

Glykogenablagerungen im Bronchusepithel reimplantierter Hundelungen*

S. BLÜMCKE, J. RODE, H. R. NIEDORF

Pathologisches Institut der Universität Münster i. Westf. (Direktor: Prof. Dr. W. GIESE)

M. NASSERI, R. EISELE, W. STÄDTLER und E. S. BÜCHERL

Chirurgische Abteilung des Städtischen Krankenhauses Berlin-Neukölln
(Direktor: Prof. Dr. E. S. BÜCHERL)

Eingegangen am 11. September 1968

Glycogen Deposits in Bronchial Epithelium of the Reimplanted Canine Lungs

Summary. Glycogen deposits in the epithelial cells of bronchi of reimplanted canine lungs may be demonstrated by light and electron microscopy. The largest deposits are found in the epithelium of small bronchi and bronchioli. The cytoplasm of bronchiolar epithelial cells may be completely filled with glycogen. In ciliated cells of the larger bronchi the glycogen is limited to the perinuclear region. The mucus cells contain the least glycogen. The intracytoplasmic deposits of glycogen are regarded as representing reduced cellular activity. The cause probably is related to neural dysregulation.

Zusammenfassung. Nach einer Lungenreplantation sind in den Bronchusepithelzellen licht- und elektronenmikroskopisch Glykogenablagerungen nachzuweisen. Die stärksten Glykogenablagerungen finden sich im Epithel der kleinen Bronchien und Bronchioli. Das Cytoplasma der Bronchiolusepithelzellen kann fast vollständig mit Glykogen ausgefüllt sein. In den Flimmerzellen der großen Bronchien ist das Glykogen auf das Perikaryon beschränkt. Die Schleimzellen haben die geringsten Glykogenablagerungen. Die intracytoplasmatischen Glykogenablagerungen werden als Ausdruck verminderter Zellaktivität gedeutet. Die Ursache hierfür liegt möglicherweise in einer neuralen Dysregulation.

Bei einer Lungenreplantation sind heute die technischen Schwierigkeiten weitgehend überwunden (EISELE u. Mitarb., 1968). Damit sind weitere funktionell-morphologische Probleme aufgeworfen, deren Erforschung für eine erfolgreiche Lungentransplantation am Menschen von großer Bedeutung sind. Insbesondere ist im Lungentransplantat wegen der gestörten Blut- und Nervenversorgung mit Bronchusveränderungen zu rechnen. Über feinstrukturelle Veränderungen der Bronchuswand nach Lungentransplantation oder -reimplantation liegen in der Literatur noch keine Beobachtungen vor. In der vorliegenden Arbeit soll daher die feinere Morphologie der Bronchien nach Lungenreimplantation untersucht werden.

Material und Methodik

Bei 18—20 kg schweren, 12—18 Monate alten Hunden wurde die linke Lunge nach früher beschriebener Methode (BÜCHERL u. Mitarb., 1961) reimplantiert.

Elektronenmikroskopie. Die Überlebenszeiten betrugen 2 und 5 Monate. Die narkotisierten Tiere wurden thorakotomiert und die kollabierten Lungen von der Trachea aus mit einer 4,5%igen eisgekühlten Glutaraldehyd-Lösung aufgefüllt. Von der reimplantierten und der normalen Lunge wurden sofort danach kleine Stückchen aus den verschiedenen Abschnitten der Bronchien und Bronchiolen entnommen und 1 Std in der gleichen Glutaraldehyd-Lösung nachfixiert.

