

Ultrastrukturelle Degenerationsvorgänge und Degranulierung extravasaler Leukocyten bei eitriger Keratitis

W. WESSEL

Pathologisches Institut der Universität Bonn (Direktor: Prof. Dr. H. HAMPERL)

Eingegangen am 4. Oktober 1966

Virulente, menschen-pathogene Shigellen vom Typ Flexneri 3 erzeugen eine eitrige Shigellen-Kerato-Conjunctivitis, die wegen ihres gesetzmäßigen Ablaufes als Entzündungsmodell nichtvascularisierter Gewebe gut geeignet ist (SERÉNY, 1955; RÁCZ u. TENNER, 1963; VOINO-YASENETSKY u. VOINO-YASENETSKAYA, 1962 u. a.). Die Keratitis erreicht nach den Versuchen von RÁCZ nach etwa 48 Std ihren Höhepunkt, um innerhalb weniger Tage wieder abzuklingen. Über die dabei auftretenden elektronenoptischen Veränderungen an den Gewebelementen der Cornea wurde bereits an anderer Stelle berichtet (WESSEL u. RÁCZ).

Die nach etwa 6 Std durch den Entzündungsreiz aus den Gefäßen des Limbus Corneae in größerer Zahl zwischen die Hornhaut-Lamellen einwandernden Leukocyten zeigen charakteristische Veränderungen. Dabei besteht der Vorteil, daß die von den Hornhaut-Lamellen eingeschlossenen, wie aufgereiht liegenden Leukocyten meist bis zu ihrem Untergang an etwa der gleichen Stelle liegenbleiben. Da gleichzeitig eine Exsudation von Leukocyten in den Conjunctivalsack erfolgt, ist es möglich, die degenerativen Vorgänge der im Gewebe liegenden Infiltrat-Leukocyten mit den frei auf der Cornea im Exsudat befindlichen, etwa gleichzeitig aus den Blutgefäßen ausgetretenen Exsudat-Leukocyten zu vergleichen.

Material und Methode

Virulente, rein gezüchtete Flexneri 3-Bakterien wurden in den Conjunctivalsack von 50 gesunden Meerschweinchen verimpft.

In Zeitabständen von 2—96 Std wurden die Tiere getötet, nachdem mit einer sterilen Platinöse Exsudat für die elektronenmikroskopische Untersuchung entnommen worden war.

Corneae und Exsudat wurden in gepuffertem Glutaraldehyd (Phosphatpuffer pH 7,4) 2 Std fixiert und mit 1%iger gepufferter Osmiumsäure nachfixiert. Die Blöcke schnitten wir mit einem LKB-Ultratom II und untersuchten die mit Bleicitrat nachkontrastierten Schnitte in einem Siemens-Elmiskop I.

Ergebnisse

Etwa 6 Std nach Einbringen der Shigellen in den Conjunctivalsack der Meerschweinchen wandern aus den Blutgefäßen der Conjunctiva Entzündungszellen in großer Zahl teils in das Corneagewebe zwischen die Lamellen der Substantia propria, teils in den Conjunctivalsack aus. Bei den Entzündungszellen im Gewebe („Infiltrat-Leukocyten“ = „IL“) handelt es sich fast ausschließlich um polymorphkernige Leukocyten bzw. um pseudoeosinophile Leukocyten, wie man sie bei vielen Nagern findet. In Giemsa- bzw. Pappenheim-Präparaten nimmt die Eosinophilie in den ersten 36 Std leicht zu, um später allmählich zu verschwinden. Die Entzündungszellen im Eiter des Conjunctivalsackes entsprechen ebenfalls polymorphkernigen Leukocyten („Exsudat-Leukocyten“ = EL), denen sich jedoch in späteren Stadien Makrophagen zugesellen.

I. Infiltrat-Leukocyten

Die Leukocyten, die nach etwa 6 Std vom Limbus corneae her in die erweiterten Saftspalten der Substantia propria auswandern, findet man anfangs nur zwischen den epithelnahen Hornhaut-Lamellen unter flachen Erosionen des Cornea-Epithels als dem Ort der stärksten Reizung. Die leukocytaire Infiltration dehnt sich nach 16—24 Std weiter aus, indem weitere aus den Capillaren des Limbus auswandernde Leukocyten von der Seite her an die früher ausgewanderten, unter den Erosionen liegenden Leukocyten heranrücken und dort ebenfalls liegenbleiben. Die dicht gefügten Hornhautlamellen und die nachfolgenden Zellen halten die zuerst eingewanderten Leukocyten bis zu ihrem Untergang an der gleichen Stelle fest. Auf diese Weise ist es möglich, an den unter den Erosionen zwischen den oberen Hornhautlamellen liegenden, zuerst eingewanderten Leukocyten Degenerationsvorgänge zu beobachten und diese zeitlich ziemlich genau einzuordnen.

Elektronenmikroskopisch sieht man nach 6 Std in den leicht erweiterten interlamellären Spalträumen Leukocyten von normaler Ultrastruktur neben schmalen Fortsätzen der Stromazellen.

12 Std nach Inoculation zeigen die Leukocyten bereits deutliche Veränderungen (Abb. 1). Während der Kern die normale Größe und Struktur aufweist, findet man eine zunächst noch geringe Schwellung des Cytoplasmas, welche im wesentlichen auf die Bildung zahlreicher, unscharf abgegrenzter, zusammenfließender vacuolärer Räume beruht. Diese Vacuolen sind unabhängig von Mitochondrien, dem endoplasmatischen Reticulum und anderen Cytoplasma-Organellen. Spezifische Granula sind in großer Zahl vorhanden, während azurophile Granula fehlen (BAINTON u. FARQUHAR, 1966). Die Granula nehmen bei der Nachkontrastierung reichlich Blei auf und erscheinen sehr kontrastreich. Unmittelbar neben den Granulocyten sieht man stets Fortsätze von Stromazellen, die sich als sehr widerstandsfähig gegen die entzündlichen Vorgänge in der Umgebung erweisen.

Nach 24 Std haben die IL in eigentümlich fleckförmiger Verteilung Flüssigkeit aufgenommen mit Ausbildung teilweise zusammenfließender, unregelmäßiger, nicht von einer Membran begrenzter Vacuolen (Abb. 2a). Im Innern der Vacuolen fällt eine angedeutete Netzstruktur auf, die z.T. die Lokalisation abgebauter, „verflüssigter“ Granula bezeichnet. Durch die Wasseraufnahme verlieren die Granulocyten ihre langgestreckte Form und runden sich immer mehr ab. Im Gegensatz zu Abb. 1 hat ein Teil der noch gut erkennbaren Granula die hohe Elektronendichte verloren und erscheint heller. Dabei verlieren sie die Homogenität und lassen eine feine Granulierung erkennen.

Als nächster Schritt des *Granula-Abbaus* erfolgt eine zunehmende Unschärfe der äußeren Begrenzung und eine weitere Abnahme des Kontrastes. Dann verschwindet die fein-granuläre Innenstruktur, und die Granula erscheinen homogen, am schließlich in den hellen, mit zunehmender Versuchsdauer größer werdenden vacuolären Räumen aufzugehen.

