

Aus dem Institut für Kreislaufforschung (Direktor: Akademiker K. WEBER), Prag 4,
dem Institut für Ernährungsforschung (Direktor: Doz. Dr. J. MAŠEK), Prag 4,
und aus dem Embryologischen Institut der Medizinischen Fakultät der Karls-Universität
(Vorstand: Prof. Dr. Z. FRANKENBERGER), Prag 2, Tschechoslowakei

Der Einfluß langfristiger Verabreichung von Diäten mit hohem Fettgehalt auf die Anzahl der Mastzellen im Mesenterium von Ratten

Von

J. FODOR, P. FÁBRY und Z. LOJDA

(Eingegangen am 20. Juni 1960)

Während sich eine heute bereits recht ausführliche Literatur mit der Frage der Beteiligung des exogenen Heparins am Fettstoffwechsel beschäftigt, sind unsere Kenntnisse über die Rolle, die das endogene Heparin im Fettstoffwechsel spielt, noch sehr gering. Es bestehen jedoch kaum Zweifel darüber, daß die Mastzellen die Hauptquelle dieses endogenen Heparins darstellen (HILL, HOLMGREN und WILANDER). Es erschien uns deshalb von Wichtigkeit, die Frage zu untersuchen, ob das Mastzellensystem unter physiologischen Bedingungen nicht dadurch in den Fettstoffwechsel eingreift, daß es im Bedarfsfalle Heparin in Freiheit setzt. In einer früheren Arbeit haben wir nachgewiesen, daß die postprandiale Lipämie potentiell die Wirksamkeit anderer Stoffe erhöht, die die Mastzellen aktivieren (Protaminsulfat, FODOR und LOJDA). Über ähnliche Befunde berichtet auch HILL. In weiteren Versuchen haben wir uns mit der Frage befaßt, ob langfristige Verabreichung von Diäten mit hohem Fettgehalt Veränderungen der Mastzellen hervorrufen, die sich quantitativ auswerten lassen. Wir haben deshalb die Anzahl der Mastzellen im Mesenterium der Ratten beobachtet, die möglicherweise gewisse Aufschlüsse über den Zustand des Mastzellensystems zulassen kann.

Bereits die ersten Versuche haben gezeigt, daß die Verabreichung fettreicher Diät bzw. fettreicher Diät mit Cholesterinzusatz nach 8 Wochen zu einer Abnahme der Mastzellen führt, wobei die Herabsetzung bei der mit der letztgenannten Diät gefütterten Gruppe statistisch bedeutsam war. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind bereits in einer kurzen vorläufigen Mitteilung (1958) veröffentlicht worden (FODOR u. Mitarb.).

In der vorliegenden Arbeit teilen wir, neben ausführlicherem Material der erwähnten Versuchsreihe weitere Versuche mit, die unsere Ergebnisse bestätigen und genauer umgrenzen.

Methode

Die Versuche wurden an insgesamt 110 männlichen Albinoratten (Wistar-Stamm) durchgeführt, deren Gewicht zu Versuchsbeginn etwa 200 g betrug und die unter standardisierten Bedingungen bei einer Temperatur von $22 \pm 1^\circ \text{C}$ gehalten wurden. In jeder der drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchsreihen waren die Tiere in 3 Gruppen eingeteilt worden, denen isocalorische Diäten mit niedrigem oder hohem Fettgehalt bzw. mit hohem Fett- und Cholesteringehalt verabreicht wurden. Die genaue Zusammensetzung der Diäten ist in der Tabelle 1 angegeben. Die Fütterungsperioden dauerten 8, 16 und 46 Wochen. Die Tiere gediehen normal und wiesen keinerlei ersichtliche Mangelsymptome auf. Nach Beendigung der Versuchsperiode wurden die Tiere nach 24stündigem Fasten durch Dekapitieren getötet.

Die Mesenterien der Tiere wurden in Schaffer-Lösung fixiert. Danach wurden von jedem Tier 3 Präparate aus einander entsprechenden Stellen des Mesenteriums angefertigt. Die Mastzellen wurden mit einer 1%-Toluidinblaulösung gefärbt und gezählt, indem in das Okular Zeiss IV ein Plättchen eingelegt wurde, das einen quadratischen Ausschnitt, dessen Fläche 0,012 mm² betrug, enthielt. Die Mastzellen wurden dann in je 50 zufällig eingestellten Ausschnitten gezählt. Durch diese Art des Auszählens sollte vermieden werden, daß nur die perivaskulären Mastzellen (RILEY, Typus I) oder nur diejenigen, die zwischen den Gefäßen liegen (RILEY, Typus II) in Betracht gezogen werden. Die Anzahl der Mastzellen haben wir dann als die Summe aller Werte angegeben, die wir in 3 Präparaten, d. h. insgesamt in 150 Zählfeldern gefunden haben. Weitere methodische Einzelheiten sind in den früheren Mitteilungen angeführt worden (FODOR u. LOJDA, LOJDA u. FODOR).