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Die Glutaraldehyd-Lösung war mit s-Collidin gepuffert (BENNET und LUFT, 1959) und auf pH 7,3 eingestellt. 100 ml dieser Lösung enthielten 4 g Rohrzucker (CAULFIELD, 1957) und 0,25 g CaCl₂. Im Anschluß an die Glutaraldehyd-Fixation wurden die Gewebestückchen kurz in Pufferlösung gewaschen und für 1—2 Std in einer gepufferten 1%igen OsO₄-Lösung nachfixiert. Die Einbettung erfolgte über die aufsteigende Alkoholreihe in Epon 812 (LUFT, 1961), wobei das Gewebe im 70%igen Alkohol mit Phosphorwolframsäure (1,5 g PWS auf 100 ml 70%igen Alkohol) kontrastiert wurde. Um von den Bronchialwänden Querschnitte zu erhalten, wurden die Gewebestückchen gerichtet eingebettet. Mit Toluidinblau gefärbt (TRUMP u. Mitarb., 1961) „semidünne“ Schnitte ermöglichen ein gezieltes Anspitzen der Blöckchen unter lichtmikroskopischer Kontrolle. Die Dünnschnitte wurden am Porter-Blum-Ultramikrotom angefertigt, mit Bleihydroxyd (KARNOVSKY, 1961) kontrastiert und mit dem Elmiskop I A (Siemens) bei einer Strahlspannung von 80 kV beobachtet und photographiert.

Glykogen-nachweis nach BEST. Für den histochemischen Glykogen-nachweis in der Bronchuswand wurden Überlebenszeiten von 2 Tagen, 2 Monaten und 5 Monaten gewählt. Die Tiere wurden narkotisiert, thorakotomiert und aus verschiedenen Bronchusabschnitten beider Lungen kleine Gewebestückchen entnommen und gefriergetrocknet. Von dem getrockneten und in Paraffin eingebetteten Material wurden 7 µm dicke Schnitte angefertigt, entparaffiniert und in einer Äthylalkohol-Formalin-Mischung (7 Teile 96%iger Äthylalkohol + 3 Teile 40%iges Formaldehyd) fixiert. Die weitere Bestsche Carminfärbung wurde in üblicher Weise anschließend durchgeführt. Für Kontrolluntersuchungen wurden H.E. und PAS-Färbungen gewählt.

Befunde

Mit Hämatoxylin-Eosin gefärbte Schnitte von reimplantierten Lungen lassen keine gröbere Strukturveränderungen im Bronchialsystem erkennen. Insbesondere sind im vorliegenden Material keine entzündlichen Infiltrate in der Bronchuswand oder im Peribronchium zu beobachten. Drüsen und Nervensystem der Bronchien sind gesondert untersucht und an anderer Stelle publiziert worden (BLÜMCKE u. Mitarb., 1968a, b). Die vorliegenden Untersuchungen beschränken sich auf das Bronchusepithel. Hier findet man keine Abweichung vom normalen Verteilungsmuster der Schleim- und Flimmerzellen. Die Schleimzellen behalten ihre regelrechte Becherform. Auch ihr Schleimgehalt entspricht der Norm. Die sog. *Clara-Zellen* (Keulenzellen) im einreihigen Epithel der Bronchioli respiratorii scheinen in der reimplantierten und normalen Lunge gleich häufig vorhanden zu sein.

Nach einer Carminfärbung nach BEST ist normalerweise im Bronchusepithel kein Glykogen nachweisbar. Wie aus Abb. 1 ersichtlich, finden sich 5 Monate nach einer Lungenreimplantation auf der operierten Seite in sämtlichen Bronchus-epithelzellen Glykogenablagerungen, während in der nicht transplantierten Lunge das Glykogen fehlt. Die Epithelzellen verhalten sich in bezug auf ihren Glykogengehalt unterschiedlich: Die Schleimzellen haben die geringsten, die Epithelzellen der kleinen Bronchien und Bronchioli die stärksten Glykogenablagerungen. Das Glykogen der Flimmerzellen ist nur auf das Perikaryon beschränkt. Hier nehmen die Glykogenschollen selten mehr als ein Viertel der Kerngrößen ein.

Das Glykogen tritt nicht sofort nach einer Transplantation auf. 2 Tage nach einer Reimplantation z.B. läßt sich im Epithel noch kein Glykogen nachweisen; jedoch sind die Glykogenanhäufungen 2 Monate nach der Operation in gleicher Stärke vorhanden wie bei den Tieren mit einer Überlebenszeit von 5 Monaten.