Mit Hilfe der drei Kriterien Elektronendichte, Innenstruktur (homogen bzw. feingranulär) und Abgrenzung (scharf bzw. unscharf) lassen sich die Granula der Abb. 2a in mehrere *Zerfalls-Stadien* einteilen, die offenbar von jedem Granulum durchlaufen werden: Im ersten Stadium besitzen die Granula die normale Struktur mit großer Elektronendichte, homogenem Bau und scharfer Abgrenzung; im zweiten nimmt die Dichte etwas ab, dafür tritt jedoch bei unserer Versuchsanordnung eine feine Granulierung hervor, bei scharfer Außenkontur der Granula. Im dritten Stadium bleiben Elektronendichte und Granulierung wie im zweiten, aber die Außenkontur erscheint teilweise oder in ihrer ganzen Circumferenz verwaschen. Im weiteren Verlauf des Abbaues verlieren die Granula ihren feingranulären Bau, so daß sie nunmehr hell, homogen und unscharf abgegrenzt erscheinen. Im letzten morphologisch faßbaren Stadium sieht man nur noch ringförmig begrenzte, strukturlöse Gebilde.

Der Abbau der Granula greift von den anfänglich aufgetretenen, unscharf abgegrenzten *vacuolären Räumen* (Abb. 1) allmählich um sich und bezieht die unmittelbar anliegenden Granula in den Zerfall ein. Die am weitesten fortgeschrittenen Zerfalls-Stadien liegen meist



Abb. 1. Polymorphkerniger Leukozyt, 12 Std nach Verimpfung der Bakterien, in einem interlamellären Spaltraum der Substantia propria der Cornea. Zahlreiche neutrophile Granula (G)/(Lysosomen) mit scharfer Abgrenzung und sehr dichtem, homogenem Bau. Daneben beginnende vacuoläre Auflockerung des Cytoplasmas. Vacuoläre Räume (V) nicht an Mitochondrien oder endoplasmatisches Reticulum gebunden, unscharf begrenzt. Kernsegmente (K) hintereinander angeordnet. Neben den Leukozyten schmale Fortsätze (F) der Stromazellen und Anschnitte kollagener Fibrillen (Fi) der Substantia propria. Vergrößerung: 32 000fach

den vacuolären Räumen direkt an, während die noch elektronendichten, gut abgegrenzten Granula in den erhaltenen, nicht vacuolisierten Cytoplasma-Anteilen liegen (Abb. 2a). In einem weiter fortgeschrittenen Stadium der Leukozyten-Degeneration findet man große, zusammenfließende Vacuolen, die durch schmale Stränge erhaltenen Cytoplasmas getrennt werden. Der Anteil der dichten, homogenen Granula ist meist deutlich vermindert. Oft sieht

man nur noch ein einziges dichtes Granulum neben zahlreichen kontrastärmeren, im Abbau befindlichen Granula. Manchmal dringen die Leukocyten von den ausgeweiteten interlamellären Spalträumen aus mit schmalen Cytoplasma-Fortsätzen in die angrenzenden Hornlamellen vor. Dabei lassen die von den Leukocyten-Fortsätzen teilweise eingeschlossenen kollagenen Fibrillen der Substantia propria keine degenerativen Veränderungen erkennen und erweisen sich als sehr widerstandsfähig. Die Zellfortsätze sind meist frei von intakten Granula und enthalten helle, vacuoläre Bezirke. Auf der Innenseite der Zellmembran findet man stets einen schmalen, dichten Cytoplasmasaum.

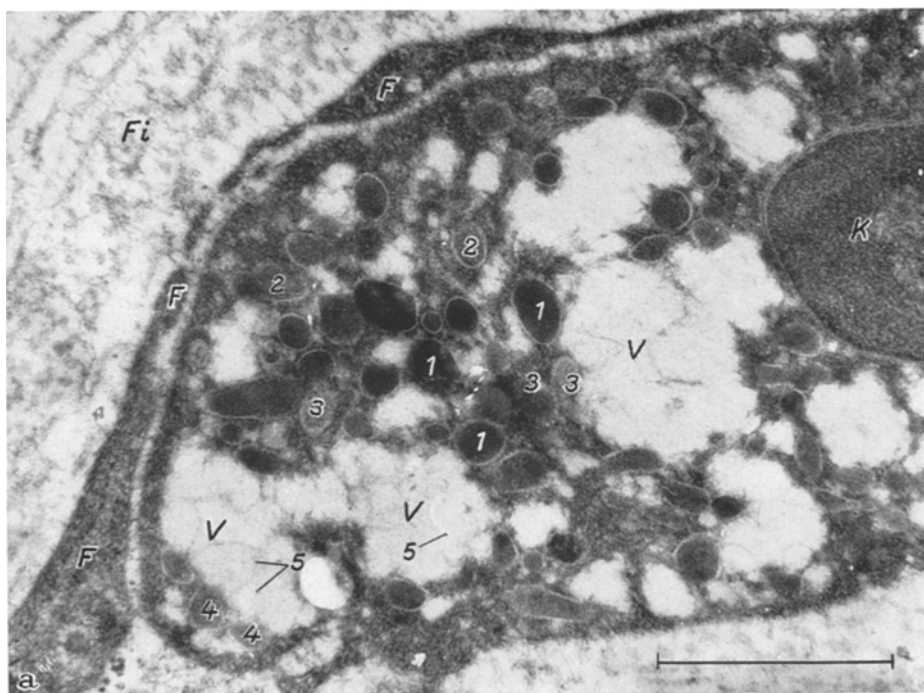


Abb. 2a. Polymorphkerniger Leukocyt in der Substantia propria, 24 Std nach Verimpfung der Bakterien. Auftreibung des Leukocyten durch Cytoplasma-Schwellung. Neutrophile Granula in verschiedenen Zerfalls-Stadien: Vereinzelte normale, dichte, homogene, gut abgegrenzte Granula (1); daneben etwas hellere, feingranulierte (2), die z.T. unscharf abgegrenzt sind (3); ferner kontrastarme, homogene Granula mit unscharfer Begrenzung (4) und Auflösung. Die vacuolären Räume (V) schließen mehrere Ringstrukturen ein (5), bei denen es sich offenbar um zerfallene Granula handelt. Zellkern (K); Fortsätze (F) einer Stromazelle; teils quer und teils längs getroffene kollagene Fibrillen (Fi). Vergrößerung: 30 000fach

Nach 36 Std (Abb. 2b) haben die vacuolären Räume erheblich an Größe zugenommen, und ihr Inhalt, der in früheren Stadien keinen elektronenmikroskopischen Kontrast besitzt, erscheint dichter und stellenweise „klumpig“. Die inselartig beisammen liegenden neutrophilen Granula haben insgesamt ihre hohe Elektronendichte verloren und weisen einen feinkörnigen Bau sowie eine teilweise verwaschene äußere Begrenzung auf. Die besser erhaltenen, Granula einschließenden Cytoplasma-Anteile lassen stets eine enge örtliche Beziehung zum Zellkern erkennen (Abb. 3 und 4), der meist sogar inmitten solcher „Cytoplasma-Inseln“ liegt.