Selbstverständlich haben wir nur die zwischen parallel gefütterten und gleichzeitig getöteten Tiergruppen festgestellten Unterschiede ausgewertet, da die absolute Anzahl der Mastzellen ziemlich schwankt und, wie wir uns in einer Reihe von Versuchen überzeugen konnten, sowohl vom Wurf als auch von der Jahreszeit und weiteren unkontrollierbaren Faktoren abhängt, was gleichzeitig zu der erheblichen Streuung der Werte bei sonst homogenen Tiergruppen führt. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den einzelnen Tiergruppen wurden statistisch nach FISHERS *t*-Test berechnet.

Bei weiteren, parallel entnommenen Mesenteriennoten wurde nach Fixierung in Bakerscher Lösung die PAS-Reaktion durchgeführt, außerdem wurde mit Galloeyanin bei p_H 2,6 und 4,6 und nach Extraktion mit CCl₃COOH (p_H 4,6) nach SCHNEIDER gefärbt. Die Mastzellen wurden ebenfalls nach der Reaktion DANIELLIS untersucht und mit 0,1 Methylenblau bei p_H 2,6 und 4,6 und Alcyanblau gefärbt. Alle erwähnten Reaktionen wurden nach den von PEARSE angegebenen Vorschriften durchgeführt.

Tabelle 1. Zusammensetzung der Versuchsdiäten

| | Fettarme Diät | Fettreiche Diät | Fettreiche Diät mit Cholesterinzusatz |
|----------------------|---------------|-----------------|---------------------------------------|
| Grundmischung* . . | 300 | 300 | 300 |
| Casein | 350 | — | — |
| Stärke | 350 | — | — |
| Rindertalg | — | 260 | 260 |
| | | | (davon 5% als Cholesterin) |
| 2,5 %-Agarlösung . . | 500 | 940 | 940 |
| Summe (g) | 1500 | 1500 | 1500 |
| Cal./1 g | 2,27 | 2,28 | 2,28 |
| Cal.-% | | | |
| Eiweiß | 47,6 | 13,3 | 13,3 |
| Fett | 10,6 | 80,0 | 80,0 |
| Kohlenhydrate . . | 41,8 | 6,7 | 6,7 |

* Grundmischung (g/l kg): Casein 200, Trockenmilch 300, Luzerne 110, getrocknete Bierhefe 300, Lebertran 30, NaCl 10, CaCO₃ 50.

Ergebnisse

Die Anzahl der Mastzellen in den Mesenterien der einzelnen Tiergruppen ist in der Tabelle 2 zusammengefaßt. Nach einer 8wöchentlichen Fütterungsperiode stellen wir, im Vergleich zu den mit einer Diät mit geringem Fettanteil gefütterten Tieren, bei den mit fettreicher Diät gefütterten Tieren eine statistisch nicht gesicherte Herabsetzung der Anzahl der Mastzellen fest und in der Gruppe der mit fettreicher Diät und Cholesterinzusatz gefütterten Tiere eine statistisch gesicherte Abnahme.

In dem 16 Wochen dauernden Versuche kommt es zu einer annähernd gleichen Abnahme der Mastzellen bei beiden mit fettreicher Diät gefütterten Tiergruppen; infolge der hohen Streuung sind die Unterschiede jedoch nicht statistisch gesichert. Zu sehr auffälligen Unterschieden in gleicher Richtung kommt es jedoch bei den Versuchstieren, denen die angegebenen Diäten während 43 Wochen

verabreicht worden waren, wobei die Herabsetzung der Anzahl der Mastzellen sowohl bei den Tieren, die Diät mit hohem Fettgehalt, als bei denjenigen, die fettreiche Diät mit Cholesterinzusatz erhielten, statistisch gesichert war.

