

Morphologische Befunde am Hornhautstroma nach Injektion von artfremdem Eiweiß

K. HÖHFELD und H. PAU

Universitäts-Augenklinik Düsseldorf (Direktor: Prof. Dr. med. H. Pau)
und Institut für Biophysik und Elektronenmikroskopie
(Direktor: Prof. Dr. med. H. Ruska)

Eingegangen am 15. Mai 1971

Morphological Findings in the Corneal Stroma after Injection of Heterogenous Proteins

Summary. Injection of foreign protein (Boviserin) into the centre of rabbit cornea induces a characteristic inflammatory reaction, in which polymorphonuclear granulocytes predominate. The central inflammation extends radially only as narrow processes as far as the limbus because of the injection method and the lamellar structure of the cornea. The vessels in the limbus react by dilatation and extravasation. The fibrocytes in the stroma show activity depending on the duration of the inflammation. Numerous fibrocytes also die. Transitional forms between fibrocytes and granulocytes are detectable only occasionally. In our experiments the majority of cells foreign to the area are obviously immigrants. By adding ferritin to the Boviserin a completely different inflammatory picture is produced and at the same time a surprisingly early capillarisation of the cornea.

Zusammenfassung. Injektion von Fremdeiweiß (Boviserin) in das Zentrum der Kaninchenhornhaut ruft ein charakteristisches Entzündungsbild hervor, in dem polymorphkernige Granulozyten vorherrschen. Die zentrale Entzündung erstreckt sich meist nur mit einem schmalen, radiären Fortsatz bis zum Limbus. Dies erklärt sich durch die Injektionstechnik und den lamellären Hornhautbau. Die Limbusgefäße reagieren hier mit Erweiterung und Extravasaten. Die Fibrocyten des Stroma zeigen Aktivität in Abhängigkeit von der Dauer der Entzündung. Zahlreiche Fibrocyten gehen auch zugrunde. Übergangsformen zwischen Fibrocyten und Granulozyten sind nur vereinzelt nachzuweisen. Die Mehrzahl der ortsfremden Zellen ist bei unserer Versuchsanordnung offenbar eingewandert. Bei Zusatz von Ferritin zum Boviserin entsteht ein völlig anderes Entzündungsbild und gleichzeitig eine überraschend frühzeitige Capillarisation der Hornhaut.

Einleitung

Der wirksam gewordene, örtlich begrenzte entzündliche Reiz setzt Reaktionen an den Blutgefäßen und am Bindegewebe in Gang. Seit Virchow (1871) und später Cohnheim (1873, 1878) bestehen gegensätzliche Ansichten bezüglich der Priorität und Bedeutung dieser beiden Reaktionen (Büchner, 1956; Fasske, 1961, 1962). Zahlreiche Autoren sind zu divergierenden Ansichten gekommen, gerade auch im Hinblick auf die am Entzündungsvorgang beteiligten Zellen und ihre Herkunft (Marchand, 1924; v. Möllendorff und v. Möllendorff, 1926; Maximow, 1927, 1929; Busse-Grawitz, 1949, 1953, 1963; Hamperl, 1954; Pau, 1959; Letterer, 1959; Gusek, 1960, 1962; Fasske, 1961, 1962; Fritsch und v. Barsewisch, 1965; Doerr et al., 1965; Müller, 1965; Giesecking, 1966; Backmann und Müller, 1966; ausführliche Literatur bei Gusek, 1962). Wohl auch unter dem Eindruck dieser Gegen-

sätze ist die Vorstellung Letterer's vom „Histon“ als synergistisch wirkender Einheit von Bindegewebsanteil und Blutgefäßen entstanden.

Zur Untersuchung der beiden genannten Reaktionen bietet sich die Hornhaut des Auges an, da es sich bei dem Stroma der Hornhaut um ein gefäßfreies, kollagenes Bindegewebe handelt. Bestimmte Voraussetzungen müssen gegeben sein, damit eine zu frühe und intensive Mitreaktion des Randschlingennetzes vermieden wird. Dann erscheint es möglich, in den Anfangsstadien der Entzündung eine Differenzierung der Reaktionen des Bindegewebes, hier also des Hornhautstroma bzw. seiner Zellen und der Blutgefäße des Randschlingennetzes vorzunehmen.

Untersuchungsgut und Methodik

Als Versuchstiere dienten 13 Kaninchen mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 3000 g. Zur Erzeugung einer Hornhautentzündung verwendeten wir handelsübliches Boviserin der Firma Behringwerke, Marburg, das unter sterilen Bedingungen mit einer 20,0 Nadel in das Hornhautzentrum injiziert wurde. Die durchschnittlich injizierte Menge betrug 0,1—0,2 ml. Die Perforation der Hornhaut wurde vermieden, Fälle, in denen es doch zur Perforation kam, wurden ausgeschieden. Im Anschluß an die Injektion wurde einmalig Kanamytrex-Augensalbe eingestrichen. Die Hornhaut wurde in Evipan- bzw. Nembutal-Narkose entnommen, anschließend sofort 45 min in 3,5% Glutaraldehydlösung, gelöst in Phosphat-Puffer (pH 7,2) und 90 min in 1% OsO₄ fixiert, dann nach Entwässerung in Epon 812 eingebettet. Untersuchungen erfolgten 12, 24, 38, 48, 72 und 120 Std nach Injektion, außerdem auch an nicht behandelten Hornhäuten.

Eine orientierte Zerkleinerung der Hornhaut in rechteckige Stücke erfolgte meist während der Zeit der Fixierung in Glutaraldehyd. Die Dünnschnitte kontrastierten wir je 15 min mit Uranylacetat und Bleicitrat. Die elektronenmikroskopische Untersuchung führten wir am Siemens UM 100 durch. Außerdem untersuchten wir histologisches Material, nämlich Gefrierschnitte von nicht fixierten Hornhäuten und Semidünnschnitte, die mit Hämatoxylin nach Weigert und Sudanschwarz B (Romeis, 1968) bzw. mit Toluidinblau gefärbt wurden.