Bei fortschreitender Alterung fließen nach 48 Std die hellen vacuolären Zonen zu einem Ring bzw. einer Kugelschale zusammen, die meist den Kern und kleine Reste erhaltenen Cytoplasmas einschließt. Dadurch entsteht in den Zellen eine deutliche Schichtung: In der Zellperipherie sieht man an der Innenseite der Zellmembran einen schmalen elektronendichten Cytoplasma-Saum, dem sich nach innen die oben erwähnte helle „Kugelschale“ anschließt. Das Zentrum der Zelle wird vom Kern und einer diesem anliegenden Cytoplasmazone mit zahlreichen Granula aller Zerfallsstadien eingenommen. Vielfach wird jedoch der Kern mit der angrenzenden Cytoplasmazone seitlich abgedrängt und liegt dicht an der Zell-

membran, sodaß siegelringähnliche Bilder entstehen. In Abb. 3 sind in einer Übersichtsaufnahme mehrere, durch die hochgradige Cytoplasma-Schwellung abgerundete Leukocyten in einem interlamellären Spaltraum der Substantia propria dargestellt. Das entzündliche Ödem hat den Spaltraum so stark ausgedehnt, daß die Leukocyten, ihrer Oberflächenspannung folgend, Kugelform annehmen können. Die Spalträume enthalten vereinzelt Stromazellen, die im Gegensatz zu den IL keine degenerativen Veränderungen aufweisen. In jedem Stadium lassen sich Stromazellen und IL im Elektronenmikroskop deutlich voneinander unterscheiden. In den Leukocyten nehmen die vacuolären Bezirke oft 70 % des Zellvolumens ein, wobei der

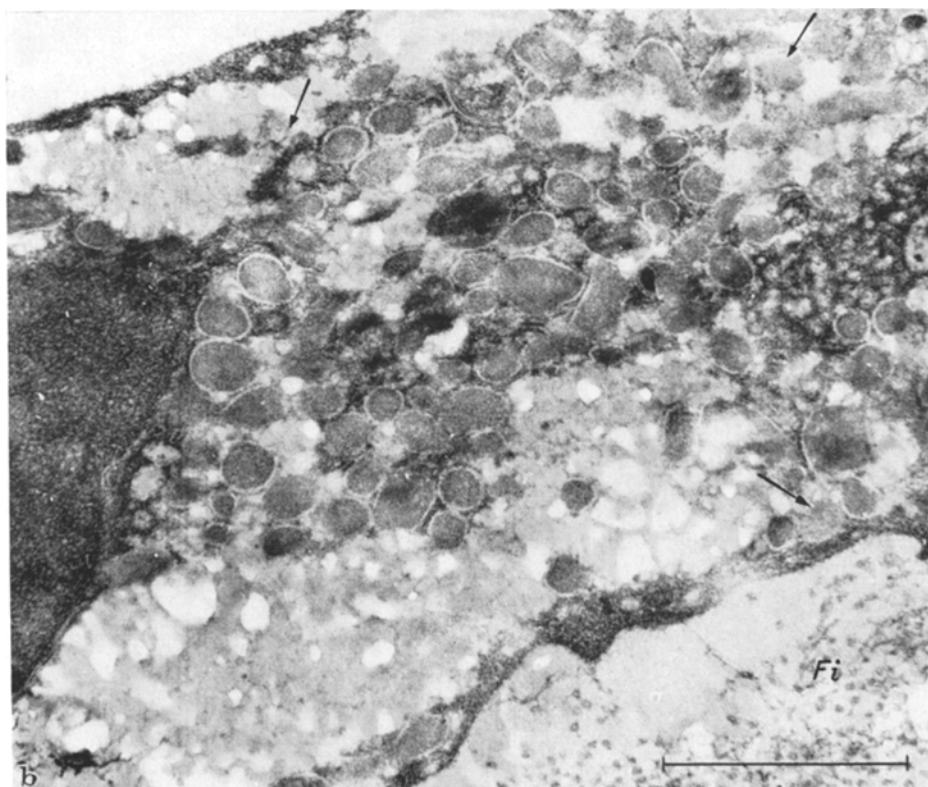


Abb. 2b. Leucocyt nach 36 Std in der Substantia propria. Die Cytoplasma-Vacuolen haben sich zu großen Bezirken vereinigt, die mantelartig das Kernsegment und den damit in Verbindung stehenden, besser erhaltenen Cytoplasma-Bereich umschließen. Der Vacuolen-Inhalt erscheint gegenüber Abb. 2a dichter. Die Granula besitzen eine feinkörnige Struktur bei geringem Kontrast. Einzelne Granula gehen in den vacuolären Bezirk über (\leftrightarrow). An der Innenseite der Zellmembran ein dichter Cytoplasma-Saum mit in Auflösung begriffenen Granula. Um den Leucocyten eine Ödemzone mit einzelnen auseinander gedrängten kollagenen Fibrillen (Fi). Vergrößerung: 32000fach

Zerfall der letzten Granula weiter fortschreitet, wie es die Abb. 4 mit starker Vergrößerung zeigt. Hier wird deutlich, daß die Granula nicht etwa aufbrechen und sich der Inhalt in den großen vacuolären Raum ergießt, sondern sich ihr Kontrast langsam vermindert und die Außenkontur auf der Seite der großen Vacuole allmählich aufgelöst wird und das Granulum schließlich in der Vacuole verschwindet. Da diese letzten Stadien in den Bildern relativ selten angetroffen werden, ist anzunehmen, daß sie sehr schnell, wahrscheinlich in wenigen Minuten, ablaufen.

Neben den IL fällt oft eine Ödemzone auf, die stellenweise zerfallende kollagene Fibrillen der Substantia propria enthält (Abb. 4).

Nach 96 Std weisen zahlreiche Leukocyten bereits die Zeichen des Zelluntergangs mit Aufbrechen der Zell- und Kernmembran auf. Daneben finden sich aber auch Zellformen, die sich durch Wasseraufnahme stark abgerundet haben und im wesentlichen von einem einzigen

großen, vacuolären Raum eingenommen werden. Der Zellkern ist an den Rand gedrängt, die Organellen lassen sich im Elektronenmikroskop nicht mehr scharf abbilden als Zeichen ihrer beginnenden Auflösung. Die Abb. 5 stellt einen derartigen Leukocyten dar, bei dem sich auch in dem besser erhaltenen, perinucleären Cytoplasmabereich nur angedeutet Granula erkennen lassen. Hier fällt weiter auf, daß die in ihren peripheren Anteilen osmiophilen Kernsegmente ein leicht aufgelockertes, helleres Zentrum besitzen.

Um einen Eindruck von der Geschwindigkeit des Granula-Abbaues (Degranulierung) zu gewinnen, ermittelten wir mit morphometrischen Methoden (WEIBEL, 1963) den *Volumen-Anteil der Granula am Gesamt-Volumen des Cytoplasmas*. Dazu wurden für jeden der in Abb. 6 eingetragenen Stundenwerte 50 Zellen ausgemessen. Bei normalen, noch intravasalen Leukocyten von Kontrolltieren stellten wir einen Volumen-Anteil von durchschnittlich 28 % am

