

I. Institut für Pathologische Anatomie und Experimentelle Krebsforschung der Medizinischen
Universität, Budapest (*Vorstand Prof. J. Baló*)

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ELASTOLYSE DER GEFÄSSWAND UND DES LIG. NUCHAE IN HISTOLOGISCHEN SCHNITTEN

J. Baló, I. Banga, D. Schuler

(*Ein gegangen am 5. Juni 1953*)

Die Feststellung von *Baló* und *Banga* [3], wonach die elastischen Fasern der Gefässwand durch Elastase spezifisch gelöst werden, ist neuerdings auch von *Hall, Reed* und *Tunbridge* [7] sowie *Lansing, Rosenthal, Alex* und *Dempsey* [9] bestätigt worden. *Hall* und Mitarbeiter, die neben den elastischen Fasern der Gefässwand auch die Elastolyse des Lig. nuchae untersuchten, sind zu der Feststellung gelangt, dass der Wirkungsmechanismus der Elastase in beiden Fällen derselbe und auch das nach der Auflösung gewonnene histologische Bild das gleiche sei. Nach ihrer Ansicht bestehe nur insofern ein Unterschied, als das Lig. nuchae des Rindes die elastischen Fasern nur in ihrer fibrillären Form enthält, in der Gefässwand dagegen neben den Fibrillen auch ein lamellöser Aufbau angetroffen werden kann. Im Laufe der zu besprechenden Untersuchungen beschäftigten wir uns mit dem zeitlichen Ablauf der Elastolyse sowohl beim Lig. nuchae wie bei der Gefässwand in histologischen Schnitten und gelangten zu der Feststellung, dass die histologischen Bilder bei dem aus zwei verschiedenen Quellen stammendem Material nicht identisch seien, woraus zu folgern ist, dass sich die elastischen Fasern des Lig. nuchae und der Gefässwand in ihrem Aufbau voneinander unterscheiden.

Ferner wünschten wir bei unseren Untersuchungen die Beobachtung von *Björling* [6], *Aschoff* [1] und *Solowjew* [12a, b, c] eingehend zu untersuchen, wonach sich bei Arteriosklerose in der Gefässwand Mukoide vermehren. Nach *Schultz* [11] befinden sich in der Gefässwand auch unter normalen Verhältnissen Mukoide, die sich unter pathologischen Bedingungen (bei Arteriosklerose) anhäufen. *Baló* [2] vermochte im Gefässsystem von mit Ammoniumhydroxyd behandelten Kaninchen ebenfalls eine Zunahme der Mukoide nachzuweisen, die sich mit dem von *Merkel* empfohlenen Kresylviolett metachromatisch färben. In unseren Versuchen untersuchten wir daher auch die Metachromasie des Lösungsproduktes der durch Elastolyse gelösten Fasern und die McManusche Reaktion [10]. Nachdem *Banga* [4] *in vitro* nachgewiesen hatte, dass Elastin nach Vorbehandlung in Anwesenheit reduzierender Substanzen auch durch Papain gelöst werden kann, erstreckten wir unsere Versuche auch auf die Untersuchung der Papain-Lösung.

