

Die Histomorphologie des Abstoßungsphänomens nach Transplantation der Lunge am Hund

T. Radaszkiewicz, R. Gherardini, A. Keiler, W. Kreuzer und G. Salem

Pathologisch-Anatomisches Institut der Universität Wien

(Vorstand: Prof. Dr. J. H. Holzner)

und II. Chirurgische Universitätsklinik (Vorstand: Prof. Dr. J. Navrátil)

Eingegangen am 20. Oktober 1973

Histomorphology of the Rejection Reaction after Lung Transplantation in Dog

Summary. Left homologous lung transplantation was performed in ten dogs. No post-operative immunosuppressive treatment was given. Biopsies were taken daily after transplantation to follow the morphologic changes during rejection. About the fourth day after transplantation, striking morphologic changes were seen in the pneumocytes and differences in the intensity of the reaction were visible between peripheral and central pulmonary regions.

Die Kenntnis der histomorphologischen Veränderungen der Abstoßungsreaktion nach Lungentransplantation kann als eine der Grundlagen für die erfolgreiche Durchführung dieser Organtransplantation beim Menschen gelten.

Die außerordentlich schlechten klinischen Ergebnisse der bisher durchgeführten Transplantationen der Lunge machen weitere Grundlagenstudien auf diesem Gebiet notwendig (Ford *et al.*, 1973; Fujimura *et al.*, 1970; Mitchell *et al.*, 1970; Veith *et al.*, 1973). Die bisher durchgeführten Eingriffe bei 31 Patienten haben ergeben, daß die Mißerfolge auf komplexe Funktionsstörungen zurückzuführen sind.

Die vorliegende Studie soll versuchen, eine Korrelation zwischen der Morphologie der Abstoßungsreaktion bei der Lunge und den besonderen Funktionsstörungen herzustellen und die Frage der Differentialdiagnose zwischen Abstoßungsreaktion und Pneumonie zu behandeln (Gondos *et al.*, 1973; Green, 1973; Veith *et al.*, 1973; Wildevuur *et al.*, 1973).

Material und Methodik

In der gegenwärtigen Versuchsserie wurden 10 Hunde (Beagles) mit einem Gewicht von 12—19 kg verwendet.

Es wurde eine standardisierte linksseitige homologe Lungentransplantation durchgeführt. Nach der Organentnahme wurden die Lungen mit 500 ml laktierter Ringer-Lösung von etwa 5° C gespült. Nach linksseitiger Pneumonektomie wurde am Empfängerhund zuerst die Vorhofanastomose, dann die Anastomose der Arteria pulmonalis und schließlich die Bronchusanastomose durchgeführt. Eine immunosuppressive Therapie wurde absichtlich unterlassen.

Postoperativ wurde aus der transplantierten Lunge täglich mit einer Menghini-Nadel eine Punktionsbiopsie durchgeführt. Zur Berücksichtigung evtl. vorhandener lokaler Differenzen wurden verschiedene Punktionsstellen gewählt.

Die etwa 2 mm großen Gewebstücke wurden nach Fixation in Glutaraldehyd (pH 7,2) über Phosphatpuffer, 1%iges phosphatgepuffertes Osmiumtetroxyd, Phosphatpuffer und übliche Alkoholreihe in Epon eingebettet.