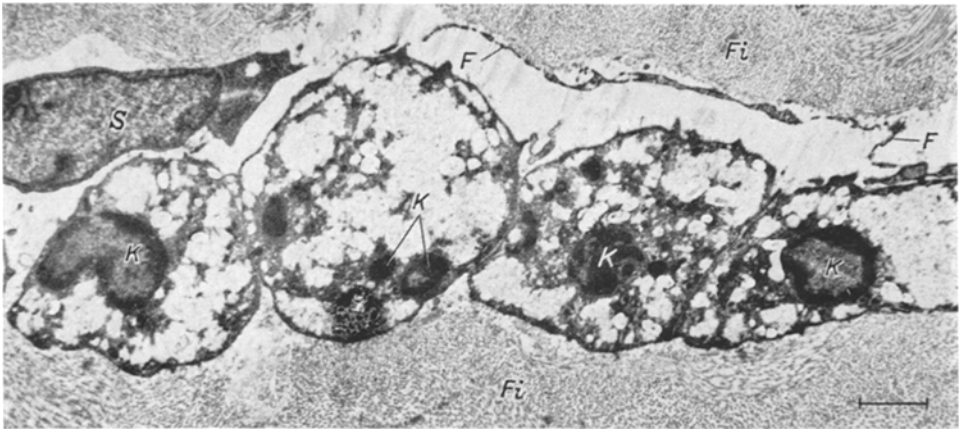


Abb. 3. Übersichtsaufnahme der Substantia propria nach 48 Std. Im interlamellären Spaltraum vier Leukocyten mit starker Vacuolisierung des Cytoplasmas. Die Leukocyten haben Kugelform angenommen. In den vacuolären Bezirken insel- und netzartig angeordnete Reste erhaltenen Cytoplasmas. Kernsegment (*K*) im Zentrum oder an die Peripherie gedrängt. Oberhalb der Leukocyten eine Stromazelle (*S*), die im Gegensatz zu den Leukocyten keine wesentlichen degenerativen Veränderungen aufweist. Daneben schmale Stromazell-Fortsätze (*F*) in dem durch Ödemflüssigkeit erweiterten Spaltraum. Kollagene Fibrillen (*Fi*). Vergrößerung: 8 000fach

Cytoplasma-Volumen fest, der in der Cornea innerhalb von 12 Std auf 24 % abgesunken war. Nach 36 Std setzt ein starker Granula-Verlust ein, der offenbar mit dem Tod der Zellen einhergeht. Die Granula lassen sich in einzelnen Zellen zwar noch nach 96 Std schattenhaft und unscharf darstellen, doch weisen die Zellen Unterbrechungen der Kern- und Zellmembranen als Zeichen des Todes auf. Es ist bei der Degranulations-Kurve jedoch zu berücksichtigen, daß es sich bei den Ordinaten-Werten um einen Quotienten handelt, der nicht nur durch die Verminderung der Granula, sondern zusätzlich noch durch die Cytoplasma-Schwellung steil abfällt.

II. Exsudat-Leukocyten

Die Leukocyten im freien Exsudat des Conjunctivalsackes lassen ganz andere Veränderungen erkennen als die nach gleichen Versuchszeiten parallel fixierten und eingebetteten Leukocyten in der Substantia propria.

Im Gegensatz zu den Leukocyten im Gewebe beginnen die Veränderungen am Zellkern. Bereits nach 12 Std haben die Kerne die typische Elektronendichte verloren und erscheinen homogen, schwach kontrastiert mit etwas dichterem Randsaum. Der perinucleäre Spaltraum weitet sich stark aus. In der Zellperipherie bildet sich eine ringartige, helle, vacuoläre Zone 12–24 Std nach Verimpfung der Shigellen (Abb. 7). Die Cytoplasma-Organellen stellen sich nicht mehr so kontrastreich und scharf dar wie bei den gleichaltrigen Leukocyten in der Substantia propria. Die Granula sind schwach osmiophil und werden von einem hellen Hof umgeben. Ihr Zentrum hellt sich mehr und mehr auf, während die scharfe Außenkontur bestehenbleibt.

In Abb. 7 ist die Schwellung des Cytoplasmas weiter fortgeschritten, die Granula sind kontrastärmer und leicht vergrößert. Ein flach angeschnittener, perinucleärer Raum enthält ein tangential getroffenes Stück eines Kernsegments, welches den Bau der Kernbegrenzung

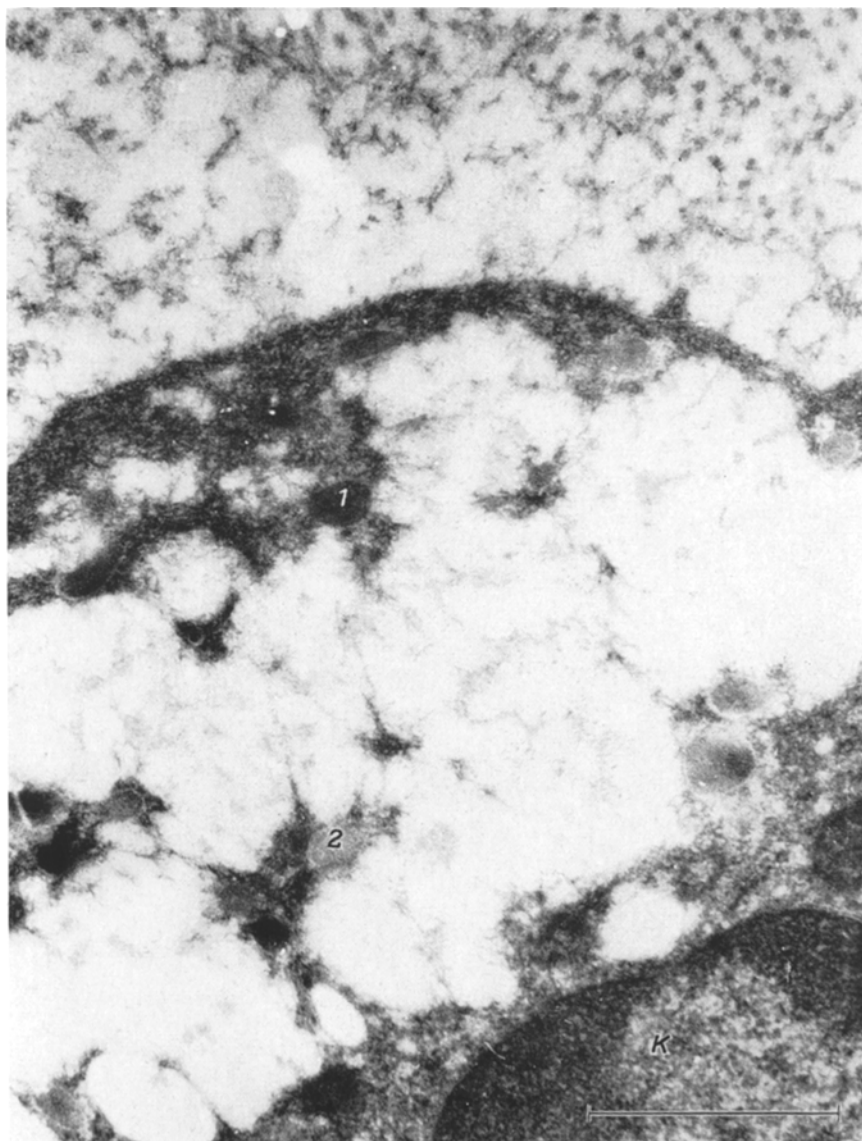


Abb. 4. Teil eines Leukocyten nach 48 Std in der Substantia propria mit stärkerer Vergrößerung. Um den Zellkern (*K*) eine ausgedehnte vacuoläre Zone mit einzelnen, teils noch gut abgegrenzten, dichten (*1*), teils mit hellen, in Auflösung befindlichen Granula (*2*). An der Zellmembran ein schmaler, stark kontrastierter Cytoplasma-Saum. Außen am Leukocyten eine Ödemzone mit Abbau einzelner kollagener Fibrillen. Vergrößerung: 33 000fach

erkennen läßt. Einem äußeren homogenen, weniger dichten Saum folgt nach innen eine schmale, fast membranartige, stark osmiophile Zone mit „Kernporen“. An den orthograd getroffenen Kernsegmenten zeigt sich bereits eine vermehrte Osmiophilie, die in den nächsten 12 Std erheblich zunimmt. Gleichzeitig lassen die Kernsegmente eine deutliche Kondensation erkennen, die zu einer starken Ausweitung des perinucleären Raumes führt (Abb. 8a). Das