Was die mit histochemischen Methoden durchgeführten Untersuchungen anbelangt, so konnten wir zwischen den einzelnen Versuchsgruppen keine deut-

Tabelle 2. Anzahl der Mastzellen im Mesenterium der Ratten nach Verabreichung von Diäten mit verschiedenem Fettgehalt

| Ver- suchs- reihe | Diät | Versuchs- dauer (Wochen) | Anzahl der Tiere | Anzahl der Mastzellen im Mesenterium ¹ |
|-------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|------------------------|---|
| I | Fettarme | 8 | 20 | 1727 ± 73 |
| | Fettreiche | 8 | 18 | 1572 ± 76 |
| | Fettreiche mit Cholesterinzusatz | 8 | 19 | 1470 ± 63 ² |
| | | | | |
| II | Fettarme | 16 | 10 | 2496 ± 240 |
| | Fettreiche | 16 | 9 | 1961 ± 144 |
| | Fettreiche mit Cholesterinzusatz | 16 | 10 | 1988 ± 146 |
| | | | | |
| III | Fettarme | 43 | 8 | 2716 ± 257 |
| | Fettreiche | 43 | 8 | 1696 ± 119 ² |
| | Fettreiche mit Cholesterinzusatz | 43 | 8 | 1634 ± 89 ² |
| | | | | |

¹ Gesamtanzahl der in 3 × 50 Feldern von je 0,012 mm² Fläche angezählten Mastzellen. Die Zahlen geben die Mittelwerte der Gruppen (auf ganze Zahlen abgerundet ± Mittelfehler) wieder.

² Im Vergleich zu der mit fettarmer Diät gefütterten Gruppe ist der Unterschied für P < 0,01 statistisch gesichert.

Diskussion

Die Ergebnisse aller drei, unabhängig voneinander und zu verschiedenen Jahreszeiten durchgeführten Versuche sprechen dafür, daß ein hoher Fettgehalt des Futters zu einer Herabsetzung der Anzahl der Mastzellen im Mesenterium der Ratte führt. Die Tatsache, daß es bei langdauernder Verabreichung der Versuchsdiäten (16 bzw. 43 Wochen) zu einem Ausgleich zwischen den mit fettreicher und mit fettreicher Diät und Cholesterinzusatz gefütterten Tiergruppe kommt, spricht dafür, daß das Cholesterin wahrscheinlich keine spezifische Wirkung auf die Abnahme der Mastzellen ausübt, sondern den Einfluß der fettreichen Diät unterstreicht, der ja bereits nach der 8wöchentlichen Fütterungsperiode angedeutet ist.

In diesem Zusammenhang wollen wir daran aufmerksam machen, daß STOLK (1959a/b), von unseren bereits mitgeteilten Ergebnissen ausgehend, bei 3 Arten lebendgebärender Zahnkarpfen (*Xyphophorus helleri*, *Xyphophorus maculatus* und *Lebistes reticulatus*), denen 66 Tage lang verschiedenes Futter verabreicht worden war, eine Abnahme der Mastzellen im Mesenterium und Myokard derjenigen Gruppen festgestellt hat, die fettreiche Diät erhielten und eine noch höhere, statistisch gesicherte Abnahme bei denjenigen Versuchsgruppen, denen fettreiche Diät und Cholesterin verabreicht wurde. Diese Ergebnisse ent-

lichen Unterschiede feststellen. Die Reaktionen waren nicht einmal in allen Zellen ein und desselben Mesenteriums gleich, was unsere bereits bei früheren Versuchen gemachten Erfahrungen bestätigt (LOJDA u. FODOR).

Makroskopisch wiesen die Organe der Tiere in den einzelnen Versuchsgruppen keinerlei auffällige Unterschiede auf, mit Ausnahme der typischen Lebersteatose bei den mit fettreicher Diät und Cholesterin gefütterten Versuchsgruppen.

sprechen also weitgehend denen unserer ersten Versuchsreihe, die wir bereits früher als vorläufige Mitteilung veröffentlicht haben.

