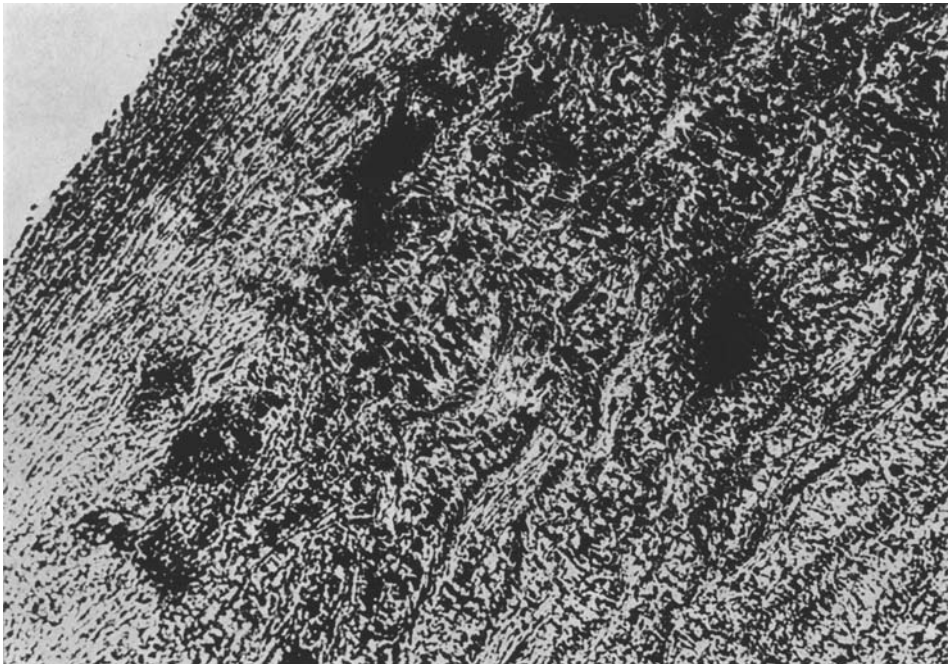


Abb. 6. Großtropfige Ablagerungen sudanophiler Substanzen in Intima und Media eines 5 Monate alten Huhnes. (Sudan III, Vergr. 90fach)

blaugrüner Aggregate im subendothelialen Bereich oder in der Intima. Phospholipide findet man in der Intima und in der glatten Muskulatur der Media (s. Abb. 5). Ein schwaches Band saurer Mucopolysaccharide liegt an der Intima-Mediagrenze oder in der Media.

d) Huhn. Ein eigentliches Ödem ist in der dünnen Intima der Hühneraorta nicht nachweisbar. Die Dünnschichtchromatographie zeigt aber einen hohen Gehalt an Triglyceriden, der wesentlich höher liegt als beim Menschen. Die sudanophilen Fette befinden sich vorwiegend an der Grenze zwischen Intima und Media, gelegentlich in der Media selbst (s. Abb. 6). Cholesterin bzw. Cholesterinester lokalisieren sich teilweise subendothelial, besonders aber in der Intima und Media. Phospholipide findet man in der glatten Muskulatur der Media. Saure Mucopolysaccharide liegen als metachromatisch anfärbbares Band in der Media, gelegentlich auch in der Intima.

Diskussion

Die Dünnschichtchromatographie an Gefrierschnitten von Aortenstanzen ist geeignet, sich über den Lipidgehalt des Gewebes zu orientieren, sagt jedoch nichts über die Lokalisation, d. h. die räumliche Verteilung der Lipide aus. Daher sind die Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie unbedingt mit histologischen und histochemischen Methoden zu korrelieren.