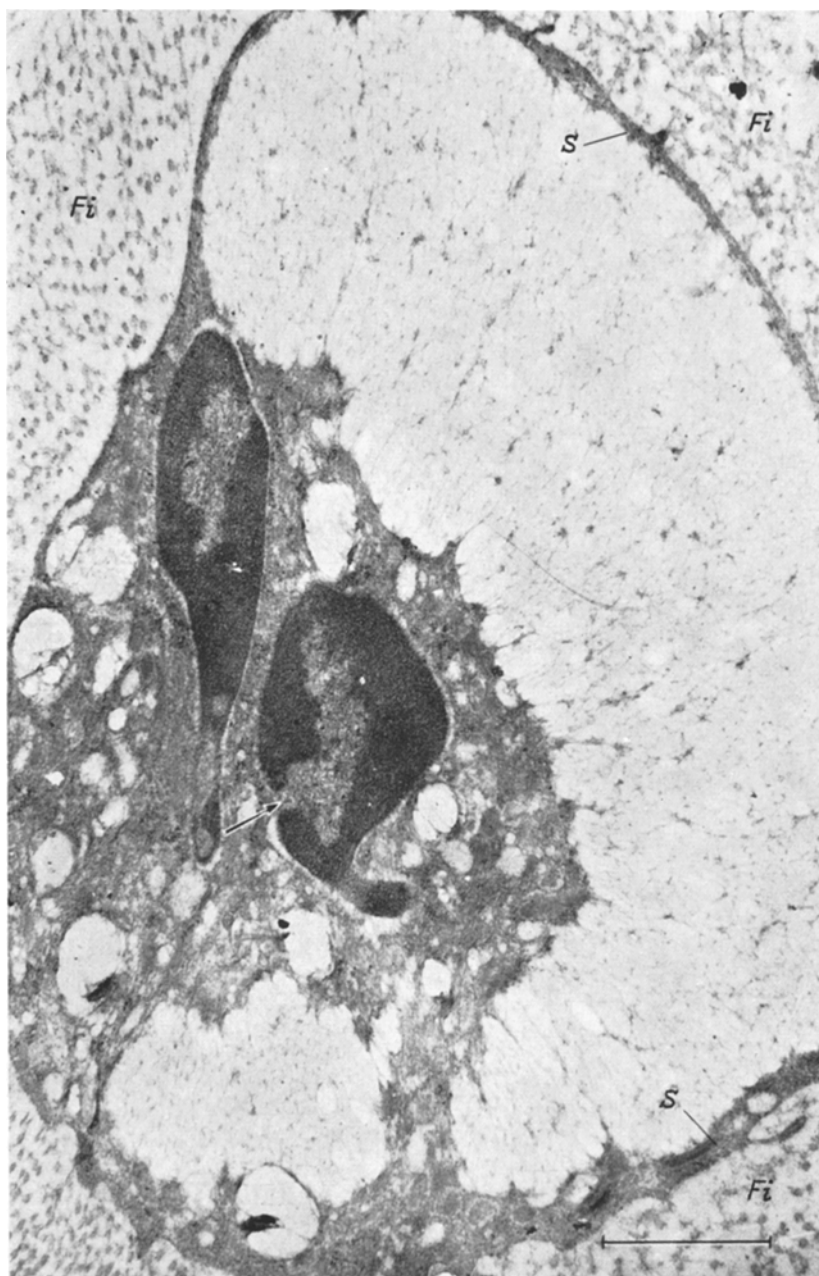


Abb. 5. Leukocyt in der Substantia propria, 96 Std nach Verimpfung der Shigellen. Die vacuolären Räume sind zu einem großen, auf dem Anschnitt halbmondförmigen Bezirk zusammengefloßen und enthalten angedeutete Ringstrukturen. An der Innenseite der Zellmembran ein schmaler dichter Cytoplasma-Saum (S). Um die exzentrisch liegenden Kernsegmente dichte Cytoplasma-Anteile, die sich infolge des Zerfalls der Organellen nicht mehr scharf abbilden lassen. Die Kernmembran ist an einer Stelle aufgebrochen (→) als Zeichen des Zelltodes. In der Umgebung des Leukocyten kollagene Fibrillen (Fi) mit ödematös aufgelockerter Zwischensubstanz.

Vergrößerung: 22000fach

Cytoplasma enthält zahlreiche Phagocytose-Vacuolen, die z.T. Reste abgetöteter Shigellen einschließen. Bei etwas besser erhaltenen Zellen kann man mitunter sehen, daß neben den Phagocytose-Vacuolen liegende Granula gewissermaßen am Rand aufbrechen und ihren Inhalt in die Vacuole ergießen (Abb. 8b).

Nach 48 Std werden die Kernsegmente größer und heller, womit sich der endgültige Zerfall der Zellen ankündigt. Im Cytoplasma lassen sich Organellen nicht mehr identifizieren.

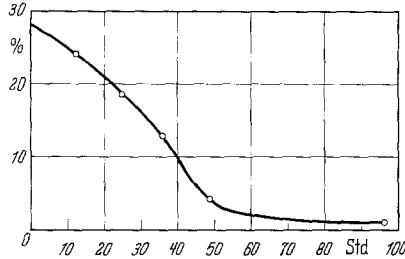


Abb. 6. Abnahme des Gesamt-Volumens der Granula in den Leukocyten der Substantia propria nach Austritt aus den Blutgefäßen. Auf der Ordinate ist der Vol.-Anteil der Granula am Gesamt-Cytoplasma in % aufgetragen. Die Abszisse gibt die Zeit nach der Verimpfung der Shigellen in Stunden an



Abb. 7. „Exsudat-Leukocyt“ nach 12 Std mit stark verändertem Kern und Cytoplasma als Zeichen des Zelltodes. Homogenisierung des Kernes (K). Der in einem erweiterten, tangential getroffenen, perinucleären Spaltraum liegende Kern-Anschnitt (KA) zeigt den Aufbau der Kerngrenze mit heller Außenzone und darunter liegendem, dichtem, schmalen Saum. Die Granula (G) haben ihren starken Kontrast verloren und lassen sich nicht mehr scharf abbilden. In der Peripherie des Cytoplasmas hat sich eine breite Ödemzone gebildet (OZ).

Vergrößerung: 26000fach

Die phagocytierten Shigellen haben ihre, aus mehreren Schichten bestehende, dichte äußere Membran verloren und zeigen eine starke Auflockerung, die zu einer erheblichen, auch lichtmikroskopisch sichtbaren Größenzunahme führt. Im Innern der Bakterien fällt eine feinkörnige Struktur mit sehr starker Osmiophilie auf, die wohl auf eine Depolymerisation der Desoxyribonucleo-Proteide mit Freiwerden aktiver Gruppen zurückzuführen ist.