Die *elektronenmikroskopischen Beobachtungen* stimmen mit den lichtmikroskopisch erhobenen Befunden überein. Im Cytoplasma der Epithelzellen sind die Glykogenpartikel in größeren Arealen akkumuliert. Größe und Kontrasteigenschaften der Partikel sowie ihre vorwiegend rosettenförmige Anordnung ent-

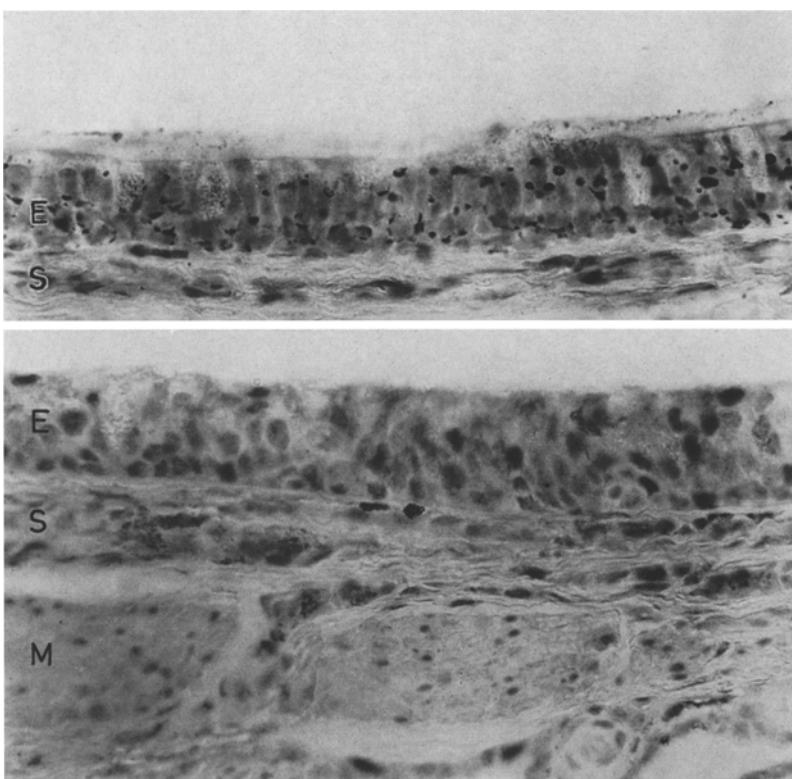


Abb. 1. Oben: Glykogenablagerungen im hohen Bronchusepithel (*E*) 5 Monate nach linkss seitiger Lungenreimplantation. *S* Submucosa. Carminfärbung nach BEST, $520 \times$. Unten: Kontrollschnitt aus dem gleichen Bronchusabschnitt der rechten Lunge bei gleicher histologischer Technik und Vergrößerung. *E* Bronchusepithel; *S* Submucosa; *M* Muscularis

sprechen den typischen Glykogenablagerungen anderer Zellsysteme wie z. B. der Leberparenchym- und Muskelzellen (THEMANN, 1963). Isoliert liegende Glykogenpartikel sind im Cytoplasma oft schwer zu identifizieren. Meist lassen sie sich aber von Ribosomen durch ihren größeren Durchmesser und ihre kugelähnliche Form unterscheiden.

Im elektronenmikroskopischen Bild stellen sich die lichtmikroskopisch als Schollen erkennbaren Glykogenablagerungen in zweifacher Weise dar: In den Epithelzellen der kleinen Bronchien und Bronchiolen liegen die Glykogenpartikel in der Regel als kompakte Haufen zusammen, während vornehmlich in den Flimmerzellen in den Glykogenherden häufig große elektronenoptisch leere Räume zu beobachten sind. Die Entstehung dieser Räume ist nicht geklärt. Möglicherweise handelt es sich um Fixierungs- oder Einbettungsartefakte.

In Abb. 2 sind die nach Lungenreimplantation auftretenden, für Flimmerepithelzellen typischen Glykogenablagerungen zu erkennen. Die Organellen der Epithelzelle sind normal strukturiert. Insbesondere lassen sich keine Mitochondrienschwellungen nachweisen. Die größeren Glykogenablagerungen liegen in der



Abb. 2. Herdförmige Glykogenablagerungen (Gl) im Perikaryon einer Flimmerzelle 5 Monate nach Reimplantation. S Submucosa; M Muscularis. 15000 ×

Regel herdförmig im Perikaryon apikal vom Zellkern. Oft lassen sie im Innern weite, elektronenoptisch leere Räume erkennen.