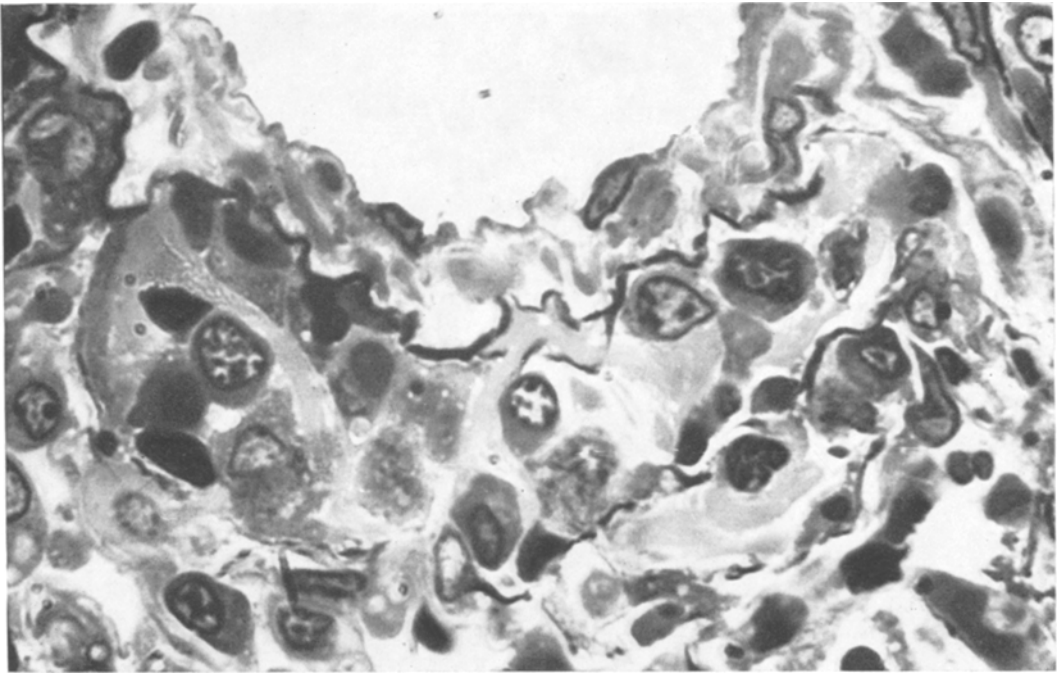


Abb. 1. Vierter postoperativer Tag: Die Wand einer Arterie ödematös und von großen Lymphocyten und Plasmazellen durchsetzt. Endothelzellen leicht geschwollen, elastische Fasern gefältelt. Semidünnschnitt, Toluidinblau, ca. 630 \times

Es wurden Semidünnschnitte (1 μ) angefertigt und mit 1%igem Toluidinblau, mit Silbermethenamin nach Movat und mit chromotropem Anilinblau (CAB) gefärbt.

Nach dem Tod der Tiere bei totaler Abstoßung wurde sowohl die transplantierte Lunge wie auch die belassene Eigenlunge in der angegebenen Weise histologisch untersucht.

Ergebnisse

Die kürzeste Überlebenszeit betrug fünf Tage, die längste zwölf, wobei die transplantierten Lungen bei der Autopsie makroskopisch und histologisch schwere Zeichen einer Abstoßungsreaktion zeigten.

Die knapp vor der Transplantation entnommenen Gewebstücke beider Spenderlungen zeigten keinerlei pathologische Veränderungen. Auch die 20 min nach der Transplantation intraoperativ durchgeführte Biopsie ergab bei allen Versuchstieren unauffällige morphologische Verhältnisse.

24 Std. postoperativ fanden sich mäßig ausgeweitete Capillaren, die sich teilweise in die Alveolen vorwölbten. Das alveoläre Interstitium war an einzelnen Stellen ödematös durchtränkt. Auch perivascularär zeigte sich im adventitiellen Gewebe ein geringes Ödem. In seltenen Fällen waren Alveolarmakrophagen in den Alveolarlichtungen nachzuweisen. Die Pneumocyten des granulären Typs erschienen unauffällig.

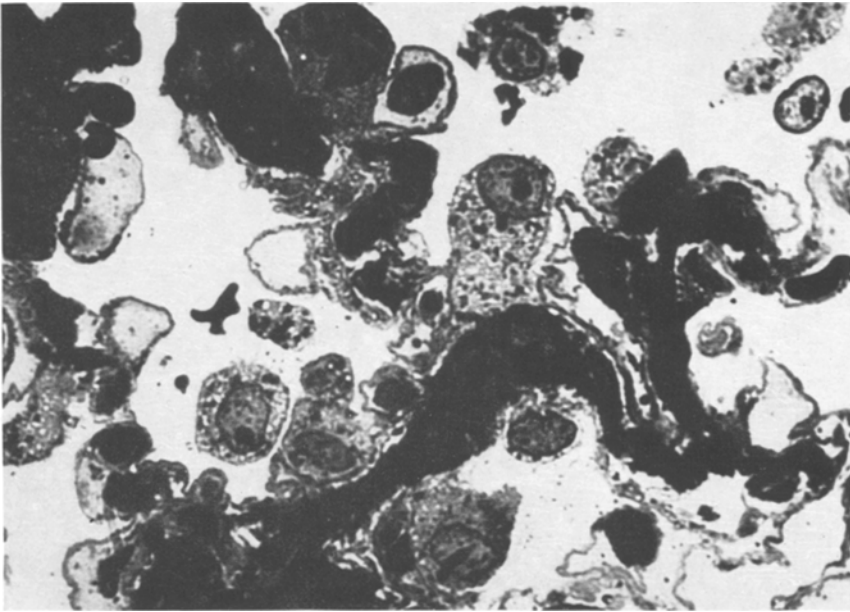


Abb. 2. Vierter postoperativer Tag: Intraalveolär Erythrocyten, vermehrt vakuolisierte, sich in die Lichtung abschilfernde Pneumocyten. Einzelne Vakuolen sind von breiten versilberbaren Membranen umgeben (lamellated bodies der Pneumocyten II), Semidünnschnitt Movat, ca. 1000 \times