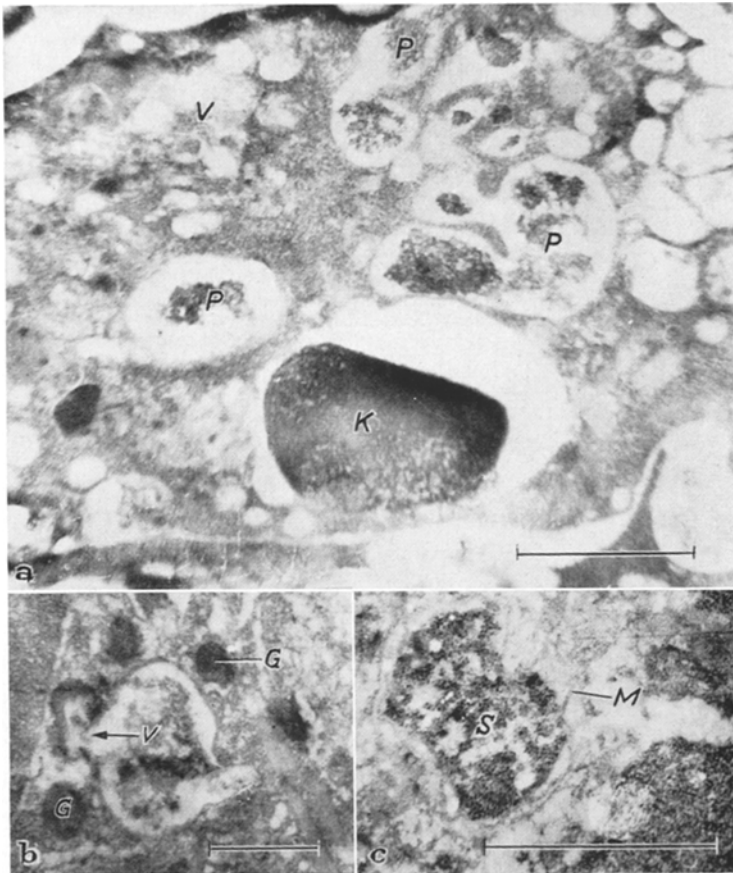


Abb. 8a. Teil eines „Exsudat-Leukocyten“ nach 24 Std. In den bereits abgestorbenen Zellen wird der Kern (K) durch Depolymerisation der Desoxyribonucleo-Proteide wieder stark osmiophil. Der perinucleäre Spalraum ist stark erweitert. Die Granula haben sich aufgelöst. An ihrer Stelle findet man nur noch Vacuolen (V), die z.T. noch ein granuläres Material enthalten. Phagocytose-Vacuolen mit phagocytiertem Material (P).

Vergrößerung: 23 000fach

Abb. 8b. Teil eines Leukocyten mit Phagocytose-Vacuole (V), in die sich der Inhalt eines an einer Seite aufgebrochenen Granulums entleert (→). Daneben weitere intakte Granula (G). Vergrößerung: 14 000fach

Abb. 8c. Teil eines „Exsudat-Leukocyten“ mit einem im Abbau befindlichen Bakterium „S“ (Shigella). Die gewunden verlaufende Bakterien-Membran (M) stellt sich nur noch schwach dar. Das Plasma des Bakteriums erscheint stark aufgelockert mit kleinen Ansammlungen dichter, runder Elemente von 80 Å Durchmesser.

Vergrößerung: 31 000fach

Die Abbauvorgänge der „Exsudat-Leukocyten“ unterscheiden sich also nach Art und Geschwindigkeit deutlich von denen der „Infiltrat-Leukocyten“. Bei den Infiltrat-Leukocyten vollzieht sich der Abbau protrahiert, etwa über 36 bis 48 Std, so daß man die einzelnen Stadien der Degeneration gut verfolgen kann; demgegenüber weisen die Exsudat-Leukocyten infolge der direkten Einwirkung der Shigellen-Toxine bereits nach 12 Std deutliche Zeichen des Zelltodes auf; nach

24 Std befinden sie sich in voller Auflösung. Die bei der Degranulierung auftretenden Unterschiede sind vor allem dadurch gegeben, daß der Abbau der Granula bei den „Infiltrat-Leukocyten“ als vitale Reaktion auftritt, während sie bei den frühzeitig absterbenden „Exsudat-Leukocyten“ meist im Rahmen der Autolyse erfolgt. Im einzelnen kann man bei einem Vergleich der „Infiltrat-“ mit den „Exsudat-Leukocyten“ folgende Unterschiede feststellen:

Die Kerne der „Infiltrat-Leukocyten“ sind anfangs sehr dicht und homogen. Nach 36—48 Std erscheinen sie feinkörnig. Bis zur vollständigen Auflösung bleibt der perinucleäre Spaltraum eng. Bei den Exsudat-Leukocyten ist bereits nach 12 Std der perinucleäre Raum stark erweitert. Die Kerne haben den starken Kontrast verloren und besitzen ein homogenes Aussehen.

Das *Cytoplasma* der „Infiltrat-Leukocyten“ ist gekennzeichnet durch eine multizentrische Bildung kleiner vacuolärer Räume, die zu den Organellen keine Beziehung haben. Sie fließen später zu größeren, unscharf abgegrenzten Vacuolen zusammen, bis schließlich unter starker Wasseraufnahme und kugeliger Umformung der vorher langgestreckten Zellen eine deutliche Schichtung mit breiter vacuolärer Randzone und einem dichten Zentrum entsteht. Das dichte Zentrum enthält neben Resten eines noch erhaltenen, granularen Cytoplasma-Bezirktes die einzelnen Kern-Segmente. Am Ende der Versuche nimmt das dichte Zentrum nur noch etwa 10% der Zellen ein. — Die „Exsudat-Leukocyten“ lassen die multizentrische, feine Vacuolisierung des Cytoplasmas vermissen. Es fehlt ferner die breite vacuoläre Randzone in den Endstadien. Vielmehr kommt es gleich in den ersten Stunden zum Absterben der Zellen mit weitgehendem Verlust der Abbildungsschärfe und der Osmiophilie der Cytoplasma-Strukturen.

Von besonderem Interesse sind die Veränderungen der *Granula* bzw. die Degranulierung der „Infiltrat-Leukocyten“. Dieser Vorgang vollzieht sich so langsam, daß man hier mehrere Stadien vom homogenen dichten, scharf begrenzten, bis zum teilweise feinkörnigen, hellen, unscharf abgegrenzten Granulum unterscheiden kann. Die Granula gehen schließlich in den sich vergrößernden vacuolären Räumen auf, in denen sie nach 48 Std noch als angedeutete Ringstrukturen erkennbar sind. Wir haben versucht, die Granula, die sich in den einzelnen Abbau-Stadien befinden, zahlenmäßig zu erfassen, um von den prozentualen Anteilen der Stadien auf ihre Dauer schließen zu können. Die Ergebnisse sind jedoch so uneinheitlich, daß sie sich nicht verwerten lassen. Bei den „Exsudat-Leukocyten“ läßt sich eine Stadien-Einteilung durch den schnellen Tod der Zellen nicht durchführen. Die Granula können sich gelegentlich an Phagocytose-Vacuolen anlegen und ihren Inhalt nach Aufbrechen der äußeren Begrenzung in die Phagocytose-Vacuole entleeren. Meist jedoch verschwinden die Granula allmählich nach dem Tod der Zellen, nachdem sich in ihrem Zentrum eine kontrastarme Zone ausgebildet hat. Bereits nach 24 Std sieht man anstelle der Granula nur noch leere oder mit einem feinkörnigen Material teilweise gefüllte Vacuolen. Auffallend ist, daß die nach 12 Std in den „Exsudat-Leukocyten“ enthaltenen Bakterien starke Auflösungserscheinungen erkennen lassen, während die in den Epithelzellen der Cornea eingeschlossenen Bakterien zur gleichen Zeit ihre Struktur bewahrt haben und offenbar lebensfähig sind. Eine ähnliche Beobachtung machten TAKEUCHI u. Mitarb. (1965), die bei experimenteller Shigellen-Ruhr gut erhaltene Bakterien in Darm-Epithelzellen fanden, während die von Leukocyten phagocytierten

Bakterien schnell abgebaut wurden. Die in Abb. 8b dargestellte Fusion eines Granulums mit einer Phagocytose-Vacuole wurde auch von LOCKWOOD und ALLISON (1963) an Kaninchen-Granulocyten nach Aufnahme von Pneumokokken beobachtet.