Besonders dichtgepackte, ausgedehnte Glykogenablagerungen finden sich in den sog. *Clara-Zellen* (vgl. Abb. 3). Oft ist ihr gesamtes Cytoplasma fast vollständig mit Glykogen ausgefüllt, das bis in die schmalen, tentakelförmigen Fortsätze dieser Zellen reicht und nur einen schmalen Cytoplasmasaum an der Zell-

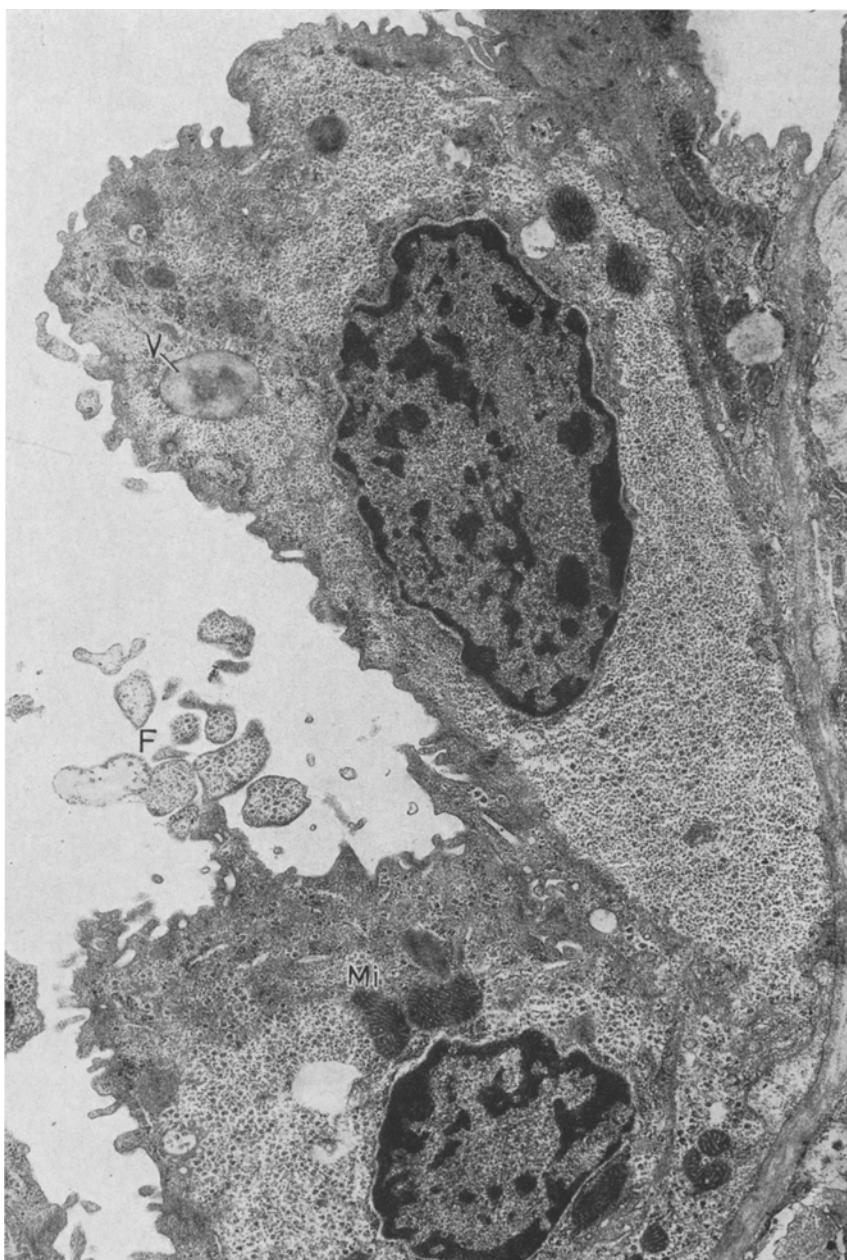


Abb. 3. Fast vollständig mit Glykogen ausgefüllte sog. Clara-Zellen aus einem Bronchiolus respiratorius 5 Monate nach Reimplantation. *V* Sekretvacuole; *Mi* Mitochondrien; *F* schmale mit Glykogen angefüllte Plasmafortsätze. $11700 \times$

peripherie freiläßt. Auch die besonders großen und mit einer dichten Matrix ausgestatteten Mitochondrien der *Clara-Zellen* sind unverändert; dagegen ist die Zahl der Sekretvacuolen („*V*“ in Abb. 3) deutlich reduziert.