Methoden

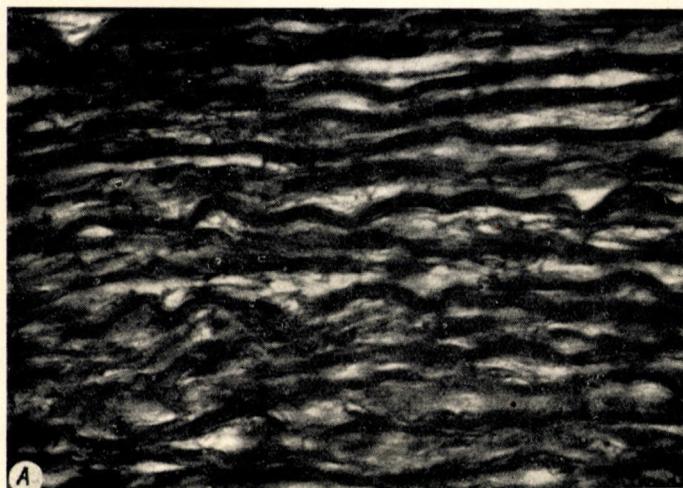
Wir untersuchten die Elastolyse an Gefrierschnitten von 10—20 Mikron Dicke, welche aus der Carotis communis des Menschen und dem Lig. nuchae des Rindes hergestellt wurden. In einigen Fällen untersuchten wir jedoch den Lösungsmechanismus auch an sklerotischen Gefäßen. Das Lig. nuchae entnahmen wir jungen, ca. 1—2jährigen Rindern. 4—10 Schnitte inkubierten wir verschiedene Zeit lang (1/2—24 Stunden) in 5 ml Elastase-Lösung (2 mg/ml NT 0,3—0,4)[5], wobei wir als Kontrolle die entsprechende, Elastase nicht enthaltende Lösung benutzten. Hiernach färbten wir die Schnitte mit Resorcinfuchsin, Van Gieson und Kresylviolet.

Bekanntlich geben die Perjodsäure-Schiff-Reaktion (McManus) von den Bindegewebsfasern allein die retikulären Fasern, während sich die Elastin- und Kollagenfasern auch nach perjodsaurer Vorbehandlung mit dem Schiff-Reagens nicht rot färben. Wenn wir anstelle von Perjodsäure als Oxydationsmittel Phosphorwolframsäure benutzten, ergaben auch die elastischen Fasern mit dem Schiff-Reagens eine positive Reaktion. Mit Kresylviolet färben sich die elastischen Fasern blau, das eine rötliche Schattierung erhält, wenn die Schnitte für kurze Zeit mit einer 1 : 200 verdünnten Phosphorwolframsäure-Lösung vorbehandelt werden. Die im Handel befindlichen Phosphorwolframsäuren sind ihrem chemischen Aufbau nach Phosphor-24-Wolframsäuren. Von stärkerer Oxydationswirkung als diese ist die nach Kamenosuke Shinhara [8] hergestellte Phosphor-18-Wolframsäure, bei deren Anwendung in einer 1 : 1000—1 : 2000 verdünnten Lösung innerhalb 1 Minute die Umwandlung eintritt, durch welche die Fasern metachromatisch färbar werden. Dieser Reaktion wurde im Rahmen der hier behandelten Experimente besondere Aufmerksamkeit gewidmet.

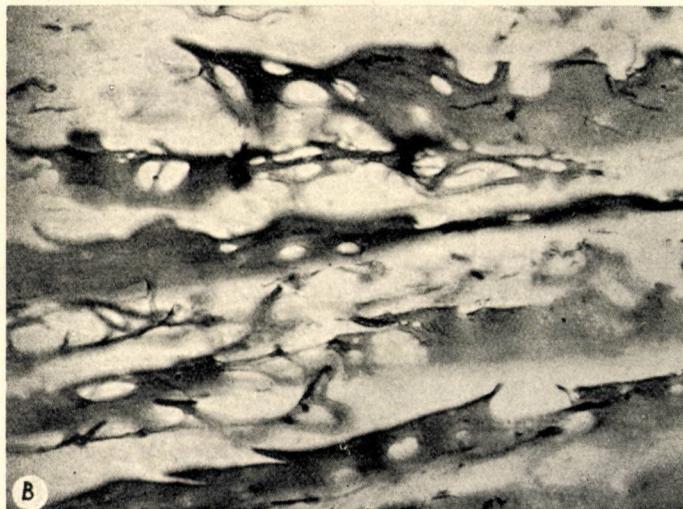
Bei den Lösungsversuchen mit Papain bereiteten wir eine Papain-Lösung von 4 mg/ml mit einem Na_2CO_3 -HCl (N/10)-Puffer von pH 10, der sodann je ml Papain-Lösung 0,2 ml einer 10 mg/ml KCN-Lösung zugegeben wurde. In die auf diese Weise bereitete Papain-Lösung wurden die auf oben beschriebene Art hergestellten Schnitte bei 37° für verschiedene Zeitspannen gelegt. Vorhergehend hatten wir die Versuche auch mit Schnitten ausgeführt, die in einem Azeton-Chloroformgemisch gekocht worden waren. Die Vermehrung der Bakterien schalteten wir mit Merthiolat und Toluolschichtung aus.