Auch am 2. *postoperativen Tag* fand sich lediglich ein gering verstärktes interstitielles und perivaskuläres Ödem. In den Alveolen waren ganz vereinzelt Erythrocyten neben Alveolarmakrophagen erkennbar. Manche Arteriolen zeigten eine spärliche Fältelung der elastischen Lamellen.

Im weiteren Verlauf kam es am 3. *postoperativen Tag* zu vereinzelt perivaskulären Infiltraten mit großen Lymphocyten und histiocytären Elementen mit deutlich sichtbaren Nukleolen (Abb. 1). Vereinzelt mononucleäre Zellen fanden sich auch in den Lumina einiger Gefäße (Abb. 3). Drei der Versuchstiere zeigten bereits zwischen diesen Zellen granuläre Mikrothromben. Capillarendothelzellen erwiesen sich stellenweise als gering angeschwollen, Pneumocyten zweiter Ordnung boten bei vier unserer Versuchstiere zu diesem Zeitpunkt eine geringe Vakuolisierung ihres Cytoplasmas mit Volumsvermehrung und lösten sich vereinzelt aus ihrem Verband.

Ein intraalveoläres Ödem fand sich in geringem Ausmaß bei allen Tieren. In zwei Fällen traten außerdem noch granuläre und fädige Fibrinmassen in den Alveolarlichtungen auf, die sich etwas später — am 4. Tag — bei weiteren zwei Tieren nachweisen ließen.

Vakuolisierte Pneumocyten zweiter Ordnung waren nach 96 *Std* ebenso wie perivaskuläre mononucleäre Infiltrate häufiger anzutreffen (Abb. 2). Alveolarphagocyten lagen vornehmlich in den Lumina der Alveolen. Makrophagen traten gehäuft in jenen Alveolen auf, in denen fädige und granuläre eiweißartige Substanzen enthalten waren.

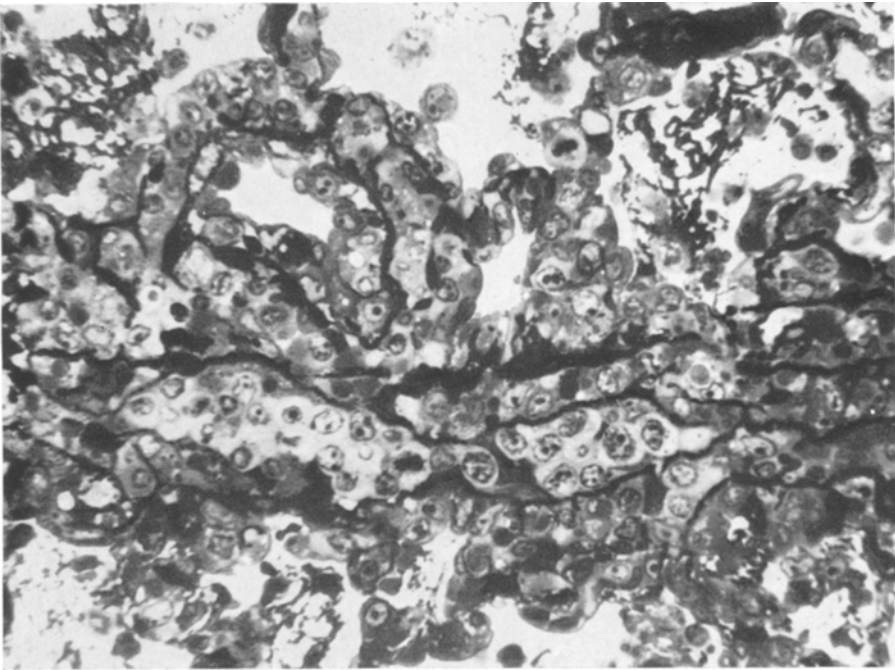


Abb. 3. Fünfter postoperativer Tag: Massive mononucleäre Infiltration von Gefäßwänden und interalveolären Septen. In der Lichtung des Gefäßes zahlreiche mononucleäre Elemente. In den Alveolen neben Erythrocyten, Fibrin, Pneumocyten auch vereinzelt Plasmazellen. Semidünnschnitt Movat, ca. 250×

Peribronchiale, mononucleäre Infiltrate fanden sich entsprechend dem Gefäßreichtum des Gewebes am 3.—4. *postoperativen Tag*. Zu einem späteren Zeitpunkt waren sie auch im submukösen Gewebe nachzuweisen, wobei das Epithel teilweise abgeschilfert war.

