

Aus der Urologischen Abteilung der Krankenanstalt Rudolfstiftung, Wien
(Vorstand: Prof. Dr. H. HENNINGER)

Weitere Beobachtungen zur pathologischen Histologie der Venenendothelien*

Von

G. ZINNER und R. GOTTLÖB

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 14. März 1961)

In früheren Arbeiten (GOTTLÖB und ZINNER) wurden die morphologischen Veränderungen beschrieben, wie sie nach Einwirken stärkerer oder schwächerer Schäden an silbergefärbten Endothelien gesehen werden(1) und ihre pathophysiologischen Auswirkungen diskutiert(2). Im Folgenden sollen noch einige Beobachtungen mitgeteilt werden, die die Kenntnis von der pathologischen Morphologie der Endothelzellen erweitern oder bereits beschriebene Phänomene erklären können.

Material und Methoden

Wie in den früheren Arbeiten ausführlich beschrieben wurde, haben wir an Halsvenen von Kaninchen Schädigungen durchgeführt, hierauf die Intima mit Silbernitratlösung imprägniert, dann das Gefäß präpariert, aufgeschnitten und nach der Methode von O'NEILL ausgespannt und aufgehellt, sodaß die Präparate im durchfallenden Licht beobachtet werden konnten. Diese Methode ermöglicht es, die Endothelien in ihrem Zusammenhang zu betrachten und so eine Reihe von Aufschlüssen zu gewinnen, die bei Untersuchung der üblichen Schnittpräparate entgehen würden.

Anfärbung des Cytoplasma der Endothelien, Kernaussparungen

Wie schon beschrieben wurde, kommt es nach der Silberimprägnierung im Bereich geschädigter Zellen zu einer dunklen Verfärbung, die wir — ebenso wie verschiedene andere pathologische Zeichen in versilberten Gefäßpräparaten — als Ausdruck einer Permeabilitätsstörung gewertet haben. Wie wir annehmen, kommt es in den geschädigten Arealen zu einem Eindringen der färbenden Silberlösung in den Zelleib. Daneben könnten noch andere Vorgänge eine Rolle spielen, etwa ein vorheriges Eindringen von Plasmabestandteilen in die geschädigte Endothelzelle oder eine tropfige Entmischung des Protoplasma. Von der Anfärbung sind die Kerne meist ausgenommen. So kann es vorkommen, daß die Endothelkerne als mehr oder weniger scharf begrenzte Aussparungen im Bereich des dunkel erscheinenden Protoplasma sichtbar werden.

SINAPIUS hat bei seinen ausgedehnten Untersuchungen über die Grundlagen der Versilberung Anfärbungen gesehen, wenn die Endothelien vor der Versilberung nicht genügend dechloriert wurden. Auf Grund der folgenden Beobachtung kann man annehmen, daß ein solcher Vorgang bei der von uns sehr oft gesehenen Cytoplasmaanfärbung *nicht* vorliegt: Untersuchungen über die Regeneration der Endothelien haben ergeben, daß Zellen, die einen künstlich erzeugten schmalen Endotheldefekt überwuchern, zunächst so permeabel sind, daß

* Die Untersuchungen wurden durch Zuwendungen aus dem Wissenschaftlichen Fonds der Gemeinde Wien und aus der Theodor Körner-Stiftung ermöglicht.

sie eine Anfärbung tieferer Schichten zulassen, so daß Gitterfasern oder überwachsene Erythrocytenplaques durch die neu gewachsenen Endothelzellen hindurch von der Silberlösung angefärbt werden. Später werden die tieferen Schichten nicht mehr dargestellt, dagegen kommt es jetzt zu der typischen Plasmaanfärbung mit Kernaussparungen. Erst die reifen, etwa 7 Tage alten Endothelien sind für die Silberlösung vollständig undurchlässig. — Bei Anfärbung des Cytoplasmas der Endothelien scheint daher ein geringerer Grad von Permeabilitätsstörung vorzuliegen, als bei Anfärbung tieferer Schichten. — Vom 7. Tag nach der Schädigung an kommt es zu Plasmaanfärbungen und Kernaussparungen im Bereich der alten, nicht regenerierten Endothelien. Wir vermuten, daß hier die Reize der Freilegung und der aseptischen Entzündung in der nach der Schädigung primär verschlossenen Wunde durch Summation zu einem vorzeitigen Altern der Zellen geführt haben, was wiederum die Permeabilität erhöht. — Auch nach 3 Wochen sind diese Kernaussparungen der alten Endothelien sehr deutlich, während dieser Zeit sind die neu gewachsenen Endothelien vollständig normal und undurchlässig und erscheinen daher in der Silberfärbung hell und ohne Kerndarstellung.