Versuchsergebnisse

Elastolyse: Die Versuche waren zuerst darauf gerichtet, die Zeit festzustellen, in der unter obigen Bedingungen eine befriedigende Lösung mit Elastase — Elastolyse — erzielt werden kann. Während in der ersten Viertelstunde an den Fasern nur eine sehr geringe Veränderung eintritt, konnten wir feststellen, dass in der zweiten halben Stunde die Auflösung in der Gefässwand rasch vor sich geht. Zur Elastolyse ist jedoch in den verschiedenen Gefäßen jeweils eine andere Zeitspanne nötig. In den Schnitten des Lig. nuchae vermochten wir den Beginn der Auflösung erst nach einigen Stunden nachzuweisen, doch geht die Elastolyse hiernach ziemlich rasch vor sich. Unter völliger Auflösung verstehen wir den Zustand, in dem keine einzige unversehrte elastische Faser mehr nachzuweisen ist; dies tritt in der Gefässwand innerhalb von 24 Stunden ein, im Lig. nuchae dagegen erst nach 36—48 Stunden. Die infolge der Auflösung zustande kommenden Veränderungen in den elastischen Fasern sind in der Gefässwand und im Lig. nuchae verschieden. Die elastischen Fasern der Gefässwand sind dünn, verlaufen wellig und parallel und färben sich mit Resorcinfuchsin bläulich-schwarz (Abb. 1a). Wie aus den Untersuchungen von Baló bekannt, schwellen die Fasern während der Auflösung an, es entstehen darin Vakuolen, ihr Verlauf wird unregelmässig, und mit Resorcinfuchsin färben



A



B

Abb. 1a. Dünne, wellig verlaufende elastische Fasern in der Gefäßwand.

Abb. 1b. Elastische Fasern der Gefäßwand nach Elastase-Behandlung. Die Fasern sind aufgebläht, blass und enthalten Vakuolen

sie sich nur schwach (Abb. 1b). Nach der völligen Lösung sind die Fasern (im Mikroskop) nicht mehr sichtbar, mit Resorcinfuchsin lassen sie sich nicht färben, d. h. sie sind in Lösung übergegangen.

Im Lig. nuchae weist die Elastolyse ein ganz anderes Bild auf. Vor der Auflösung befinden sich im Lig. nuchae dicke, hie und da abzweigende, gerade verlaufende parallele elastische Fasern, die sich mit Resorcinfuchsin schwächer färben als die Fasern der Gefässwand (Abb. 2a). Die elastischen Fasern sind von Kollagenfasersträngen begleitet. Bei Beginn der Elastolyse werden diese Fasern kompakter, färben sich mit Resorcinfuchsin dunkler, d. h. ähnlich den elastischen Fasern der Gefässwand, und zerfallen quer in gleiche Stücke (Abb. 2b). Bei kräftigerer Auflösung erfolgt diese Zerstückelung in höherem Masse, bei völliger Auflösung verschwinden die Faserstückchen sogar vollständig und gehen in Lösung über (Abb. 2c). Die Kollagenfasern, welche die elastischen Fasern begleiten, zerstückeln sich nicht und lassen sich mit Van Gieson zwischen den zerbröckelten gelben elastischen Fasern als rote Fibern gut nachweisen. Vakuolen haben wir bei der Elastolyse des Lig. nuchae niemals festgestellt, dagegen konnte an der Gefässwand die beim Lig. nuchae zu beobachtende, regelrecht querverlaufende Zerstückelung nicht nachgewiesen werden.