Elektronen- und lichtmikroskopische Befunde am unveränderten Hornhautstroma und nach Injektion von artfremdem Eiweiß

Unmittelbar nach der Injektion von Boviserin traten graue Trübungen des Hornhautstromas auf, die innerhalb von 4—6 Std weitgehend verschwanden und eine leichte, schleierartige Trübung zurückließen. Nach 24 Std bestand immer ein kleiner, dichter grauer Fleck im Bereich der Einstichstelle der Nadel, der sich allmählich vergrößerte oder auch bei gering ausgeprägter Reaktion allmählich verschwand. Die Epitheldecke war geschlossen. Die Reaktion des Randschlingennetzes war unterschiedlich ausgeprägt, in einigen Fällen anscheinend fast ganz fehlend, in anderen deutlicher. Auch dann war sie aber immer nur auf den kleinen Anteil beschränkt, der der Nadelspitze gegenüber lag. Dies hing offensichtlich mit der Injektionstechnik und dem lamellären Bau der Hornhaut zusammen. Die injizierte Flüssigkeit wurde offenbar bevorzugt in Richtung auf den Limbus zu gedrängt und spaltete dabei die Hornhaut. (Die Nadel wurde, um eine Perforation zu vermeiden, nicht senkrecht, sondern schräg in die Hornhaut eingestochen.)

Ein entsprechend dem makroskopischen Bild der zentralen Hornhauttrübung histologisch allseits abgegrenzter zentraler Herd findet sich histologisch nicht. Gefrierschnitte durch einen Radius zwischen dem Injektionszentrum und dem Limbusanteil mit deutlicher Gefäßerweiterung zeigten nach 48 Std das Bestehen einer schmalen, den Limbus erreichenden Nekrosezone. Hier fand sich reichlich Sudanschwarz B-färbbares Material (Abb. 1 a). Im Bereich der Gefäßerweiterungen am Limbus konnten bei Tieren, denen vor der Tötung i. v. retrograd Tusche und Kongorot injiziert wurde, 48 Std nach Injektion deutliche Extravasate nach-

gewiesen werden (Abb. 1c). Es zeigte sich, daß bei Zusatz von Ferritin, das ursprünglich der elektronenmikroskopischen Markierung der Injektionsflüssigkeit dienen sollte, die Entzündung der Hornhaut erheblich heftiger verlief und schon 48 Stunden nach Injektion eine Vascularisation auch der zentralen Hornhautanteile eingetreten war, die ihren Ausgang von den genannten Limbusanteilen genommen hatte. Das Vorhandensein von streifenförmigen Nekrosezonen ließ sich auch an Semidünnschnitten verfolgen (Abb. 1b), von denen wir zur Übersicht Serienschnitte anfertigten. Es wurde bei einer Schnittdicke von ca. 2 μm jeder 10.—15. Schnitt verwendet. Die Schnitttrichtung verlief quer zur Längsrichtung des Streifens. Auch elektronenmikroskopisch zu untersuchende Schnitte wurden von diesen Präparaten angefertigt.

Im histologischen Präparat fanden sich öfter Zellen, die mit dieser Technik nicht mehr eindeutig einzuordnen waren. Bei elektronenmikroskopischen Kontrollen gelang es dagegen, soweit es sich um intakte Zellen handelte, eine Differenzierung zu erreichen. Insbesondere gelang es, Fibrocyten und Granulocyten zu unterscheiden, obwohl die Granulocyten infolge des lamellären Baus der Hornhaut meist eine sehr langgestreckte, den Fibrocyten ähnliche Form annahmen. Jedoch unterschieden sich Kern und Cytoplasma sowohl in der Struktur als auch im Auftreten charakteristischer Zellorganellen. Selten fanden wir in der gleichen Zelle die Charakteristika sowohl von Fibrocyten als auch von Granulocyten (Abb. 6). Meist fehlten eindeutige Übergangsformen.

1. Unbehandelte Hornhaut

Die Hornhautstromazellen, dem Aussehen nach typische Fibrocyten, sind langgestreckt, öfter verzweigt und dann dreipolig (Abb. 2). Die charakteristischen Kanälchen des endoplasmatischen Reticulums mit meist durchgehenden Ribosomensäumen können stellenweise unterschiedlich weit sein. Gelegentlich haben sie offene Verbindung zu der spaltförmigen, gleichmäßig breiten perinucleären Zisterne. Die Ausläufer der Fibrocyten sind lang, oft sehr dünn und immer durch das charakteristische endoplasmatische Reticulum erkennbar. Im Cytoplasma finden sich wenig Mitochondrien, gelegentlich Vacuolen oder als Lysosomen erscheinende Körper, selten Fetttropfen, und bei diesen Untersuchungen kein Glycogen.

Der Kern ist langgestreckt, dabei gebuchtet, wie „gezähnt“ erscheinend und läßt oft nur einen schmalen Cytoplasmasaum frei. Die Kernrandzone ist etwa 250 Å breit, elektronendichter und besteht anscheinend aus zwei Schichten mit feinem dazwischenliegendem Spalt-raum. Innen sind kleine Granula von der Größe von Ribosomen angelagert. Das Kernplasma ist körnig, gelegentlich verdichtet und dann grobschollig, sonst weniger elektronendicht. Nucleoli sind durchweg nicht nachweisbar.

Im Hornhautstroma, das den bekannten regelmäßigen Aufbau aus sich schräg kreuzenden Bündeln kollagener Fibrillen zeigt, findet man öfter auch Mikrofibrillen. Nahe der Zellwand von Fibrocyten lassen sich noch Protofibrillen und innerhalb der Zellen ebenfalls feine Filamente zeigen. Die Kittsubstanz zwischen den Fibrillen tritt elektronenmikroskopisch nicht in Erscheinung.