Das gleichzeitige Vorkommen von normalen Zellen und von Zellen mit angefärbtem Cytoplasma im gleichen Präparat spricht in unserem Falle gegen eine mangelnde Dechlorierung als Ursache für die Veränderung, da eine mangelnde Dechlorierung ja das ganze Präparat betreffen müßte. (Unsere Untersuchungen über die Regeneration sollen in einer späteren Arbeit ausführlich veröffentlicht werden.)

Die Anfärbung des Cytoplasma wird in verschiedenartiger Form beobachtet. Es können ganze Endothelbezirke homogen angefärbt erscheinen, wobei meist

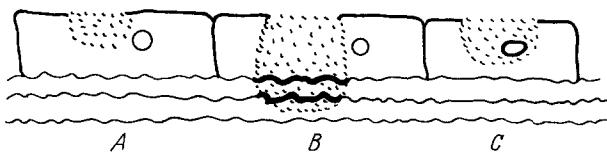


Abb. 1. Schematische Darstellung der verschiedenen Formen bei der zentralen Cytoplasmaanfärbung. A Zellkern und Gitterfasern außerhalb der Anfärbung. B Anfärbung von Gitterfasern. C Aussparung des Zellkernes

Kernaussparungen sichtbar sind, während die Kittlinien verschiedene Grade der Schädigung aufweisen oder ganz fehlen. Neben dieser *diffusen* Form der Cytoplasmaanfärbung findet man oft weite Areale, die nur die Anfärbung bestimmter Endothelzellbezirke zeigen. Entweder handelt es sich um die kittliniennahen, *randständigen* Bezirke, wobei das Gebiet des Kernes und ein mehr oder weniger großer Hof ungefärbt bleiben oder es sind elektiv nur die *zentralen* Zellbezirke angefärbt. Die verschiedenen morphologischen Erscheinungen bei einer Anfärbung der Zellmitte sind auf der schematischen Skizze, Abb. 1, dargestellt.

Häufig sieht man im Zentrum der Endothelzellen nur einen rundlichen, bräunlich dunklen Fleck, der einem Zellkern täuschend ähnlich sehen kann, tatsächlich aber mit dem Kern, der in der Silberfärbung niemals angefärbt wird, nichts zu tun hat (A in Abb. 1). Wir haben solche Erscheinungen „Pseudokerne“ genannt. Daß es sich hierbei nur um eine Cytoplasmaanfärbung im Zentrum der Endothelzelle handelt, erkennt man auch oft daran, daß in diesem Bereich außerdem Gitterfasern der Basalmembran sichtbar werden können, d.h., daß manchmal auch tiefere Schichten der Gefäßwand angefärbt werden. (B in Abb. 1 — s. auch Abb. 2c in unserer früheren Arbeit in diesem Archiv.) Schließlich kann der Zellkern selbst in der zentralen Plasmaanfärbung als Aussparung zu sehen sein (C in Abb. 1 und 2a).

Unsere Untersuchungen erlauben noch keine sichere Aussage darüber, warum einmal die zentralen und im anderen Fall die peripheren Anteile der Endothelien angefärbt werden.

Vielleicht führen Schädigungen vom Gefäßlumen her (injizierte hypertone Lösungen, zu brüskes Spülen des Gefäßes) vorwiegend zur Anfärbung der Zellmitte und Schäden, die von außen auf das Gefäß einwirken (Präparationstrauma, Entzündungsreize) eher zur Anfärbung der Zellperipherie.