Wie aus unseren mit Kresylviolet gefärbten Schnitten — in Übereinstimmung mit den Literaturangaben — hervorgeht, befindet sich auch in der normalen, von jungen Menschen stammenden Gefässwand stets eine Metachromasie ergebende Substanz, die sich zwischen den elastischen Fasern, fast längs derselben, lagert. Beim Lig. nuchae ist dies weniger ausgeprägt. Im Laufe der Elastolyse vermehrt sich die Substanz, welche die Metachromasie ergibt, was sich jedoch nur dann nachweisen lässt, wenn wir die Elastolyse auf dem auf den Objektträger gelegten Schnitt selbst mit der sog. Tropfenmethode ausführen (wobei die Elastase auf den Schnitt getropft wird) und diesen nach der Inkubation mit Phosphor-18-Wolframsäure behandeln. Während der Elastolyse löst sich nämlich auch die metachromatische Substanz, die jedoch durch Säurebehandlung im Schnitt präzipitiert wird. In diesen Fällen erscheint sie naturgemäß nicht an der Stelle der gelösten Fasern, was darauf zurückzuführen ist, dass das gelöste Elastin nicht an der Lösungsstelle bleibt, sondern sich in der umgebenden Flüssigkeit gleichmäßig verteilt. Darum lassen sich die auf diese Weise behandelten Schnitte histologisch nicht auswerten.

Bei der McManus-Reaktion muss eine Perjodsäure-Behandlung durchgeführt werden, damit die Fasern Schiff-positiv werden. Perjodsäure macht entweder einige Bindungen frei oder oxydiert gewisse Bindungen, wodurch diese mit dem Schiff-Reagens eine positive Reaktion ergeben. Die elastischen Fasern reagieren bei dieser Behandlung auf die Schiff-Reaktion nicht positiv. Wenn wir indessen anstelle von Perjodsäure ein kräftigeres Agens, die Phosphorwolframsäure anwenden, so ergeben auch die unbehandelten Fasern eine positive Schiff-Reaktion, während sich auf die elastolysierten Fasern die amorph präzipi-

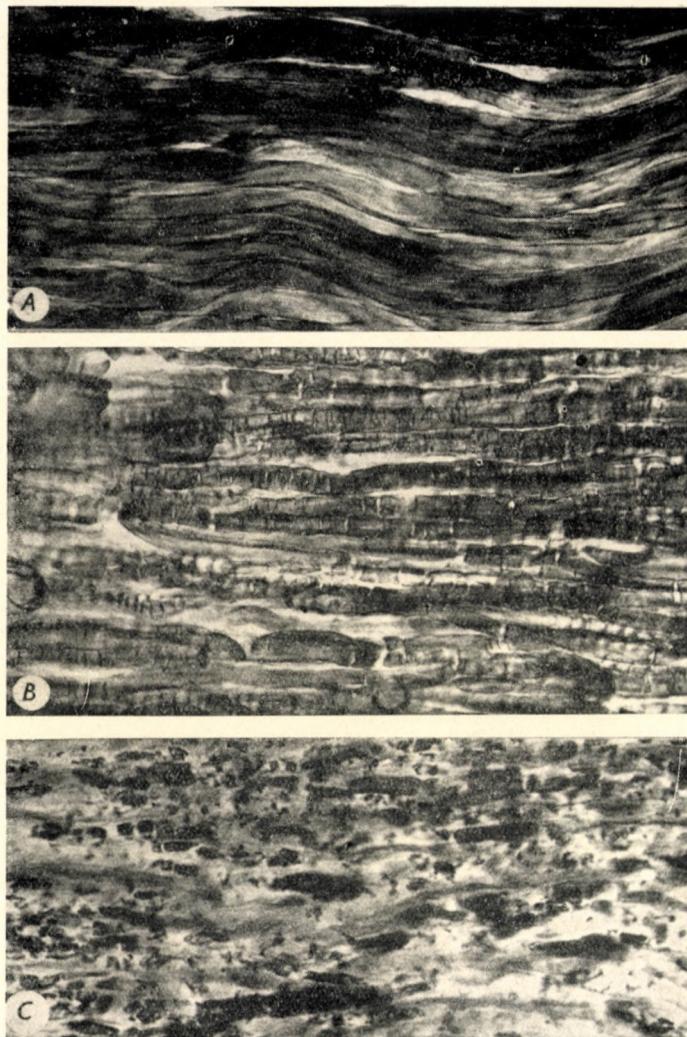


Abb. 2a. Die stämmigen, parallel verlaufenden elastischen Fasern des Lig. nuchae.