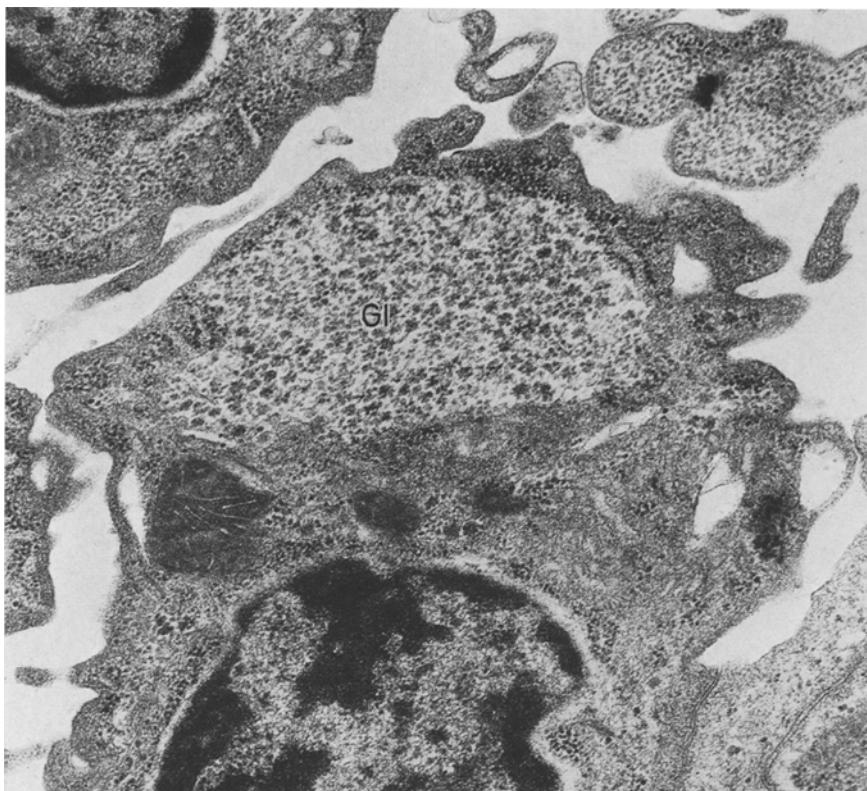


Abb. 4. Apikaler Teil einer Epithelzelle mit großem Glykogeneinschluß (Gl) aus einem Bronchiolus respiratorius 2 Monate nach Reimplantation. $36\,000\times$

In den kubischen Epithelzellen der Bronchioli respiratorii finden sich die Glykogenablagerungen oft in ausgedehnten Herden im apikalen Zellteil (vgl. Abb. 4). Hier reichen die Ablagerungen ebenfalls bis in die Zellfortsätze. Im gesamten Cytoplasma dieser Zellen sind auch kleinere Glykogenherde zu beobachten.

Die Schleimzellen des hohen Bronchusepithels enthalten nur spärliche Glykogenmengen (vgl. Abb. 5). Die Ablagerungen finden sich in den Cytoplasmazwickeln zwischen den Schleimvacuolen. Die Schleimbildung und -exkretion erscheint im elektronenmikroskopischen Bild ungestört. Der Pfeil in Abb. 5 weist auf die Exkretion einer Schleimvacuole in das Bronchuslumen.

Bei der Reimplantation werden die Bronchialarterien im Hilus unterbunden und durchtrennt. Die Durchblutung der Bronchialgefäß des Reimplantates kann nur über Anastomosen zwischen Ästen der Pulmonalarterie und den Bronchialgefäßen (HAYEK, 1940) erfolgen. Die Untersuchungen der Bronchuswand reimplantierter Lungen zeigen, daß anscheinend nur ein Teil der Bronchialgefäß eröffnet ist. Neben stark dilatierten, mit Plasma gefüllten Capillaren (vgl. Abb. 6), deren Epithel flach ausgezogen ist, findet man auch vereinzelt Capillaren, deren Lichtung vollständig oder bis auf einen äußerst schmalen Spalt kollabiert ist.