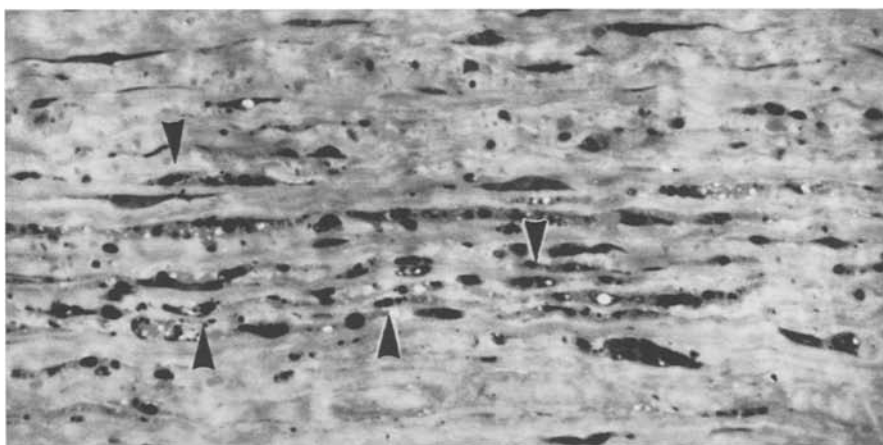
Außer diesen charakteristischen, wie oben beschriebenen Zellen finden sich vereinzelt Makrophagen (Abb. 3). Die Form ist weniger langgestreckt, das endoplasmatische Reticulum ist deutlich spärlicher, dagegen treten reichlich Mitochondrien und primäre und sekundäre Lysosomen auf. Die Grundsubstanz des Cytoplasma ist feingranulär und weniger elektronendicht. Der Kern ist weniger ausfüllend, rundlicher und öfter exzentrisch.

2. 12 Std nach Injektion

12 Std nach Injektion von 0,1—0,2 ml Boviserin zentral in das Hornhautstroma besteht makroskopisch eine nur mäßige diffuse Trübung der Hornhaut.



a



b



c

Abb. 1. a Gefrierschnitt der Hornhaut, 48 Std nach Boviserin-Injektion. Nekrorestreifen (▲). Sudanschwarz B. 56:1. b Semidünnschnitt der Hornhaut, 72 Std nach Injektion. Zahlreiche langgestreckte Granulocyten (▲) in engem Kontakt zu Fibrocyten. Toluidinblau. 560:1. c Gefrierschnitt, Extravasate am Limbus, 48 Std nach Injektion von Boviserin in die Hornhaut. Tuschepräparat. 140:1

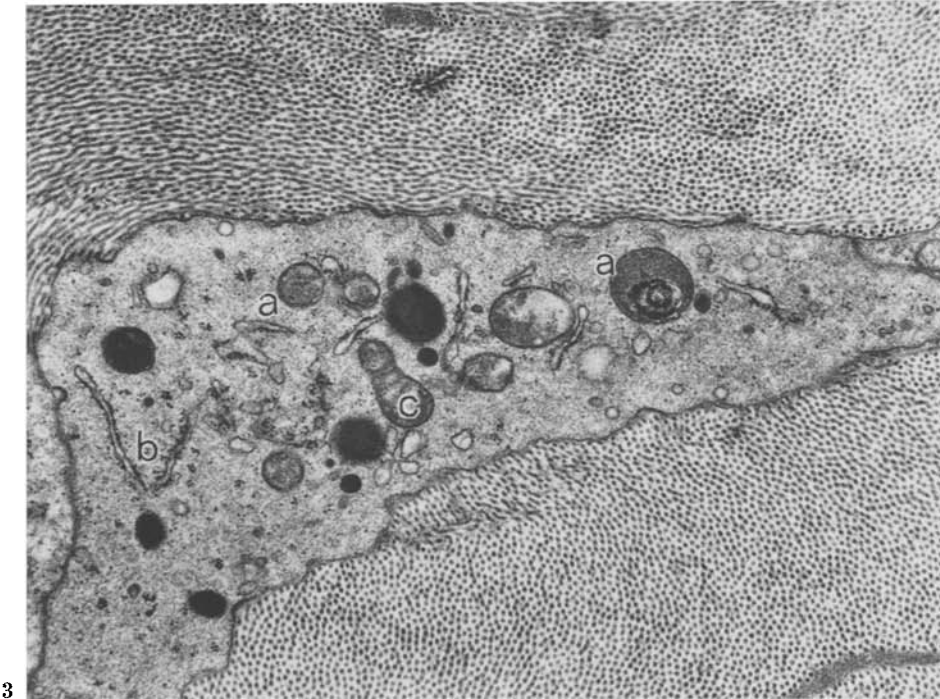


Abb. 2 u. 3

Der Einstich und die unmittelbare Umgebung sind durch eine dichte Graufärbung markiert. Das Randschlingennetz ist leicht injiziert in dem Limbusbereich, der der Nadelspitze gegenüberlag. Histologisch findet sich im Injektionszentrum eine Zone mit Verlust der regelmäßigen Kollagenstruktur, Zerreißung der Lamellen und Auftreten von mäßig dichtem, sehr feingranulärem Material. Hierbei könnte es sich um die injizierte Substanz handeln. Im nicht beschädigten Bereich der Hornhaut zeigen einige Fibrocyten starke Vacuolisierung des Cytoplasma und Verdichtung der Kernrandzone. Es könnte sich um untergehende Zellen handeln.

Am auffallendsten sind aber die runden bis ovalen, gelegentlich polymorphen elektronendichten Körper im Cytoplasma zahlreicher Fibrocyten (Abb. 4). Ihre Größe in Abhängigkeit und Schnittebene schwankt zwischen $0,4\ \mu\text{m}$ und $0,8\ \mu\text{m}$, größere Längen betragen $1,2\ \mu\text{m}$. Zum Teil läßt sich eine feine umhüllende Membran erkennen. Die Beziehung zum endoplasmatischen Reticulum ist nicht genau zu klären. Das Innere dieser Körper besteht aus feingranulärer Substanz, anscheinend sind tubuläre und ringförmige Strukturen erkennbar.

Die übrige Ordnung der Fibrocyten ist bis auf eine nicht regelmäßige Vacuolenbildung noch weitgehend ungestört. Myelinfiguren im Cytoplasma lassen sich auch in unbehandelter Hornhaut nachweisen. Das endoplasmatische Reticulum scheint eher zugenommen zu haben, stellenweise finden sich mehr und kürzere Anschnitte. Vereinzelt zeigen sich im Kern Nucleolen. Die Entstehung der elektronendichten Körper im Cytoplasma der Fibrocyten konnte bisher nicht verfolgt werden. Im Stroma tauchen mehrfach Granulocyten auf (Abb. 9), die hier weniger langgestreckt als die Fibrocyten erscheinen. Sie sind gut erkennbar durch ihren mehrfach geteilten, segmentierten Kern, der bis auf ein helles Zentrum auffallend elektronendicht erscheint, die zahlreichen, gleichförmigen runden Lysosomen und das sehr reichliche Glycogen im Cytoplasma (Ross, 1969).