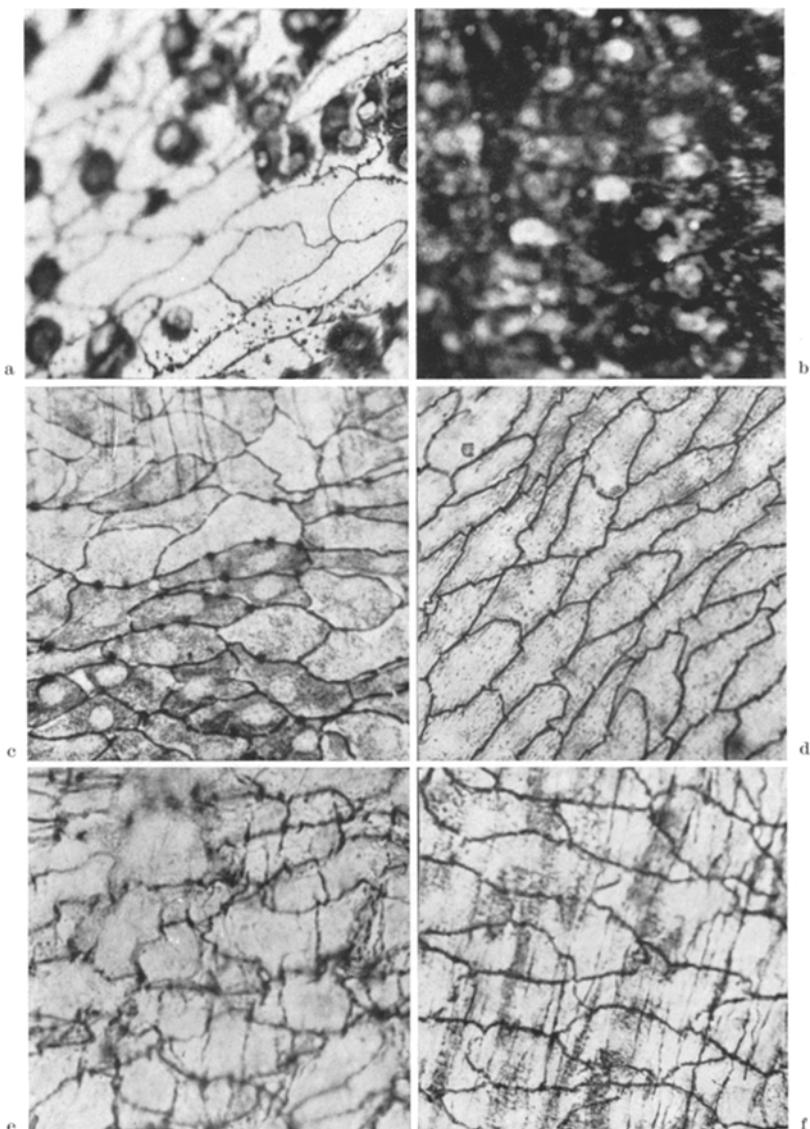


Abb. 2. a Kernaussparungen in zentral angefärbten Partien der Endothelzellen; b Kernaussparungen in lyophilisierten Venen; c oben Querlinien, unten Kernaussparungen, Ausschnitt mit typischem Bild, das sich in dieser Form längs der beobachteten Vene fortsetzt; d „Stachelbildungen“ an den Kittlinien; e Übergang der „Stachel“ in Querlinien; f die Querlinien sind fast ganz angefärbt, man erkennt daß die Stacheln dem Ansatz der Querlinien (Gitterfasern) an den Zellgrenzen entsprechen.
Alle Aufnahmen, bis auf 2e, sind 200mal vergrößert, Abb. 2e ist 315mal vergrößert

Wie Abb. 2c zeigt, kommen Schäden, die mit Anfärbung des Cytoplasma einhergehen und Schäden, die zur Anfärbung der Querlinien (Gitterfasern)

führen, oft gleichzeitig vor. Man sieht dann längs der Gefäßbachse Streifen mit Kernaussparungen, Streifen, in denen Querlinien sichtbar sind und fallweise auch Streifen, die ein Endothel von normaler Permeabilität aufweisen. Die normalen Streifen beginnen in leicht geschädigten Venen oft an Stellen, wo ein Seitenast einmündet und ziehen von dort als helles Band eine längere Strecke stromabwärts.