Am 5. *postoperativen Tag* zeigten drei der Versuchstiere bereits fokale Nekrosen, beträchtliche Alveolarblutungen, Mikrothromben und einzelne neutrophile Leukocyten (Abb. 4). Zwei dieser Tiere kamen noch am gleichen Tag, das dritte am 6. *postoperativen Tag* ad exitum.

Die überlebenden Tiere zeigten in den folgenden Tagen eine Verstärkung dieser morphologischen Veränderungen. Drei Tiere starben am 8., eines am 9., zwei am 11. und eines am 12. *postoperativen Tag*.

Die Transplantate wiesen zu diesem Zeitpunkt ausgedehnte Nekrosen, alveoläre Blutungen, massive Ödeme und mononucleäre Infiltrate, weiters spärlich neutrophile Leukocyten und Kerntrümmer auf. Bei den vor dem 7. Tag untersuchten Transplantaten fand sich eine Zunahme der Intensität der Veränderungen von peripher nach zentral. Bei später untersuchten Transplantaten war diese Differenz nicht mehr zu sehen.

Bakterien waren in keiner der Gewebeproben nachweisbar.

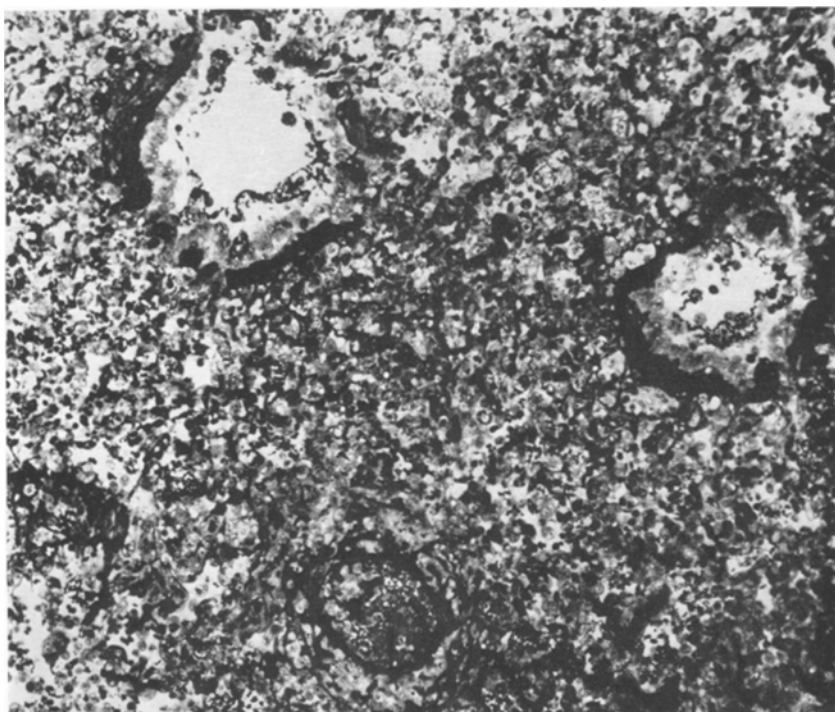


Abb. 4. Siebenter postoperativer Tag: Autopsiebefund: Massive celluläre Infiltration der peribronchialen, perivaskulären und interstitiellen Gewebe. Erythrocyten, Fibrin und mononucleäre Zellen intraalveolär. Fokale Nekrosen. Semidünnschnitt Movat, ca. 100×

Diskussion

Anhand der histologischen Befunde läßt sich ein zeitlicher Ablauf der Abstoßungsreaktion bei nicht mit Immunsuppressiva behandelten lungentransplantierten Hunden rekonstruieren.

Die am 3. Tag nach der Transplantation auftretende immunologisch bedingte Gefäßschädigung mit konsekutiver Exsudation ins Interstitium und vor allem in die Alveolen entspricht der auch bei anderen Organen bekannten akuten Abstoßungsreaktion.