Es bereitet gewisse Schwierigkeiten, den Mechanismus und die funktionellen Auswirkungen der Herabsetzung der Anzahl der Mastzellen infolge hoher Fettaufnahme aufzuklären. Es ist bekannt, daß die exogene Zufuhr von Heparin zu einer erhöhten Ausnutzung sowohl der Fettreserven als auch des mit der Nahrung zugeführten Fettes führt (KUHN u. Mitarb., MICHALJIK u. BRAGDON). Diese Tatsache läßt die Vorstellung verlockend erscheinen, daß der erhöhte Heparinverbrauch der bei der Ausnutzung einer großen, mit der Nahrung zugeführten Fettmenge eintritt, zu einer allmählichen funktionellen Erschöpfung und schließlich zum Verschwinden der einzelnen Mastzellen führen könnte, die ja, wie bereits erwähnt, die hauptsächlichste und vielleicht die einzige Quelle des endogenen Heparins darstellen. Hierbei muß man sich jedoch vor Augen halten, daß ein quantitativ zu erfassender Beweis für eine erhöhte Heparinabgabe aus den Mastzellen bisher noch fehlt. Man kann sich daher nicht darüber aussprechen, ob eine Abnahme der *Anzahl* der Mastzellen in einer gleichzeitigen Änderung der Aktivität des gesamten Mastzellsystems bzw. der Menge des Heparins, das dem Organismus zur Verfügung steht, ihren Ausdruck findet. Eine eingehendere experimentelle Analyse dieses Problems würde nicht nur die unter physiologischen Bedingungen bestehende Beziehung zwischen der Anzahl und der Funktion der Mastzellen aufklären, sondern könnte auch zur Beantwortung der Frage beitragen, ob die von CAIRNS u. CONSTANTINIDES beschriebene Abnahme der Mastzellen im Myokard von Atherosklerotikern eine Teilerscheinung der Gesamtstörung des Fettstoffwechsels darstellt bzw. eines der Glieder der pathogenetischen Kette, die zur Entstehung der Atherosklerose führt.

Zusammenfassung

Bei Albinoratten wurde die Anzahl der im Mesenterium enthaltenen Mastzellen während der Verabreichung von Diäten mit niedrigem und hohem Fettgehalt und von Diäten mit hohem Fettgehalt und Cholesterinzusatz bestimmt, wobei die einzelnen Fütterungsperioden 8, 16 und 43 Wochen dauerten. Bei den Tieren, die eine Diät mit hohem Fettgehalt und Cholesterinzusatz erhielten, kam es im Vergleich zu denjenigen, denen eine fettarme Diät verfüttert wurde, bereits nach 8 Wochen zu einer statistisch bedeutsamen Abnahme der Anzahl der Mastzellen. Werden die Fütterungsperioden verlängert, so tritt eine ähnliche Herabsetzung der Anzahl der Mastzellen auch bei Verabreichung einer fettreichen Diät ohne Cholesterinzusatz ein.

Summary

The authors investigated the number of mast cells in the mesentery of albino rats fed low-fat, high-fat, and high-fat, high cholesterol diets for periods of 8, 16, and 43 weeks. A significant decrease in the mast cell count was recorded in the animals on the high-fat, high-cholesterol diet after 8 weeks as compared with the group on the low-fat diet. When the period of experimental feeding was prolonged, a similar decrease of mast cells was noted even on a high-fat diet without added cholesterol.

Literatur

- CAIRNS, A., and P. CONSTANTINIDES: Mast cells in human atherosclerosis. *Science* **120**, 31 (1954).
- FODOR, J., P. FÁBRY and Z. LOJDA: High fat diet and mast cell count in rat mesenterium. *Experientia* (Basel) **15**, 184 (1958).
- FODOR, J., and Z. LOJDA: On the relationship of heparinocytes to the transport of fats. *Physiol. bohemoslov.* **5**, 275 (1956).
- HILL, M.: Secretion of heparin by mast cells. *Nature* (Lond.) **180**, 654 (1957).
- HOLMGREN, H., u. O. WILANDER: Beitrag zur Kenntnis der Chemie und Funktion der Ehrlichschen Mastzellen. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **42**, 242 (1937).
- KUHN, E., J. PÁV and Z. PLACER: The action of heparin on energy metabolism. *Rev. Czech. Med.* **5**, 261 (1959).
- LOJDA, Z., u. J. FODOR: Cytochemická studie o žírných buňkách krysiho mesenteria. *Čs. morfologie* **6**, 81 (1958).
- MICHAJLIK, A., and J. H. BRAGDON: Effects of intravenous heparin on oxidation of fat. *J. Lipid Res.* **1**, 164 (1960).
- PEARSE, A. E. G.: *Histochemistry, theoretical and applied*. London: J. & A. Churchill 1954.
- STOLK, A.: Effect of high fat diet on mast cell count in mesenterium of some viviparous toothcarps. *Naturwissenschaften* **46**, 361 (1959a).
- STOLK, A.: High fat diet and mast cell count in myocardium of some teleosts. *Naturwissenschaften* **46**, 409 (1959b).

Dr. J. FODOR, Institut für Kreislaufforschung, Budějovická 800, Prag 4, ČSSR

Dr. P. FÁBRY, Institut für Ernährungsforschung, Budějovická 800, Prag 4, ČSSR

Dr. Z. LOJDA, Embryologisches Institut der Medizinischen Fakultät
Karls-Universität, Albertov 4, Prag 2, ČSSR