Abb. 2b. Die Zerstückelung der Fasern im Lig. nuchae nach Elasta-e-Behandlung.

Abb. 2c. Zerfallene Fasern, deren Teilchen sich unregelmässig lagern

tierende intensive Schiff-positive Substanz auflagert. Die Schiff-positive Substanz lässt sich ausserhalb der Fasern auch in der die gelösten Fasern enthaltenden Flüssigkeit nachweisen.

Papainwirkung: Mit Papain konnte weder in der Gefässwand noch im Lig. nuchae Lösung nachgewiesen werden. Wenn wir das Papain jedoch in Anwesenheit von KCN als Reduktionsmittel in einen n/10 Na₂CO₃-HCl-Puffer von pH 10 brachten, so ging — wenn auch weit langsamer (nach 48 Stunden) — die Auflösung der elastischen Fasern in den Schnitten vor sich. Auf entfetteten (in einer aa-Mischung von Chloroform und Äther gekochten) Schnitten liess sich eine Auflösung bereits nach 24 Stunden nachweisen. Die Auflösung ging in ganz ähnlicher Weise vor sich wie mit Elastase. Der Unterschied im Aufbau der Gefässwand und des Lig. nuchae war auch während der Papainlösung zu beobachten. An der Gefässwand entstanden geblähte Vakuolen, und zwar in den geschwollenen elastischen Fasern, während beim Lig. nuchae senkrecht zur Längsrichtung der Faser quer zerstückelte, beinahe ziegelförmige Teilchen erschienen. Nach Behandlung mit Kresylviolett und Phosphorwolframsäure waren die Ergebnisse der Schiff-Reaktion die gleichen, die wir bei der Elastolyse beobachtet hatten.

Besprechung

Unsere Versuchsergebnisse zeigen, dass sich der Aufbau der elastischen Fasern in der Gefässwand von dem der elastischen Fasern im Lig. nuchae unterscheidet. Diese Differenz im Aufbau bezieht sich auf das im Lichtmikroskop sichtbare histologische Bild, und wenn es auch als wahrscheinlich anzunehmen ist, ergibt der Unterschied doch keinen Beweis dafür, dass das Elastin selbst, aus dem sich die Fasern aufbauen, notwendigerweise verschieden sei. Die histologischen Bilder zeigen, dass sowohl in der Gefässwand als auch im Lig. nuchae ein Fasernetz vorhanden ist, das aus Kollagen besteht und die elastischen Fasern begleitet. Weil dieses Fasernetz und die elastischen Fasern selbst in der Gefässwand ein anderes Bild ergeben als im Lig. nuchae, entsteht auch nach der Elastolyse ein verschiedenartiges Bild. Die Fasern des Lig. nuchae sind stärker und breiter, so dass sich bei diesen die während der Elastolyse vor sich gehende Zerstückelung besser beobachten lässt als in der Gefässwand, in der die elastischen Fasern dünner und feiner sind. Die Elastolyse selbst besteht aus zwei Prozessen: zuerst schwellen die Fasern an, was eine gewisse Inkubationszeit beansprucht; hiernach setzt die Auflösung ein, die verhältnismässig rasch vor sich geht. Bei der Elastolyse kann Proteolyse oder die Vermehrung der Amino- oder Carboxylgruppen in äquimolarer Menge nicht nachgewiesen werden. Trotzdem ist anzunehmen, dass die Amidgruppe der im Elastinmolekül in ganz minimaler Menge (0,4—0,6%) anwesenden Dicarboxylsäure der Asparaginsäure gespalten wird und die auf diese Weise freiwerdende Carboxylgruppe

die Abspaltung der in ihrer Nähe befindlichen Alfa-Aminogruppen fördert bzw. aktiviert. Dies würde mit der von uns sowie von *Lansing* und Mitarbeitern [3] gemachten Beobachtung sehr gut übereinstimmen, dass die völlige Auflösung der Fasern nach der verhältnismässig langen anfänglichen Inkubation mit Elastase als ein autokatalysierter Prozess rasch vor sich geht. Dies war auch die Ursache, dass es uns nicht gelang, eine sog. Matrix, in der die Fasern eingebettet sind, nachzuweisen.