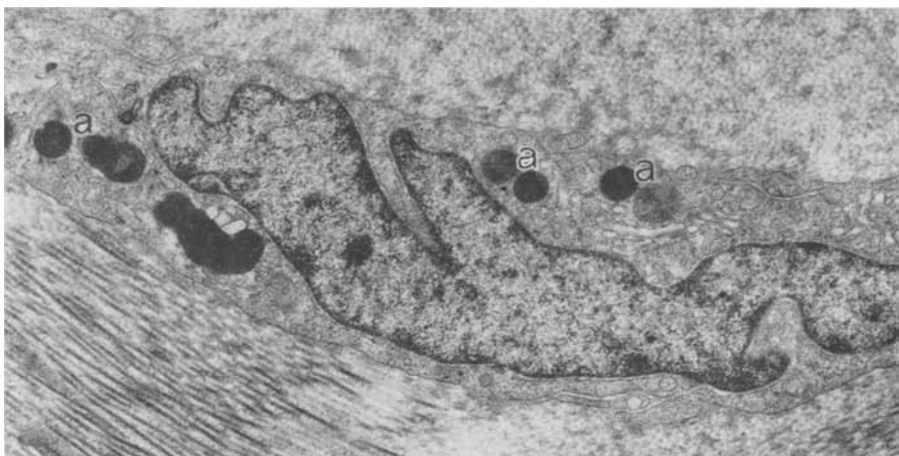
Im Stroma wird zwischen den Kollagenfibrillen herdförmig eine grau, homogene Substanz sichtbar, die dem injizierten Boviserin entsprechen könnte.

3. 24 Std nach Injektion

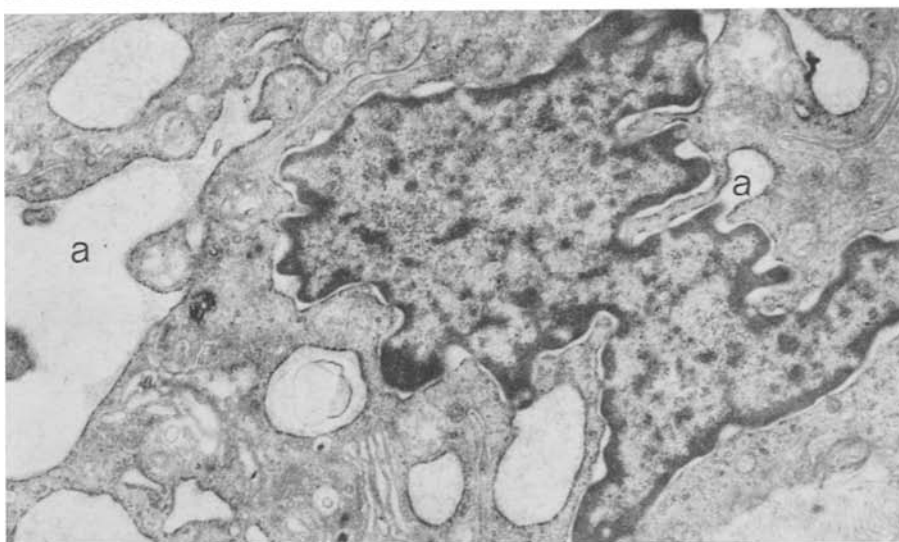
Die beschriebenen Veränderungen sind nun deutlicher und gröber geworden. Das Cytoplasma der Fibrocyten zeigt außerdem unregelmäßig geformte Vacuolen. Die charakteristischen elektronendichten Körper, die Lysosomen entsprechen könnten, haben anscheinend durch Vereinigung mehrerer an Größe zugenommen, sind auch stellenweise in Auflösung begriffen und liegen am Rand der Vacuolen. Fetttropfen werden öfter nachweisbar, desgleichen tritt Glykogen vereinzelt auf. In weniger stark alterierten Zellen hat das endoplasmatische Reticulum deutlich zugenommen.

Abb. 2. Dreipoliger Fibrocyt aus unbehandelter Hornhaut, Kern (a), endoplasmatisches Reticulum (b), Protofibrillen (c). 18300:1

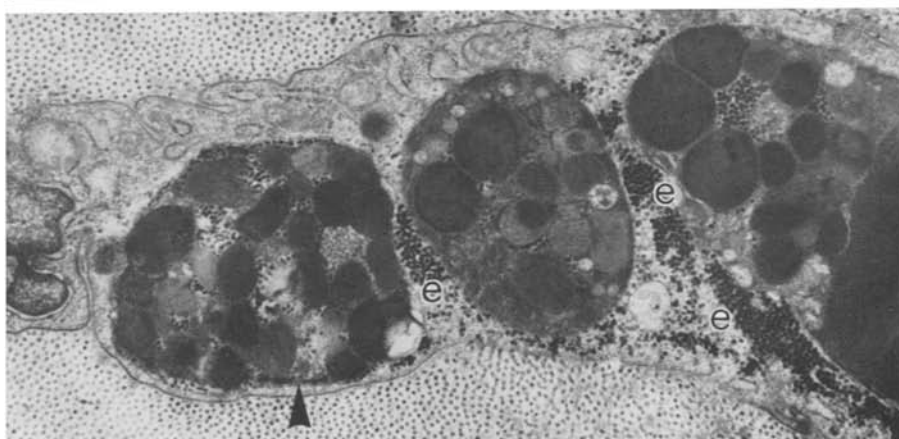
Abb. 3. Makrophage aus unbehandelter Hornhaut. Wenig elektronendichtes, feingranuläres Cytoplasma. Verschiedene Vacuolen mit doppelter Membran (a), endoplasmatisches Reticulum (b), Mitochondrium (c). 18300:1



4



5



6

Abb. 4-6

Bei Übersichtsaufnahmen fällt eine gewisse Zunahme der Dicke der Fibrocyten auf.

Die Granulocyten sind auch hier nachweisbar, z.T. besteht enger Kontakt zu den Fibrocyten, oft liegen sie auch völlig isoliert abgerundet im Stroma, z.T. besitzen sie auffallende, tentakelartige Pseudopodien. Charakteristisch sind die reichlichen Glykogenkörner. Ein deutlicher oder auffallender Untergang kollagener Fibrillen hat nicht stattgefunden.