Seit langem wird bei der Genese arteriosklerotischer Veränderungen in den Gefäßen die Frage diskutiert, ob das Intimaödem, das als Initialstadium der Arteriosklerose beim Menschen gilt, anfangs fettfrei oder fetthaltig sei. Bründel und Sinapius (1970) stellen die Meinung verschiedener Autoren zu dieser Frage einander gegenüber. Sie selbst beobachteten an den Plaques menschlicher Aorten (44—76 Jahre) drei Gewebemuster, die sich durch die sog. Ödemstruktur sowie durch verschiedenen Zell- und Fasergehalt voneinander unterschieden. Im „wabigen“ und „homogenen“ Ödem fanden sie stets eine Sudanophilie; es ließen sich also fein disperse Fette mit kolloidalen Sudanlösungen oder mit Benzpyren-Coffein darstellen. In „glasigen Plaques“ der Intima hingegen, die sich histologisch als zellreiche Prolifereate auszeichneten, fanden sie keine sudanophilen Substanzen. Sie sprechen nur dort vom „fettfreien Intimaödem“ und diskutieren die Frage, ob man hinsichtlich der sekundären zelligen Proliferation bei geringer Ödemausbreitung überhaupt noch von einem Ödem reden könne. Bründel und Sinapius (1970) definieren als Ödem im engeren Sinne nur „histologisch eindeutig abgrenzbare Ödempfüten“. Die Entstehung des Intimaödemes deuten sie als Ergebnis einer Infiltration von Blutflüssigkeit, wobei sie die Frage der Pinocytose oder die Einsickerung durch Endothelrisse usw. offen lassen. Gleichzeitig mit der Blutflüssigkeit sickern nach ihrer Ansicht auch Lipide und Lipoproteide ein.

Im Gegensatz zu den Untersuchungsbefunden von Bründel und Sinapius (1970) kann ich an Gewebeschnitten von Brust- und Lendenaorta bei einem 8 Tage alten Säugling nur eine Auflockerung der Intimastruktur, bei den 16- bzw. 24jährigen Männern aber ein incipientes Ödem in der Intima feststellen. Die histochemische Darstellung von Fetten mit kolloidaler Sudan III-Lösung und mit Benzpyren-Coffein gelang im Ödem entweder gar nicht oder eben doch nur angedeutet.

Ebenso war der Nachweis von cholesterinhaltigen Lipoiden in den 3 Aorten negativ. Die im Chromatogramm dargestellte Triglyceridfraktion liegt in der Adventitia. Die durch metachromatisches Verhalten gekennzeichnete Grundsubstanz war in allen untersuchten Aorten deutlich als eine bandförmige Anreicherung saurer Mucopolysaccharide an der Intima-Mediagrenze bis zum mittleren Mediadrittel zu lokalisieren. Sie liegt hüllen- oder mantelförmig um die innere elastische Grenzlamelle und um die elastischen Platten der Media, wie dies bereits von Lindner (1961) beschrieben worden ist. Ganz ähnliche Untersuchungsergebnisse finden sich bei Kalb und Schwein. Bei jungen Schweinen und Kälbern ist immer eine Auflockerung der Intimastrukturen sichtbar zu machen. Bei den drei 4—5 jährigen Schweinen manifestiert sich deutlich ein Ödem an der Intima-Media-grenze.

Bei Kälbern und jungen Schweinen ist keine Sudanophilie des Ödems nachweisbar, während man bei älteren Schweinen entweder subendothelial oder in Media und Adventitia gelegenes Fett finden kann. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß bei verhältnismäßig jungen Hühnern (5—18 Monaten) ein eigentliches, d.h. mit konventioneller Methodik sichtbar zu machendes Ödem fehlt.

Diese Befunde rechtfertigen die Annahme, daß Fette bei Hühnern direkt in der Intima, an der Intima-Mediagrenze sowie in der Media am Molekularsieb der Mucopolysaccharide aufgestaut werden. Die Mucopolysaccharide bilden bei Kalb, Schwein und Huhn ein mehr oder weniger breites Band metachromatischer Substanzen. Der Cholesteringehalt dagegen steigt besonders beim Schwein mit zunehmendem Alter in der Aortenwand an. Beim Huhn liegen Cholesterin und Cholesterinester in Intima und Media.

Man kann eine solche vergleichend-pathologische Studie nicht vorlegen, ohne die Frage zu stellen, wie sich die Lebensaltersbeziehungen zwischen den gewählten Tierspecies und dem Menschen verhalten. Naturgemäß ist die Frage zu kompliziert, um hier ausführlicher erörtert zu werden. Unbeschadet der Besonderheiten, die durch Rasseeigentümlichkeiten, Zucht- und Masttierkonditionen — der Humanpathologe würde von Konstitution sprechen — gegeben sind, seien jedoch folgende Relationen skizziert: Versucht man eine Zusammenstellung korrelierbarer Lebensalter zwischen Mensch und Tier aufzuzeigen, so kann man davon ausgehen, daß z. B. beim Hund mit einer durchschnittlichen Lebenserwartung von ca. 10 Jahren 1 Hundejahr 7 Menschenjahren entspricht. Es würde sich ein Quotient von 1:7 errechnen. Bezogen auf das Rind mit einer durchschnittlichen Lebenserwartung von ca. 30 Jahren ergibt das einen Quotienten von 1:2,3 und bei Schwein und Huhn mit einer Lebenserwartung von etwa 20 Jahren einen solchen von 1:3,5.