Wir haben ursprünglich angenommen, daß hier eine Unterschichtung der färbenden Silberlösung durch einströmendes Blut stattgefunden haben könnte, doch wurden solche Streifen auch beobachtet, wenn am herausgeschnittenen, eröffneten und ausgespannten Gefäß gefärbt wurde.

Besonders häufig haben wir Kernaussparungen an lyophilisierten Gefäßen beobachtet (Abb. 2 b). Wir haben Gefäße präpariert, aufgeschnitten, auf eine Korkplatte aufgespannt, mit 5%iger Dextroselösung abgespült und dann schnell in einen Glaskolben eingebracht, der in einer Kältemischung aus Kohlensäureschnee und Methylalkohol vorgekühlt war. Nach diesem schnellen Einfrieren wurden die Präparate im Vakuum bei Temperaturen unter 0° C getrocknet. Nach mehreren Wochen wurden die inzwischen bei Zimmertemperatur aufgehobenen trockenen Präparate mit Ringerlösung angefeuchtet und dann mit $\frac{1}{4}\%$ iger Silbernitratlösung gefärbt. Auch bei diesen devitalisierten Präparaten war eine schöne Kittlinienzeichnung zu sehen. Daneben zeigten alle Präparate eine ziemlich grobkörnige Cytoplasmaanfärbung und deutliche Kernaussparungen.

Die Zackenbildung der Kittlinien und ihr Zusammenhang mit den Querlinien

Als ersten und leichtesten Schädigungsgrad haben wir eine Zackenbildung der Endothelgrenzen beschrieben (GOTTLÖB und ZINNER). Durch diese Zackenbildung erhalten die Endothelzellen eine angedeutete Stechapfelform oder die Form von Stechpalmblättern.

Wir haben nachgewiesen, daß diese Erscheinung meist beobachtet wird, wenn man *in situ* oder an sehr frischen Präparaten färbt. Bei Färbung der bereits herausgeschnittenen Vene tritt diese Zackenbildung nur ausnahmsweise auf, an konservierten oder vor der Färbung devitalisierten Präparaten haben wir keine Zackenbildung mehr beobachten können. Wir haben angenommen, daß es sich bei diesem ersten Schädigungsgrad um einen passageren Reizzustand handelt. Ähnliche Zacken an Endothelzellen wurden bisher nur an Capillaren (VIM-TROP, ZIMMERMANN) und an der Aorta (EFSKIND) beobachtet. Unsere Mitteilung von der Zackenbildung an größeren Venen wurde kürzlich durch die Arbeit von ROBERTSON, MOORE und MERSEREAU bestätigt. Auch diese Autoren haben mit *in situ* gefärbten Venen gearbeitet.

Aufschlüsse über die Entstehung der Zackenbildung geben uns die Abb. 2d—2f. Abb. 2d zeigt an den Zellgrenzen dornartige Gebilde, durch die die Kittlinien stellenweise ein stacheldrahtartiges Aussehen erhalten. Die „Stachel“ finden sich vorwiegend an Stellen, an denen die Kittlinien einen Knick aufweisen. Abb. 2e zeigt, daß von diesen Stacheln Fortsätze ausgehen. Beobachtet man solche Präparate mit dem Mikroskop, so kann man bei ausgiebigem Spielen mit der Mikrometerschraube sehen, daß jede Kittlinienzacke einen solchen Fortsatz hat. Abb. 2f zeigt schließlich, daß diese Fortsätze den Gitterfasern der Basalmembran entsprechen, die als Querlinien sichtbar werden.