4. 38 Std nach Injektion

Die genannten Veränderungen lassen sich weiter verfolgen. Vacuolige Zellveränderungen sind jetzt z.T. Anzeichen von Zelluntergängen, da die gesamte Struktur aufgelockert, z.T. auch aufgelöst und weniger elektronendicht erscheint. Typisch ist, daß diese Vacuolen oft von nicht intakten Membranen begrenzt werden und sehr unregelmäßige Gestalt haben.

Daneben lassen sich Änderungen ähnlicher Art beobachten, die eher den Rückschluß auf eine aktive, nicht degenerative Reaktion der Fibrocyten nahelegen. Die hier zu beobachtenden, z.T. sehr großen, rundlichen, in einem Fall auch langgestreckten Vacuolen (Abb. 5) sind Erweiterungen des endoplasmatischen Reticulums, wie an den intakten, mit Ribosomen besetzten Membranen erkennbar wird. Im Inneren finden sich oft Reste einer wenig elektronendichten, feinkörnigen Substanz. Die perinucleäre Zisterne ist streckenweise erweitert und steht mit den vacuoligen endoplasmatischen Räumen mehrfach in freier Verbindung. In einzelnen Fällen findet sich auch eine deutliche Zunahme des endoplasmatischen Reticulums, verbunden mit Fibrillogenese. Sonstige, schon genannte Veränderungen, wie deutliches Hervortreten der Golgizone und Vermehrung von Myelinfiguren sowie sekundäre Lysosomen, sind auch hier wieder zu beobachten. Eine Mitochondrienzunahme ist bisher nicht sicher.

Änderungen des gesamten Bildes lassen sich zusammenfassen in:

- a) vermehrtem Auftreten von Makrophagen und erstmals
- b) Nachweis von straßen- oder streifenförmig gelagertem Material aus nekrotischen Zellen.

Über die Herkunft der Makrophagen läßt sich keine Aussage machen, sowohl erscheint ihre Umwandlung aus Fibrocyten möglich als auch ihre Einwanderung, da ja zum selben Zeitpunkt auch schon Granulocyten aufgetreten sind. Immerhin besteht z.T. eine auffallende Ähnlichkeit der Gestalt zwischen Makrophagen und Fibrocyten, unterschiedlich sind, wie schon beschrieben, Zusammensetzung und Inhalt des Cytoplasma und Kernform und Kerngröße. Im Gegensatz zu den oft auch völlig isoliert angetroffenen Granulocyten beobachtet man zwischen Makro-

Abb. 4. Langgestreckter Fibrocyt mit elektronendichten Granula (a), 12 Std nach Boviserin-Injektion. 16800:1

Abb. 5. Vacuolisierung des endoplasmatischen Reticulums (ER) und der perinucleären Zisterne (a) eines breiten Fibrocyten 48 Std nach Boviserin-Injektion. 13000:1

Abb. 6. Fibrocyt mit elektronendichten Einschlüssen, gegen das ungebundene Cytoplasma durch eine Membran begrenzt (▲) Freies Glykogen (e). 17400:1

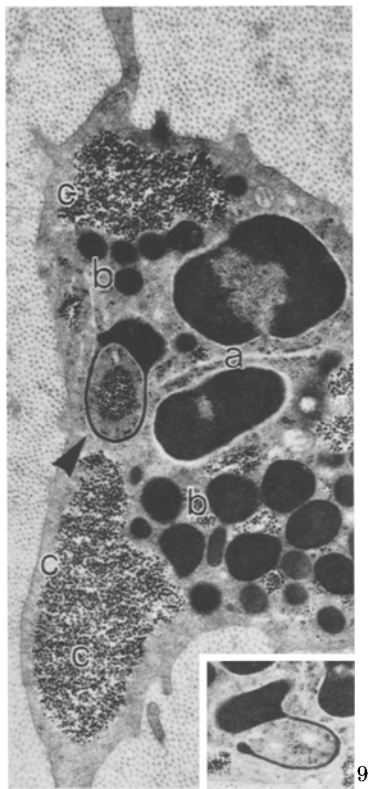
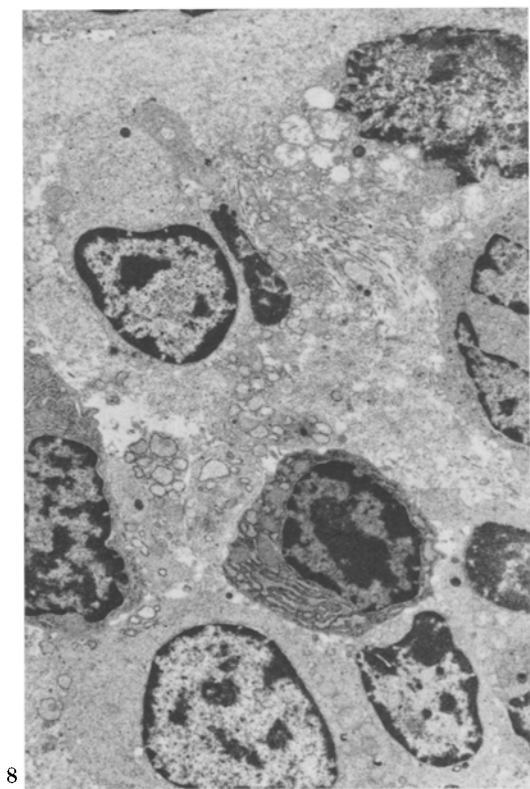
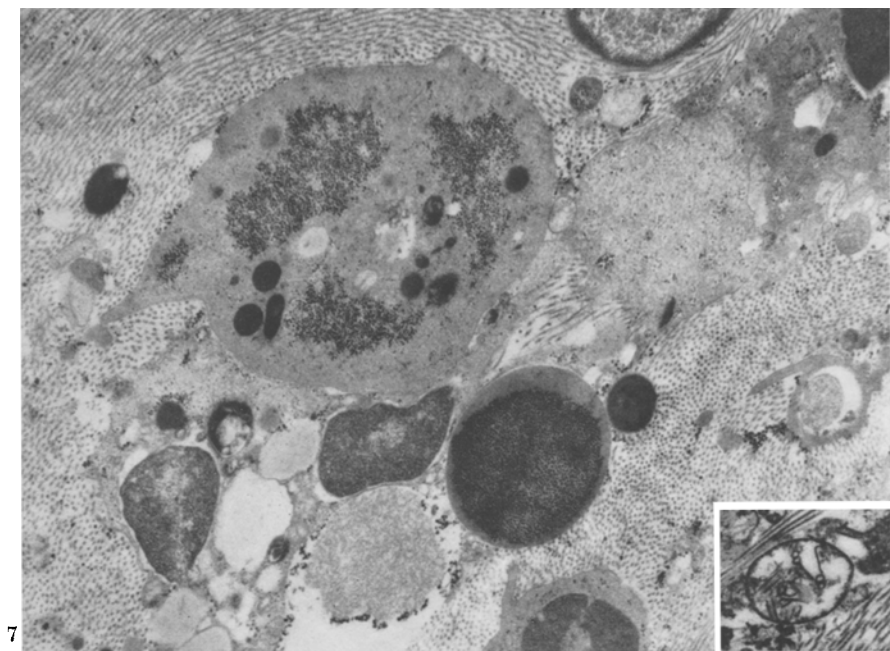