Danach ist kein Zweifel, daß am Anfang der Flüssigkeitseinsickerung Fette nur in dem Maße in die inneren Aortenwandschichten eingebracht werden, als sie im blutplasmatischen Randstrom vorhanden sind. Dies bedeutet, daß das die arteriosklerotischen Umbauten einleitende sog. Intimaödem quasi fettfrei, mindestens fettarm ist. Man kann daher nicht sagen, daß alle diejenigen Autoren, welche von „fettfreiem Intimaödem“ gesprochen hatten, im Irrtum seien. Denn in der Histopathologie gilt der Satz *a potiori fit denominatio*. Erst nachträglich kommt es zu einer Anreicherung von Fetten und Lipiden, die dann zu ihrem Teil mitwirken, das bunte Bild der skleratheromatösen Wandumbauten entstehen zu lassen. Mucopolysaccharide und Polymerisationsprodukte aus Mucopolysacchariden und Fibrinogen (Bleyl und Wegener, 1968) führen zu Kondensatbildungen am Molekularsieb der Grundsubstanz von Intima und Media. Hierin

erblicke ich einen Vorgang von überragender Bedeutung. Denn die Anreicherung von physikalisch-chemisch veränderten Mucopolysacchariden darf als morphologisches Substrat der folgenschweren Störung in der Transitstrecke gelten.

Literatur

- Anitschkow, N.: Über die Atherosklerose der Aorta beim Kaninchen und über deren Entstehungsbedingungen. *Beitr. path. Anat.* **59**, 306—348 (1914).
- Über die Veränderungen der Kaninchenaorta bei experimenteller Cholesterinsteatose. *Beitr. path. Anat.* **56**, 379—404 (1913).
- Bleyl, U.: Arteriosklerose und Fibrininkorporation. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1969.
- Wegener, K.: Zur aktuellen Situation der Arterioskleroselehre. Bemerkungen zur Perfusionstheorie von W. Doerr, *Triangel (De.)* **9**, 9—18 (1969).
- Breitenecker, L., Holczabek, W.: Die Dünnschichtchromatographie von Gewebsschnitten. *Histochemie* **7**, 291—296 (1966).
- Bründel, K.-H., Sinapius, D.: Fette im Intimaödem der Aorta. Histologische, histochemische und chromatographische Untersuchungen. *Virchows Arch. Abt. A Path. Anat.* **351**, 225—232 (1970).
- Doerr, W.: Perfusionstheorie der Arteriosklerose. Stuttgart: Thieme 1963.
- Gangarten der Arteriosklerose. Berlin-Göttingen-Heidelberg-New York: Springer 1964.
- Allgemeine Pathologie der Organe des Kreislaufs. In: *Handbuch der Allgemeinen Pathologie*, 3. Bd., 4. Teil. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1970.
- Hueck, W.: Über Arteriosklerose. *Münch. med. Wschr.* **85**, 1—5 (1938).
- Ignatowski, A.: Über die Wirkung des tierischen Eiweißes auf die Aorta und die parenchymatösen Organe der Kaninchen. *Virchows Arch. path. Anat.* **198**, 248—270 (1909).
- Lindner, J.: Histochemie der Arteriosklerose. In: *Arteriosklerose*, Hrsg. Schettler, G. Stuttgart: Thieme 1961.
- Linzbach, J.: Die Bedeutung der Gefäßwandfaktoren für die Entstehung der Arteriosklerose. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* **41**, Tagg 24—41 (1958).

Reg.-Vet.-Rat Priv.-Doz. Dr. W. Hofmann
 Staatliches Tierärztliches Untersuchungsamt
 BRD-6900 Heidelberg, Czernyring 22b
 Deutschland