Aus diesen Befunden geht hervor, daß die Gitterfasern im Bereich der Kittlinien an der Intima ansetzen. Die Zackenbildung der Kittlinien dürfte die Folge einer Längenänderung der Gitterfasern sein. Wie weit diese Längenänderung durch Änderung des Quellungszustandes der Gitterfasern, durch Kontraktion der Gefäßmuskulatur oder durch andere Faktoren zustande kommt, bleibt noch offen.

Nach unseren bisherigen Erfahrungen scheint die Zackenbildung der Kittlinien zu beweisen, daß die Endothelen z.Z. der Silberfärbung vital waren.

Daß in einigen Präparaten nur Zacken, aber keine Querlinien sichtbar sind, in anderen Präparaten nur ein kurzer Dorn gesehen wird, der von der Kittlinie ausgeht und wieder andere Präparate die Querlinien vollständig erkennen lassen, ist mit dem verschiedenen Grad der Permeabilitätsstörung leicht zu erklären und steht mit unserer früher geäußerten Ansicht in Einklang, wonach der zweite Schädigungsgrad (Sichtbarwerden der Querlinien) als Folge einer pathologischen Durchlässigkeit der Gefäßwand für die färbende Silberlösung aufzufassen ist.

Zusammenfassung

In Ergänzung zu den in einer früheren Arbeit beschriebenen Zeichen der Zellschädigung, wie sie an silberimprägnierten Endothelen auftreten, wird eine Anfärbung des Cytoplasmas mit Aussparung des Zellkernes beschrieben. Dabei dürfte es sich um eine leichte Permeabilitätsstörung handeln, die ein Eindringen der Silberlösung in den Zelleib zuläßt. Die Gitterfasern der Basalmembran (Querlinien) setzen im Bereich der Kittlinien an den Endothelzellen an. Die früher beschriebene Zackenbildung (Stechapfelform) der Endothelen wird als Folge einer Verziehung der Zellgrenzen durch die in ihrer Länge veränderten Gitterfasern angesehen.

Summary

As a supplement to previous reports, the signs of cell damage are described as they appear with silver impregnation of endothelial cells. A staining of the cytoplasm occurs without nuclear impregnation. This difference might well represent a mild disturbance in permeability, allowing penetration of the silver solution into the cytoplasm. The reticulum fiber structure of the basement membrane (cross striations) are applied to the endothelial cells in the region of the cement lines. The formation of serrations (thorn-apple shape) of the endothelial cells is looked upon as a result of a distortion of the cell boundaries due to the reticulum fibers changing their length.

Literatur

- EFSKIND, L.: Die Regenerationsverhältnisse im Intimaendothel nach Gefäß-Sutur. *Acta chir. scand.* **84**, 283—309 (1941).
- GOTTLOB, R., u. G. ZINNER: (1) Zur pathologischen Histologie der Venenendothelen, dargestellt mit der Versilberungsmethode. *Virchows Arch. path. Anat.* **332**, 398—406 (1959). — (2) Über die Schädigung des Venenendothels durch verschiedene Noxen. *Wien. klin. Wschr.* **71**, 482—487 (1959).
- O'NEILL, J. F.: The effects on venous endothelium of alterations in the blood flow through the vessels in the vein walls and the possible relations to thrombosis. *Ann. Surg.* **126**, 270—288 (1947).
- ROBERTSON, H. R., J. R. MOORE and W. A. MERSEREAU: Observations on thrombosis and endothelial repair following application of external pressure to a vein. *Canad. J. Surg.* **3**, 5—16 (1959).
- SINAPIUS, D.: Über Grundlagen und Bedeutung der Vorversilberung und verwandter Methoden nach Untersuchungen am Aortenendothel. *Z. Zellforsch.* **44**, 27—56 (1956).
- VIMTROP, B.: Beiträge zur Anatomie der Capillaren. Zit. nach R. ALTSCHUL. Kopenhagen: Nielsen & Lydiche 1922.
- ZIMMERMANN, K. W.: Der feinere Bau der Blutcapillaren. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.* **68**, 83—108 (1923).