Abb. 7-9

phagen und Fibrocyten immer einen engen lokalen Zusammenhang. Mehr abgerundete und weniger gestreckte Makrophagen zeigen Pseudopodienbildung, die in geringem Maße auch bei Fibrocyten beobachtet wird.

Neben verstreut liegenden, wenig elektronendichten und offenbar nekrotischen einzelnen Fibroblasten findet sich die beschriebene Streifenbildung aus nekrotischem Material (Abb. 1a), das ausgeprägt elektronendicht erscheinende Zellbestandteile bietet (Abb. 7). Charakteristisch ist hier das Fehlen von Zellgrenzen, denen diese Strukturen zugeordnet werden könnten. Es finden sich sehr elektronendichte Kernreste, oft noch mit Resten nachweisbarer Membranen, sog. nackte Kerne, zahlreiche, unterschiedlich dichte Lysosomen, Reste von endoplasmatischem Reticulum, helle, feinkörnige Grundsubstanz und leere Vacuolen, ferner dazwischen intakte oder zugrunde gehende Granulocyten. In der Umgebung dieser Streifen besteht keine Auflösung kollagener Fibrillen. Die Identifizierung dieser genannten Zellbestandteile gelingt nur an elektronenmikroskopischen Bildern.

Selten wurde eine Kombination von Charakteristika der Fibrocyten mit denjenigen von Granulocyten gefunden (Abb. 6): In einem Fibrocyten, der sonst nur mäßig verändert erscheint, liegen große, annähernd rundliche Körper. Sie sind durch eine Membran gegen das umgebende Cytoplasma abgegrenzt und enthalten neben wenig Glykogen sehr reichlich kleinere, unterschiedlich große, runde dunkle Körper. Diese entsprechen anscheinend in ihrer Feinstruktur den nach 12 Std beschriebenen Lysosomen, jene waren aber vielgestaltiger und lagen einzeln. In der Umgebung der größeren Einschlüsse findet sich auch im Cytoplasma des Fibrocyten eine Ansammlung von Glykogen, während der übrige Anteil des Fibrocyten kein Glykogen zeigt.

Wie schon beschrieben, lassen sich einzeln liegende und dem Verband von Fibrocyten angegliederte Granulocyten zeigen. Auffallend ist immer wieder die große Kerndichte sowie die große Zahl an Lysosomen und Glykogengranula. Mehrfach und häufiger als bei Fibrocyten kommt ein Centriol zur Beobachtung. Mitochondrien sind dagegen ausgesprochen selten. Eine charakteristische Besonderheit stellen in Zusammenhang mit den Kernen stehende streifen- oder halbringförmige Strukturen dar, die wie eine schlaufenartige Verdichtung und Verbreiterung der Kernmembran imponieren (Abb. 9). Daß es sich um Einschlüsse von Nachbarsubstanz in Kernmaterial handelt, das durch eine quer-verlaufende Schnittrichtung ringförmig umgrenzt erscheint, läßt sich ausschließen (Abb. 9, Einschub).

Abb. 7. Streifenförmige Nekrose 48 Std nach Boviserin-Injektion. Kernreste. 11600:1. *Einschub*: Tubuläre Strukturen in einem nekrotischen Bezirk, 72 Std nach Injektion. 12800:1

Abb. 8. 48 Std nach Injektion von Boviserin mit Ferritinzusatz; das Entzündungsbild wird durch massenhaft einkernige Rundzellen beherrscht. 12800:1

Abb. 9. Granulocyt mit charakteristischer Kernsegmentierung (a) und schlaufenartiger Bildung an einem Kernanteil (▲), Granula (b) und Glykogen (c), 38 Std nach Injektion. 12800:1. *Einschub*: Unvollständige Schlaufe, Stufenschnitt. 10000:1

5. 48 Std nach Injektion

Nach 48 Std ist die Streifenbildung zwischen Hornhautzentrum und Limbus deutlich ausgebildet, am lebenden Tier beobachtet man jetzt eine neben der allgemeinen diffusen, opak erscheinenden Trübung eine dichtere zentrale Trübung. Innerhalb der Streifenbildung finden sich wieder die charakteristischen, gut sichtbaren Zellreste, jetzt auch vermehrt Granulocyten. Im Stroma, das den Nekrorestreifen benachbart ist, lassen sich Granula von der Größe und Dichte der Glykogengranula frei nachweisen. In einem zentralen Bereich findet sich ein Bündel einer sehr feinfilamentären Substanz, die dem Aussehen von Fibrin ähnlich ist. Die Veränderungen an den Fibroblasten entsprechen denen, die nach 38 Std auftraten, vacuolige Erweiterungen des endoplasmatischen Reticulum herrschen vor. In der Peripherie sind Granulocyten zwischen den Fibrocyten sichtbar. Weiterhin treten Makrophagen auf. Im zentralen Bereich sind vereinzelt auch undeutlich werdende Kollagenfibrillen zu beobachten.

Injiziert man anstelle des Boviserin eine Mischung aus Boviserin mit Ferritin im Verhältnis 20:1, so kommt es sofort zu einer starken, nicht mehr verschwindenden Trübung, der Entzündungsverlauf ist erheblich heftiger, wie oben beschrieben.