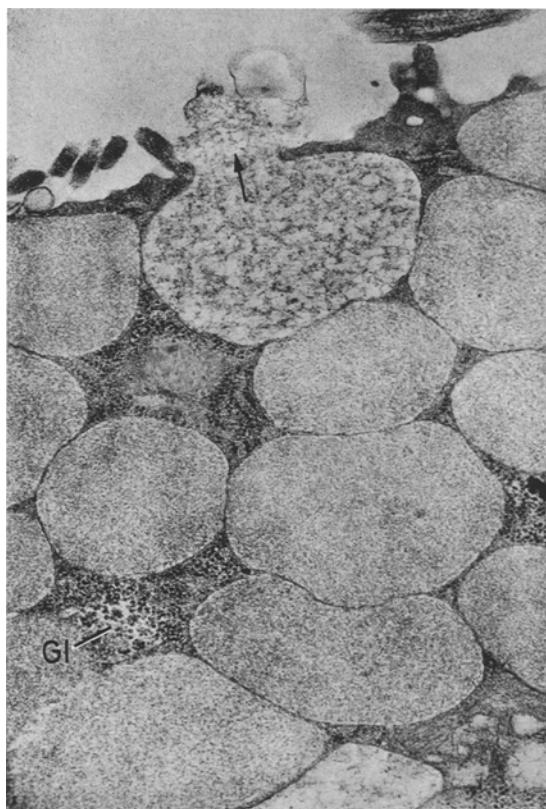


Abb. 5. Ausschnitt aus dem apikalen Teil einer Schleimzelle mit geringen Glykogenablagerungen (Gl) im Cytoplasma zwischen den Schleimvacuolen 2 Monate nach Reimplantation. Pfeil: Entleerung einer Schleimvacuole in die Bronchuslichtung. 30000 ×

Die Muskelzellen der Bronchuswand zeigen auch im elektronenmikroskopischen Bild keine Veränderungen ihrer filamentären Cytoplasmastrukturen. Lediglich ihr Glykogengehalt scheint vermehrt.

Diskussion

Die intracytoplasmatische Glykogenspeicherung in den Bronchusepithelzellen kann als Folge einer verminderten Glykolyse bei normalem Glucoseangebot gedeutet werden. Da keine Stoffwechseluntersuchung an reimplantierten Lungen vorliegt, ist die Ursache für die Glykogenspeicherung bisher ungeklärt.

Bei der Lungenreimplantation ist eine Durchtrennung der in die Lunge ziehenden Nerven und eine Unterbindung der Bronchialarterien im Hilus unvermeidbar. Daraus ergeben sich zwei Faktoren, die als Ursache für die Glykogenspeicherung diskutiert werden müssen: 1. eine gestörte Innervation und 2. eine mangelhafte Sauerstoffversorgung der Bronchusschleimhaut.

Bei der Reimplantation werden sämtliche in die Lunge ziehenden sympathischen und parasympathischen Nervenfasern durchtrennt, während die intrapulmonalen Ganglienzellen, deren Nervenfasern die Mucosa der Bronchuswand