Diskussion

Über die schließlich zum Zerfall führenden Vorgänge an Leukocyten liegen bereits einige licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen vor. HIRSCH und COHN (1960) sowie ZUCKER-FRANKLIN und HIRSCH (1964) inkubierten aus einem peritonealen Reiz-Exsudat von Kaninchen gewonnene polymorphkernige Leukocyten mit Staphylokokken und Zymosan-Partikeln. Innerhalb weniger Minuten wurden Bakterien bzw. Zymosan-Partikel von den Leukocyten phagocytiert. An die Phagocytose-Vacuolen gaben die Zellen spezifische Granula ab, die sich schnell auflösten. ZUCKER-FRANKLIN und HIRSCH (1964) geben zwei Bedingungen an, unter denen eine Degranulierung der Leukocyten erfolgt, und zwar einmal die Einwirkung von Bakterien-Toxinen, die zu einem schnellen Zelltod führt, und zum anderen die Phagocytose von Mikroorganismen oder unbelebten Teilchen. Die Degranulierung durch Bakterien-Toxine mit schnellem Zelltod trifft für unsere „Exsudat-Leukocyten“ zu, bei denen alle Granula gleichzeitig in wenigen Stunden verschwinden. Die „Infiltrat-Leukocyten“ hingegen lassen einen anderen Degranulierungs-Mechanismus erkennen: Bei diesen Leukocyten, die längere Zeit im O_2 -armen Milieu eines bradytrophen Gewebes liegen und von Ödem-Flüssigkeit umgeben werden, geht der Abbau allmählich vor sich, und zwar ohne daß Bakterien oder andere Partikel phagocytiert werden. Mit der Degranulierung geht eine Flüssigkeits-Aufnahme einher, wobei unklar ist, ob die Degranulierung durch die Flüssigkeits-Aufnahme ausgelöst wird oder umgekehrt. Die Einlagerung von Wasser mit Aufhellung des Cytoplasmas und Zusammenrücken der Kernsegmente wurde auch lichtmikroskopisch bei extravalen Leukocyten in der Clarkschen Kammer beobachtet (FLOREY, 1962).

POLICARD u. Mitarb. (1959) konnten eine Degranulierung erzeugen, indem sie SiO_2 intratracheal verabfolgten. Die durch diesen Reiz angelockten Leukocyten blieben etwa 24–48 Std lebensfähig und enthielten im Endstadium zahlreiche Fetttropfen. Die Aufnahme der Si-Partikel soll erst nach Verschwinden der Granula erfolgt sein. Da in unserem Falle keine Fetttropfen im Cytoplasma auftreten, möchten wir annehmen, daß die Fettsubstanzen von außen aufgenommen und nicht von den Leukocyten selbst gebildet wurden.

Entsprechend den Anschauungen von DE DUVE (1959) und NOVIKOFF (1961) wird allgemein angenommen, daß die Außenmembranen der Granula (Lysosomen) die Einwirkung der in ihnen enthaltenen, sehr wirksamen hydrolytischen Enzyme auf das übrige Cytoplasma, und damit den sofortigen Zelltod, verhindern. Eine schnelle Autolyse müßte die Folge der intracytoplasmatischen Auflösung der Granula sein („suicide bags“, DE DUVE). Erfolgt die Auflösung der Granula nach Abgabe an Phagocytose-Vacuolen wie bei den Versuchen von ZUCKER-FRANKLIN und HIRSCH (1964), SBARRA u. Mitarb. (1964) u. a., so verhindert die Vacuolen-Membran die Rückwirkung der aus den Granula freiwerdenden Enzyme auf das Cytoplasma. In unserem Fall lösen sich die Granula jedoch auf, ohne daß sie an Phagocytose-Vacuolen abgegeben und ohne daß die frei werdenden Substanzen durch eine sichtbare Membran vom übrigen Cytoplasma getrennt werden. Man

sollte erwarten, daß die Zellen der sofortigen Autolyse verfallen müßten. Da dies nicht der Fall ist, muß man annehmen, daß *die Auflösung der Granula und die Aktivierung ihrer Enzyme zwei Vorgänge sind, die nicht gleichzeitig zu erfolgen brauchen.*

Die Degranulierung kann also auf dreierlei Weise erfolgen: Einmal können sich die Granula unabhängig von Phagocytose-Vacuolen im Cytoplasma auflösen und zusammenfließende, nicht von einer Membran abgegrenzte vacuoläre Räume bilden wie bei unseren „Infiltrat-Leukocyten“. Zweitens können die Granula an Phagocytose-Vacuolen abgegeben und in diesen aufgelöst werden, wie wir es gelegentlich bei den „Exsudat-Leukocyten“ sahen und es besonders von ZUCKER-FRANKLIN und HIRSCH (1964), HIRSCH und COHN (1960) sowie BREWER (1963) in Leukocyten eines Exsudates gefunden wurde. Bei der dritten Möglichkeit der Degranulierung verfallen die Leukocyten dem schnellen Zelltod, und es erfolgt eine gleichmäßige und gleichzeitige Auflösung der Granula wie bei der Mehrzahl unserer „Exsudat-Leukocyten“. In einer kürzlich erschienenen Arbeit hat ORFANOS (1966) die Degranulierung reifer Mastzellen beschrieben, bei denen die Granula im Gegensatz zu polymorphkernigen Leukocyten, nach Art einer merokrinen Sekretion vom Cytoplasma an das Interstitium abgegeben werden („sekreterische Degranulierung“).

Unsere Befunde erlauben schließlich eine Stellungnahme zur Frage der extravasalen Lebensdauer der Leukocyten.

Die der Literatur zu entnehmenden Angaben über die Lebensdauer betreffen vor allem statistische Werte an intravasalen Leukocyten. Sie schwanken zwischen wenigen Minuten bis zu 12,8 Tagen, je nachdem, mit welcher Methode sie bestimmt wurden (KOMIYA, 1959). Die kurzen Zeiten wurden vor allem nach Transplantation markierter Leukocyten ermittelt. BRECHER u. Mitarb. (1959) betonen aber, daß die auf diese Weise ermittelte Lebensdauer zu niedrig liegt, da durch den extravasalen Aufenthalt und die Transplantation in ein neues, eventuell sogar artfremdes Milieu eine starke Zellschädigung gesetzt wird. Demgegenüber betragen die Werte, die man nach Injektion radioaktiver Isotope wie P^{32} , Fe^{59} und H^3 -Thymidin ermittelte, einheitlich 9 Tage. Während bei den intravasalen Leukocyten im allgemeinen nur statistische Werte zu erhalten sind, kann man die extravasale Lebensdauer an einzelnen Leukocyten bestimmen. Sie beträgt in Suspensionen von peritonealen Reiz-Exsudaten sowie unter den Bedingungen der Clarkschen Kammer mehrere Tage (FLOREY, 1962). In Zellkulturen waren nach 8 Tagen noch 30% der Leukocyten lebensfähig (BRECHER u. Mitarb., 1959).