Auffallend ist hierbei im histologischen und elektronenmikroskopischen Bild nach 48 Std die Großzahl verschiedener mononucleärer Zellen (Abb. 8) und die Capillarisation auch im zentralen Hornhautbereich. Den Capillaren gehen frei im Gewebe nachweisbare Erythrocyten örtlich voraus (Jakus, 1954; Yamagami, 1970). Ein Teil der mononucleären Zellen ist abgerundet, zeigt meist einen einzelnen, großen, annähernd runden oft exzentrischen Kern. Dem Aussehen nach könnte es sich um Plasmazellen handeln. Die übrigen Zellen sind ebenfalls mononucleär, jedoch liegt der Kern nicht so deutlich exzentrisch, und im Cytoplasma fehlen die typischen endoplasmatischen Reticulum-Strukturen. Granulocyten fehlen bei diesen Untersuchungen fast vollständig. Im übrigen kommen die gleichen Streifenbildungen nekrotischer Zellen sowie die anderen schon in den 38 Std-Präparaten beschriebenen Veränderungen der Fibrocyten zur Darstellung. Es fallen ferner vermehrt die Zellen auf, die wie Makrophagen erscheinen. Zum Teil gehen diese anscheinend nach 48 Std auch schon zugrunde. Stärker als bei den anderen Versuchen tritt eine Kollagennekrose hervor.

6. 72 Std nach Injektion

Die qualitativen Änderungen nach 72 Std sind gering. Nekrorestreifenbildung und Granulocyten zwischen Limbus und Injektionsstelle beherrschen das Bild. Die Nekrose ist großflächig und scharf abgesetzt gegen die Umgebung. Öfter treten zwiebelschalenartige Strukturen in zugrunde gehenden Zellen auf. Erstmals lassen sich tubuläre Strukturen, die meist innerhalb einer rundlichen oder ovalen Vacuole liegen und auffallend gleichförmig sind, nachweisen (Ruska und Ruska, 1964; Ruska, 1966) (Abb. 7, Einschub).

Gelegentlich zeigen periphere Fortsätze von Fibrocyten eigenartige sackartige Erweiterungen. Darin finden sich in einer feinkörnigen Grundsubstanz rundliche, elektronendichte Körper. Dieselbe Beobachtung konnte erstmals 63 Std nach In-

jektion gemacht werden. Auch jetzt zeigen einzelne Fibrocyten noch Lysosomen vom Charakter der nach 12 Std beschriebenen.

In sonst unverändert erscheinenden Granulocyten kommt es häufiger zu der beschriebenen Ausbildung von Kernschlaufen. Auch jetzt finden sich noch Zelluntergänge. Ganz vereinzelt treten auch lymphocytenähnliche Zellen auf.

Im Gegensatz zu den Capillarisierungen 48 Std nach Boviserin mit Ferritin ist 72 Std nach reiner Boviserin-Injektion keine Capillarisierung nachweisbar.

Degenerative Vorgänge dauern weiter an, und auch 120 Std nach Injektion ist noch keine wesentliche Änderung dieses Bildes eingetreten.

Diskussion

Die anfänglich gestellte Frage, wieweit Reaktionen des lokalen Bindegewebes und seiner Zellen und der Blutgefäße auf einen örtlichen Entzündungsreiz getrennt beobachtet werden können, läßt eine begrenzte Beantwortung zu.

Sehr früh, d.h. schon 12 Std nach Injektion, lassen sich zwischen Limbus und Injektionsstelle Granulocyten beobachten, deren Zahl mit wachsender Zeit nach der Injektion deutlich zunimmt. Abhängig ist ihre Zahl auch vom Grad der Entzündung, der bei den einzelnen Tieren variiert. Die histologisch häufig nicht klar erkennbaren Granulocyten lassen sich elektronenmikroskopisch meist deutlich von anderen Zellen unterscheiden. Selten nur treten Kombinationsformen zwischen Fibrocyten und Granulocyten auf (Abb. 6).

Die Reaktion des Randschlingennetzes mit Gefäßerweiterung und Extravasaten läßt den Rückschluß auf eine frühe Beteiligung der Blutgefäße und der Zellen des Blutes am Entzündungsvorgang zu. Ein deutlicher Hinweis ist die gefundene Capillarisierung in den 2 Fällen der kombinierten Injektion von Boviserin mit Ferritin. Hier wird auch die Bedeutung des injizierten Materials für die Art der einwandernden Zellen offenbar, es finden sich hier fast nur Plasmazellen und Lymphocyten. Die Einwanderung von Granulocyten vom Limbus her wird so als abhängig von den Versuchsbedingungen erkennbar. Die Reaktion der örtlichen Bindegewebszellen sind degenerativer und reaktiver Art, sie bestehen z.T. in Zelluntergängen und z.T. in Neubildungen von Cytoplasma und Kernbestandteilen sowie in Vermehrung oder Vergrößerung schon vorhandener Zellorganellen.

Eine Restitution ist bis 120 Std nach Injektion noch nicht zu beobachten, selbst in einem Fall 24 Tage nach Injektion war es noch zu keiner Reparatation gekommen.

Im Hinblick auf die Herkunft der vermehrt gefundenen Makrophagen sind in der Literatur die Auffassungen unterschiedlich (Literatur s. Burkl und Schwab, 1959; van Winkle, 1967). Diese Frage ist auch nach den hier mitgeteilten elektronenmikroskopischen Befunden nicht geklärt. Formale Ähnlichkeit ist für die Entstehung von Makrophagen aus Fibroblasten kein ausreichender Beweis (s. auch Kitano und Goldmann, 1966).

Auch bei makroskopisch zentral erscheinender Trübung ließ sich in unseren Fällen histologisch und elektronenmikroskopisch eine kontinuierliche, streifenartige Verbindung zwischen Herd und Limbus nachweisen. Diese besteht aus reichlich nekrotischen Zellen, Zellresten und Granulocyten.

Von Anfang an besteht eine deutliche Mitbeteiligung des Randschlingennetzes. Unter diesen Untersuchungsbedingungen ist die Hornhaut mit ihrem Randschlingennetz als eine synergistisch arbeitende Einheit zu verstehen.