Für den Wirkungsmechanismus der Elastase ist kennzeichnend, dass er mit dem Freiwerden einer grossen Zahl von reduzierenden Gruppen einhergeht. Von den reduzierenden Stoffen besteht nur ein kleiner Teil aus reduzierendem Kohlenhydrat — der grössere Teil lässt sich auf die in den Seitenketten der das Elastin aufbauenden Aminosäuren vorkommenden Hydroxylgruppen sowie auf den Pyrrolring zurückführen. Diese reduzierenden Molekülgruppen werden von der Phosphorwolframsäure oxydiert und ergeben dann mit dem Schiff-Reagens eine positive Reaktion. Dass die Perjodsäure diese Oxydation nicht auszuführen vermag, sondern nur die Phosphorwolframsäure, lässt sich mit der im Oxydo-Reduktionspotential der beiden Stoffe bestehenden Differenz erklären.

Es ist wichtig zu betonen, dass die Mukoid genannte und Metachromasie ergebende Substanz, die während der Elastolyse in grosser Menge erscheint, einen ständigen Bestandteil und Baustein der normalen, gesunden Gefässwand darstellt. Dies beweist, dass in der Gefässwand zwischen den elastischen Fasern und dieser Substanz — die man auch als Pseudomukoid oder nach *Hall* als Proelastin bezeichnen könnte — ein Gleichgewicht besteht und dass sich die elastischen Fasern aus dieser aufbauen und zu dieser Substanz abgebaut werden. Die Störung dieses Gleichgewichtes vermag einerseits zur Zerstörung der elastischen Fasern, andererseits zu ihrer Hypertrophie zu führen.

Hinsichtlich der Lösung mit Papain sei bemerkt, dass in diesem Fall der Lösungsmechanismus der Elastolyse ähnelt. Während jedoch das Elastin allein, ohne Hinzufügung anderer Reduktionsstoffe, imstande ist, die elastischen Fasern aufzulösen, ist Papain hierzu nur dann fähig, wenn wir der Lösung mit alkalischem pH noch einen Reduktionsstoff hinzufügen. Auch unter diesen Umständen erfolgt die Auflösung mit Papain ca. zehnfach langsamer als die Elastolyse. Das Auflösen mit Papain lässt sich dadurch beschleunigen, dass man die Schnitte mit einem Azeton-Chloroform-Gemisch kocht, wodurch die Lipoide ausgelöst werden. Dies stimmt mit der Beobachtung von *Banga* überein, wonach sich auch die Elastine mit Papain besser auflösen lassen, wenn sie von den Lipoiden befreit werden.

Zusammenfassung

1. Die elastischen Fasern des Ligamentum nuchae und der Gefässwand besitzen voneinander abweichende morphologische Eigenschaften. Dies wird durch die während der Elastolyse

gewonnenen verschiedenen histologischen Bildern bestätigt. In den elastischen Membranen der Gefäßwand entstehen während der Elastolyse Vakuolen, während sich die elastischen Fasern des Lig. nuchae in der Längsrichtung der Faser senkrecht zerstücken.

2. Das Lösungsprodukt — Elastolysat — der elastischen Fasern ist eine Substanz, die nach Behandlung mit Phosphorwolframsäure eine positive Schiff-Reaktion ergibt. Diese Substanz bildet den ständigen Begleiter der elastischen Fasern auch in der normalen und gesunden Gefäßwand. Diese Substanz liegt der von Björling, Aschoff und anderen bei Arteriosklerose in den Arterien beobachteten Metachromasie zugrunde.