Nach unseren Versuchen dürfte die Lebensdauer der Leukocyten im Gewebe durchschnittlich etwa 36—48 Std nach ihrem Austritt aus den Blutgefäßen betragen, während wir nach 4 Tagen sichere Zeichen des Zelltodes, wie das Aufbrechen von Kern- und Zellmembran, fanden. Die „Exsudat-Leukocyten“ hingegen waren bereits 12 Std nach ihrem Austritt abgestorben. Ob der schnelle Zelltod durch die Bakterien-Toxine oder das mechanische Trauma des Lidschlages bedingt ist, läßt sich nicht entscheiden. Im allgemeinen werden O_2 -Spannung, pH-Wert und die Anwesenheit von Bakterien-Toxinen oder anderen Giften einen bestimmenden Einfluß auf die extravasale Lebensdauer der Leukocyten haben.

Zusammenfassung

Durch Verimpfung von menschen-pathogenen Flexneri-3-Shigellen in den Conjunctivalsack von Meerschweinchen wurde eine Keratitis erzeugt. Die aus den Blutgefäßen des Limbus corneae bzw. der Conjunctiva austretenden polymorph-

kernigen Leukocyten infiltrieren teils die Substantia propria („Infiltrat-Leukocyten“), teils treten sie in den Conjunctivalsack aus („Exsudat-Leukocyten“).

Im Cytoplasma der „Infiltrat-Leukocyten“ bilden sich unscharf abgegrenzte vacuoläre Räume, die allmählich zu großen Vacuolen zusammenfließen. Gleichzeitig durchlaufen die spezifischen Granula innerhalb von 36—48 Std mehrere charakteristische Abbau-Stadien bis zur vollständigen Degranulierung, ohne daß sich die Zellen auflösen. Nach Ablauf der Degranulierung haben sich die Zellen abgerundet und lassen im Zentrum um die Kernsegmente nur noch wenig intaktes Cytoplasma mit einigen Granula-Resten erkennen.

Die „Exsudat-Leukocyten“ sterben innerhalb der ersten 12 Std ab. Einzelne Granula werden an die Phagocytose-Vacuolen abgegeben, in denen phagocytierte Shigellen liegen. Die Mehrzahl der Granula verliert nach dem Zelltod in wenigen Stunden den elektronenoptischen Kontrast bis zur Umwandlung in Vacuolen.

Ultrastructural Changes and Degranulation of Extracapillary Neutrophiles in Experimental Keratoconjunctivitis

Summary

In guinea pigs an experimental keratoconjunctivitis was produced by virulent Shigella. The polymorphonuclear leucocytes infiltrating the corneal stroma show an almost complete degranulation within 36 hours without forming phagocytosis-vacuoles. The specific granules reveal characteristic stages of degeneration with loss of the outer membrane. Finally they dissolve in the cytoplasm without destroying the cell.

The neutrophiles in the exudate outside the cornea die within 12 hours and their granules are transformed into vacuoles. The degranulation of the neutrophiles infiltrating the stroma is regarded as a vital reaction, in the exudate as autolysis.

Literatur

- BAINTON, D. F., and M. G. FARQUHAR: Origin of granules in polymorpho-nuclear leucocytes. *J. Cell Biol.* **28**, 277—301 (1966).
- BRECHER, G., H. v. FOERSTER u. E. P. CRONKITE: Produktion, Ausreifung und Lebensdauer der Leukocyten. In: *Physiologie und Pathologie der weißen Blutzellen*. Stuttgart: Georg Thieme 1959.
- BREWER, D. B.: Electron microscopy of phagocytosis of staphylococci. *J. Path. Bact.* **86**, 299—303 (1963).
- DUVE, CHR. DE: Lysosomes, a new group of cytoplasmic particles. In: *Subcellular particles*, p. 128; New York: Ronald Press Co. 1959.
- FLOREY, H.: *Lectures on general pathology*. London: S. Lloyd Luke Ltd. 1962.
- HIRSCH, J. G., and Z. A. COHN: Degranulation of polymorphonuclear leucocytes following phagocytosis of microorganisms. *J. exp. Med.* **112**, 1005—1014 (1960).
- KOMIYA, E.: Nachschub, Verteilung und Untergang der Leukocyten. In: *Handbuch der gesamten Hämatologie*, Bd. 2/1, S. 95 (Hrsg. L. HEILMEYER). München: Urban & Schwarzenberg 1959.
- KREIBIG, W.: Das Auge und sein Hilfsapparat. In: *Lehrbuch der speziellen Pathologie und Anatomie*, Bd. III/2 (Hrsg. M. STAENMLER). Berlin: W. de Gruyter & Co. 1961.
- LOCKWOOD, W. R., and F. ALLISON: Electron micrographic studies of phagocytotic cells. *Brit. J. exp. Path.* **44**, 593 (1963).
- NOVIKOFF, A. B.: Lysosomes and related particles. In: *The cell* edit. J. BRACHET and A. E. MIRSKY, vol. II, p. 423—488. Academic Press: New York 1961.

- ORFANOS, C.: Mastzelle und Mastzellengranulation. *Klin. Wschr.* **44**, 1177—1182 (1966).
- POLICARD, A., A. COLLET, S. PRÉGERMAIN, C. REUET, Y. PELANNE et B. POMES: Etude au microscope électronique des modifications intrastructurales présentées par les polynucléaires neutrophiles dans des foyers inflammatoires aseptiques. *Rev. Hémat.* **14**, 97—117 (1959).
- RÁCZ, P., u. K. TENNER: Die Bedeutung des intrazellulären Wachstums der pathogenen Mikroorganismen bei der Kerato-Conjunctivitis shigellosa und listeriosa. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **47**, 403—406 (1963).
- SBARRA, A. J., W. A. BARDWIL, W. SBIRLEY, and R. F. GILFILLAN: Degranulation of guinea pig leucocytes accompanying phagocytosis. *Exp. Cell Res.* **24**, 609—611 (1961).
- SERÉNY, B.: Experimentelle Keratoconjunctivitis shigellosa. Kandidatendiss. Budapest 1955.
- TAKEUCHI, A., H. SPRINZ, E. H. LABREC, and S. B. FORMAL: Experimental bacillary dysentery. An electronmicroscopic study of the response of the intestinal mucosa to bacterial invasion. *Amer. J. Path.* **47**, 1011—1044 (1965).
- VOINO-YASENETSKY, M. V., and M. K. VOINO-YASENETSKAYA: Experimental pneumonia caused by bacteria of the shigella group. *Acta morph. Acad. Sci. hung.* **11**, 439—454 (1962).
- WEIBEL, E. R.: Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab. Invest.* **12**, 131—155 (1963).
- WESSEL, W., u. P. RÁCZ: Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Cornea bei experimenteller Shigellen-Keratitis. *Virch. Arch. path. Anat.* **342**, 109—128 (1967).
- ZUCKER-FRANKLIN, D., and J. G. HIRSCH: Electron microscope studies on the degranulation of rabbit peritoneal leucocytes during phagocytosis. *J. exp. Med.* **120**, 569—576 (1964).

Priv.-Doz. Dr. W. WESSEL
Pathologisches Institut der Universität
53 Bonn, Venusberg