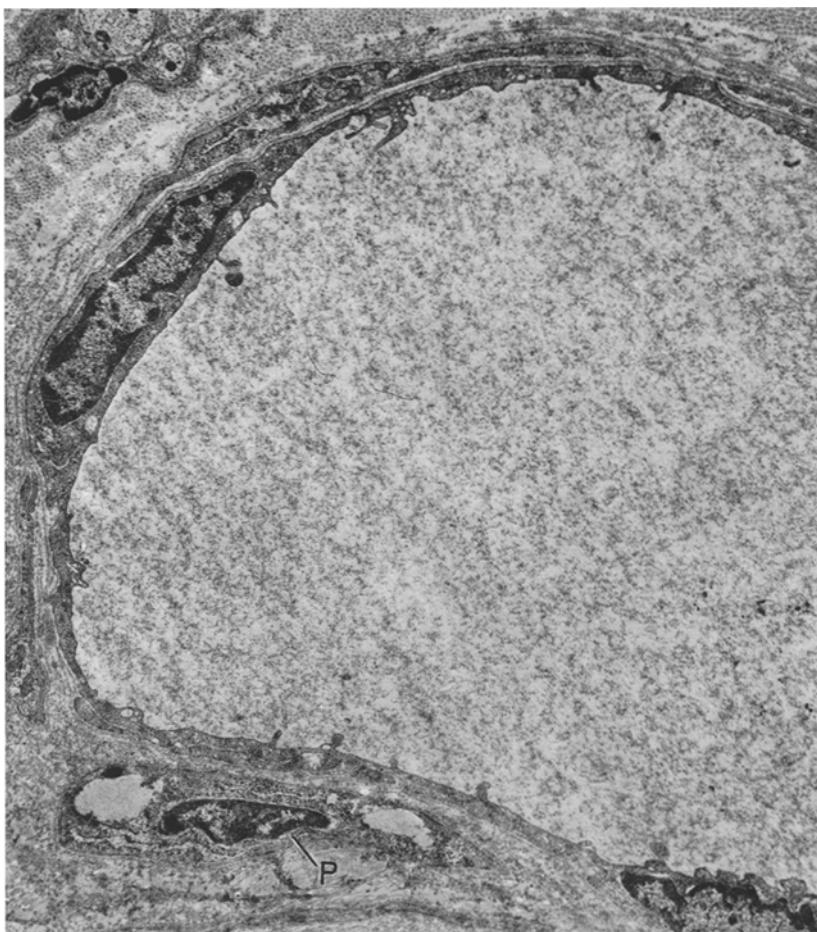


Abb. 6. Weite, mit Blutplasma gefüllte Capillare aus der Bronchuswand 2 Monate nach Reimplantation. P Pericyt. 5000 ×

innervieren (BLÜMCKE, 1968), im Reimplantat überleben (BLÜMCKE et al., 1968 a, b). Die fehlende zentrale Innervation führt zwangsläufig zur Autonomie der intrapulmonalen Ganglienzellen und hat vermutlich schwere Störungen für die neurale Versorgung der Mucosa zur Folge. Es ist zu erwarten, daß die Erregungsfrequenz dieser Ganglienzellen herabgesetzt und damit die Abgabe der neuralen Transmittersubstanzen an die Bronchusepithelzellen vermindert ist. Außer dieser allgemein reduzierten neuralen Stimulation ist auch das Zusammenspiel von Sympathico- und Parasympathicotonus an den Erfolgszellen gestört, so daß eine neurale Dysregulation des Bronchusepithels zu erwarten ist. Die funktionellen Auswirkungen dieser neuralen Störungen sind schwer zu übersehen.

Wir möchten annehmen, daß die veränderte Innervation schließlich zur Herabsetzung der Zellaktivität und des Energiebedarfs in den Bronchusepithelzellen führt. Da die Zelle normalerweise ihren Energiebedarf aus dem Glucoseabbau deckt, hat die Herabsetzung des Energiebedarfs auch eine Einschränkung

des Glucoseabbaus zur Folge. Das Glucoseangebot ist in der reimplantierten Lunge unverändert, so daß die Reduktion des Glucoseabbaus zwangsläufig zur Glykogenspeicherung führt. Über diesen Weg besteht nach unserer Ansicht ein direkter Zusammenhang zwischen der Glykogenablagerung und der gestörten Innervation des Bronchusepithels.