LITERATUR

1. **Aschoff, L.:** (1914) Arteriosklerose. Beihete zur Med. Klin., Berlin und Wien, 10, 1. —
2. **Baló, J.:** (1938) Die mit Ammoniumhydroxydvergiftung erzeugbare experimentelle Arteriosklerose. Frankf. Ztschr. Path. 52, 205. — 3. **Baló, J. und I. Banga:** (1949) Die Zerstörung der elastischen Fasern der Gefäßwand. Schweiz. Ztschr. Path. Bact., 12, 350. — 4. **Banga, I.:** (1952) Különöző módszerek szerint előállított elastinok enzymatikus lebontása. (Enzymatischer Abbau nach verschiedenen Methoden hergestellter Elastine.) M. E. T. XVIII. Vándorgyűlés. (XVIII. Wanderversammlung der Ungarischen Gesellschaft für Physiologie.) (Ung.) — 5. **Banga, I.:** (1952) Isolation and crystallisation of elastase from the pancreas of cattle. Acta Phys. 3, 317. — 6. **Björling, E.:** (1911) Über mukoides Bindegewebe. Virch. Arch. 205, 71. — 7. **Hall, D. A., R. Reed und R. E. Tunbridge:** (1952) Structure of elastic tissue. Nature, 170, 264. — 8. **Kamenosuke Shinohara:** (1935) The determination of thiol and disulfide compounds with special reference to cysteine and cystine. J. Biol. Chem., 109, 665. — 9. **Lansing, I., T. B. Rosenthal, M. Alex und E. U. Dempsey:** (1952) The structure and chemical characterisation of elastic fibers as revealed by elastase and by electron microscopy. Anat. Rec. 114, 555. — 10. **McManus, J. F. A.:** (1946) Histological demonstration of mucin after periodic acid. Nature 158, 202. — 11. **Schultz, H.:** (1922) Über die Chromotropie des Gefäßbindegewebes in ihrer physiologischen und pathologischen Bedeutung, insbesondere ihre Beziehungen zur Arteriosklerose. Virch. Arch. 239, 415. — 12. **Solowjew, A.:** a) (1923) Über die Zwischensubstanz der Blutgefäßwand. Virch. Arch. 241, 1; b) (1924) Über das Verhalten der Zwischensubstanz der Arterienwand bei Atherosklerose. Virch. Arch. 250, 359; c) (1926) Experimentelle Untersuchungen über die chromotrope Grundsubstanz der Arterienwand. Virch. Arch. 261, 253.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЛАСТОЛИЗА СОСУДИСТОЙ СТЕНКИ И ВЫЙНОЙ СВЯЗКИ В ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ СРЕЗАХ

Й. Бало, И. Банга и Д. Шулер

Резюме

1. Мы исследовали в гистологических срезах, — растворяя волокна с помощью эластазы — строение эластических волокон сосудистой стенки и выйной связки. Мы установили, что упомянутые два вида эластических волокон различны. Во время эластолиза в эластических волокнах сосудистой стенки возникают вакуолы, а эластические волокна выйной связки распадают в поперечном направлении на отдельные куски.

2. Продукт эластолиза как выйной связки, так и сосудистой стенки: т. н. эластолизат с химической точки зрения является тождественным. Характерной для эластолизата реакцией является то, что после обработки пер-йодовой кислотой эластолизат не дает положительной реакции с реагентом Шиффа, а в тоже время после обработки 2%-ным раствором фосфорновольфрамовой кислоты реакция Шиффа положительна. Положительная реакция Шиффа не основана исключительно на реакции находящегося в мукополисахариде сахарного алдегида, а более всего на присутствии составных частей эластина: аминовых кислот, содержащих в их составе гидроксильную группу и пирроловое кольцо.

Мукопротеид, дающий положительную реакцию Шиффа, постоянно сопровождает эластические волокна и в нормальных условиях.

Эластические волокна выйной связки и сосудистой стенки растворяются не только под действием эластазы но и под действием папайна. Растворение папайном в механизме своего действия отличается от механизма растворения эластазой, поскольку растворение папайном происходит только в присутствии редуцирующих веществ.