Literatur

- Backmann, R., Müller, K.-M.: Die Herkunft der Leukozyten bei der Entzündung. Eine autoradiographische Untersuchung. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **108**, 446—447 (1966).
- Büchner, F.: Allgemeine Pathologie, 2. Aufl. München-Berlin: Urban & Schwarzenberg 1956.
- Burkl, W., Schwab, F.: Histologischer und immunhistologischer Nachweis der lokalen Antikörperbildung in der Hornhaut. *Albrecht v. Graefes Arch. Ophthalm.* **161**, 168—184 (1959).
- Busse-Grawitz, P.: Experimentelle Brandwunden der Haut. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **33**, Tagg. 220 (1949).
- Experimentelle Entzündungen durch schwache physikalische Reize (Wärme, Kälte, Ultraviolettlicht). *Virchows Arch. path. Anat.* **323**, 622—628 (1953).
- Die Umwandlung von Epithelien in leukozytäre Entzündungszellen. *Med. Klin.* **58**, 1022—1026 (1963).
- Cohnheim, J.: Neue Untersuchungen über die Entzündung. Berlin 1873. Zit. nach Büchner, F., Allgemeine Pathologie, 2. Aufl. München-Berlin: Urban & Schwarzenberg 1956.
- Vorlesungen über allgemeine Pathologie. Berlin 1878. Zit. nach Büchner, F., Allgemeine Pathologie, 2. Aufl. München-Berlin: Urban & Schwarzenberg 1956.
- Doerr, W., Barsewisch, B. v., Fritsch, H., Rossner, J. A., Ule, G.: Paul Busse Grawitz und die Vorgänge bei der Entzündung. *Med. Klin.* **60**, 1828—1834 (1965).
- Fasske, E.: Über die Herkunft der Entzündungszellen. *Med. Klin.* **56**, 1313—1316 (1961).
- Über die parenchymatöse Entzündung. *Med. Klin.* **57**, 1933—1936 (1962).
- Fritsch, H., Barsewisch, B. v.: Fermentzytochemische Untersuchungen an Tränen- und Blutzellen bei Mensch und Kaninchen. (Ein Beitrag zur Herkunft der Entzündungsleukozyten am Auge). *Beitr. path. Anat.* **132**, 469—479 (1965).
- Giesecking, R.: Mesenchymale Gewebe und ihre Reaktionsformen im elektronenmikroskopischen Bild. Veröffentlichungen aus der morphologischen Pathologie, H. 72 (1966). Stuttgart: Gustav Fischer 1966.
- Gusek, W.: Zur Ultrastruktur und Natur der Granula in Fibrozyten und „pseudoeosinophilen“ Leukozyten im faserbildenden Granulationsgewebe. *Frankfurt. Z. Path.* **70**, 523—535 (1960).
- Submikroskopische Untersuchungen zur Feinstruktur aktiver Bindegewebszellen. Veröffentlichungen aus der morphologischen Pathologie, H. 64 (1962). Stuttgart: Gustav Fischer 1962.
- Hamperl, H.: Über endometriale Granulozyten (endometriale Körnchenzellen). *Klin. Wschr.* **32**, 665—668 (1954).
- Jakus, M. A.: Studies on the cornea. I. The fine structure of the rat cornea. *Amer. J. Ophthalm.* **38**, 1, II, 40—53 (1954).
- Ocular fine structure, 1. Aufl. Boston: Little, Brown & Cie. 1964.
- Kitano, S., Goldmann, J. N.: Cytologic and histochemical changes in corneal wound repair. *Arch. Ophthalm.* **76**, 345—354 (1966).
- Letterer, E.: Allgemeine Pathologie. Stuttgart: Georg Thieme 1959.
- Marchand, F.: Die Herkunft der Exsudatzellen. In: Krehl, L., Marchand, F. (Hrsg.), Handbuch der allgemeinen Pathologie, Bd. 4, 1. Abt., S. 287—305. Leipzig: S. Hirzel 1924.
- Maximow, A.: Bindegewebe und blutbildende Gewebe. In: V. Möllendorff, W., (Hrsg.), Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Bd. II, S. 232—583. Berlin: Springer 1927.
- Über die Histogenese der entzündlichen Reaktion, Nachprüfung der v. Möllendorff'schen Trypanblauversuche. *Beitr. path. Anat.* **82**, 1—26 (1929).
- Möllendorff, W. v., Möllendorff, M. v.: Das Fibrozytennetz im lockeren Bindegewebe; seine Wandlungsfähigkeit und Anteilnahme am Stoffwechsel. *Z. Zellforsch.* **3**, 502—601 (1926).
- Müller, K.-M.: Elektronenoptische Untersuchung zur Frage der Umwandlung von Bindegewebszellen in Leukozyten. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **107**, 580 (1965).

- Pau, H.: Woher stammen die in die Hornhaut einwandernden Leukozyten? *Ophthalmologica* (Basel) **137**, 254—269 (1959).
- Romeis, B.: *Mikroskopische Technik*, 16. Aufl. München u. Wien: Oldenbourg 1968.
- Ross, R.: Wound healing. *Sci. Amer.* **220**, Nr. 6, 40—50 (1969).
- Ruska, H.: Wirkungen von Staphylokokkentoxin an der Kaninchenhaut. In: R. Heister und H. F. Hofmann (Hrsg.). *Die Entzündung — Grundlagen und Pharmakologische Beeinflussung*. Internationales Symposium, Freiburg im Breisgau, 4.—6.5.1966. München-Berlin-Wien: Urban & Schwarzenberg 1966.
- Ruska, C.: Tubuläre Strukturen in Zellkernen toxischgeschädigter Leukozyten. *Z. Naturforsch.* **19b**, 774—775 (1964).
- Virchow, R.: *Cellularpathologie*, 4. Aufl. Berlin 1871. Zit. nach Büchner, F., *Allgemeine Pathologie*, 2. Aufl. München-Berlin: Urban & Schwarzenberg 1956.
- Winkle, W. van, Jr.: The fibroblast in normal healing. *Surg. Gynec. Obstet.* **124**, 368—386 (1967).
- Yamagami, I.: Electronmicroscopic study on the cornea. I. The mechanism of experimental new vessel formation. *Jap. J. Ophthal.* **14**, 40—58 (1970).

Dr. med. K. Höfeld
Universitäts-Augenklinik
D-4000 Düsseldorf, Moorenstr. 5
Deutschland