Außer der neuralen Dysregulation kommt theoretisch auch ein Sauerstoffmangel als Ursache für den gestörten Kohlenhydratstoffwechsel in Betracht. Der Sauerstoffmangel könnte zur ATP-Verarmung führen und dadurch den oxydativen Glucoseabbau einschränken. Unsere Befunde sprechen jedoch gegen diese Möglichkeit. Nach Unterbindung der Bronchialarterien erfolgt die Durchblutung der Bronchuswand über Anastomosen (v. HAYEK, 1940) mit der Arteria pulmonalis. Diese retrograde Blutversorgung hat sich in den untersuchten reimplantierten Lungen insofern nachweisen lassen, als die Bronchialgefäße zum größten Teil prall mit Blutplasma (vgl. Abb. 6) und Blutkörperchen gefüllt waren. Wäre die verminderte Sauerstoffspannung dieses aus der Art. pulmonalis stammenden Blutes für die Glykogenspeicherung im Bronchusepithel verantwortlich, dann müßten auch die größten Glykogendepots im Epithel der großen Bronchien liegen. Tatsächlich aber finden sie sich im Epithel der kleinsten Bronchusaufzweigungen, deren Blutversorgung überhaupt nicht mehr über die Bronchialarterien erfolgt. Außerdem sprechen die feinstrukturellen Untersuchungen gegen die Annahme, daß die Epithelzellen unter einem chronischen Sauerstoffmangel leiden. In keiner Epithelzelle der reimplantierten Lungen konnten geschwollene Mitochondrien oder andere Zeichen einer Hypoxie gefunden werden.

Die z.T. hochgradigen Glykogenablagerungen lassen eine erhebliche Funktionsstörung des Bronchusepithels besonders aber des Bronchiolusepithels vermuten. Diese Funktionsstörungen könnten sich nachhaltig auf die Ventilation einer reimplantierten oder transplantierten Lunge auswirken. Damit stellen sie möglicherweise ein zusätzliches Problem für die menschliche Lungentransplantation dar.

Literatur

- BENNETT, H. S., and J. H. LUFT: s-Collidine as a basis for buffering fixatives. *J. biophys. biochem. Cytol.* **6**, 113—114 (1959).
- BLÜMCKE, S., J. RODE, H. R. NIEDORF, E. S. BÜCHERL, M. NASSERI, R. EISELE u. W. STÄDTLER: Der peribronchiale Nervenplexus in reimplantierten Hundelungen. *Beitr. path. Anat.* (1968a) (im Druck).
- — — — Die Innervation der Bronchialdrüsen in reimplantierten Hundelungen. *Beitr. path. Anat.* (1968b) (in Vorbereitung).
- BÜCHERL, E. S., P. LESCH, M. NASSERI u. M. RICHTER: Ergebnisse experimenteller Untersuchungen nach normothermer und hypothermer Homiotransplantation einer Lunge. *Langenbecks Arch. klin. Chir.* **296**, 660—686 (1961).
- CAULFIELD, J. B.: Effects of varying the vehicle of OsO₄ in tissue fixation. *J. biophys. biochem. Cytol.* **3**, 827 (1957).
- EISELE, R., M. NASSERI, K. STÄDTLER u. E. BÜCHERL: Die Lungentransplantation. Chirurgische und spezielle Probleme. *Dtsch. med. J.* **19**, 218—220 (1968).
- HAYEK, H. v.: Über einen Kurzschlußkreislauf. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.* **110**, 412 (1940).
- KARNOVSKY, M. J.: Simple methods for "staining with lead" at high pH in elektron microscopy. *J. biophys. biochem. Cytol.* **11**, 729—732 (1961).

- LUFT, J. H.: Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. biophys. biochem. Cytol.* **9**, 409 (1961).
- MARX, G., TH. MATTHES, W. WIDOW u. G. WITTIG: Zur Problematik der Organ-, insbesondere der Lungentransplantation. *Dtsch. Gesundh.-Wes.* **23**, 1009—1014 (1968).
- THEMANN, H.: Elektronenoptische Untersuchungen über das Glykogen im Zellstoffwechsel. *Veröff. morph. Path.* **66**, 1—105 (1963).
- TRUMP, B., E. A. SMUCKLER, and E. P. A. BENDITT: A method for staining epoxy sections for light microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* **5**, 343 (1961).

Priv.-Doz. Dr. S. BLÜMCKE

Dr. J. RODE

Dr. H. R. NIEDORF

Pathologisches Institut der Universität

23 Kiel, Hospitalstr. 42

Prof. Dr. E. S. BÜCHERL

Priv.-Doz. Dr. M. NASSERI

Dr. R. EISELE

Dr. K. STÄDTLER

Chirurgische Abteilung des Städtischen
Krankenhauses Berlin-Neukölln
1 Berlin-Neukölln, Rudower Straße