Damit versteht sich das gleichzeitige Auftreten immunkompetenter Zellen (Kondo *et al.*, 1973; Mitchell *et al.*, 1970; Smith, 1972) und des intraalveolären und interstitiellen Ödems (Barnes *et al.*, 1963; Roda *et al.*, 1973) mit den beschriebenen Pneumocytenveränderungen (Molokhia *et al.*, 1971; Noireclerc *et al.*, 1973). Dieses ist von wesentlicher organfunktioneller Bedeutung und in anderen transplantierten Organen durch das Fehlen größerer Hohlraumssysteme in dieser Form nicht gegeben.

Mikrothromben, die bei drei Versuchstieren beobachtet wurden, könnten sowohl als Folge der Immunreaktion (Warren *et al.*, 1969), als auch als operativ bedingte Schockäquivalente verstanden werden. Ob hier der Operationsschock mit

konsekutiver Thrombocytenaggregation und plasmatischer Hyperkoagulabilität eine Rolle spielt (Bleyl *et al.*, 1971), muß im weiteren untersucht werden.

Die um den 4. Tag stärker in Erscheinung tretende Vakuolisierung und Vergrößerung der granulären Pneumocyten (Staudacher *et al.*, 1973) kann als Ausdruck einer Hyperaktivität im Sinne der Surfactant-Produktion gewertet werden (Waldhausen *et al.*, 1965). Diese Annahme stimmt mit der von Molokhia beschriebenen geringen Steigerung der "bubble stability" zwischen dem 4. und 6. Tag überein.

Durch den täglichen Wechsel der Punktionsstellen konnten wir lokale Unterschiede im histologischen Bild der Abstoßungsreaktion feststellen (Levin *et al.*, 1966). Die bei der Autopsie durchgeführte mikroskopische Untersuchung der Lungen der bis zum 7. Tag verstorbenen Tiere zeigte dann deutlich, daß die schwersten Veränderungen vor allem in den mehr zentral gelegenen Lungenabschnitten vorhanden waren. So fanden sich vor allem hilusnahe ausgedehnte Nekrosen mit Hämorrhagien, Zelldetritus und Exsudat, während in den peripheren Lungenarealen nur fokale Nekrosen, massive perivaskuläre Infiltrate und Ödeme vorlagen.

Bei den länger überlebenden Hunden waren diese Unterschiede nicht mehr anzutreffen, sondern alle Lungenabschnitte waren von ausgedehnten Nekrosen, Kerntrümmern, Blutungen und Infiltrationen von mononucleären Zellen durchsetzt (Flax *et al.*, 1966).

Gondos (1973) und Wildevuur (1973) erwähnen die Schwierigkeit der Differentialdiagnose zwischen Abstoßungsreaktion und Pneumonie. Das bei bakteriell bedingten Lungenentzündungen vor allem im Spätstadium leukocytär durchsetzte Exsudat bietet keine wesentlichen differentialdiagnostischen Probleme. Dagegen könnten viral bedingte Pneumonien wegen ihres lymphocytären Charakters zu einer Fehlbeurteilung führen.

Literatur

- Barnes, B. A., Flax, M. H., Burke, J. F., Barr, G.: Experimental pulmonary homografts in the dog I: Morphological studies. *Transplantation* **1**, 351—364 (1963)
- Bleyl, U., Büsing, C. M.: Perpetuation des Schocks durch die Schocklunge. *Z. prakt. Anästh. Wiederbeleb.* **6**, 249—262 (1971)
- Flax, M. H., Barnes, B. A.: The role of vascular injury in pulmonary allograft rejection. *Transplantation* **4**, 66—78 (1966)
- Ford, R. J., Kuhn, C. H.: Immunologic competence of alveolar cells. *Amer. Rev. resp. Dis.* **107**, 763—770 (1973)
- Fujimura, S., Nakada, T., Kawakami, M., Sukeno, T., Yonechi, M., Okaniwa, G., Kagami, Y., Suzuki, C.: Detection of immunoglobulins (gamma M and gamma G) by fluorescent antibody method in canine lung allotransplantation. *Tohoku J. exp. Med.* **101**, 183—198 (1970)
- Gondos, B., Shimada, K., Peter, M. E., Benfield, J. R.: Light and electron microscopic findings in canine lung transplants. In: *Morphology in lung transplantation*, p. 72—84. Basel: Karger 1973
- Green, G. M.: Lung defense mechanisms. *Med. Clin. North Amer.* **57**, 547—562 (1973)
- Kondo, Y., Turner, M. Don, Lockard, V. G., Hallford, Ch., Hardy, J. D.: Scanning electron microscopy of canine lung transplants. *J. thorac. cardiovasc. Surg.* **65**, 940—950 (1973)
- Levin, S. E., Deysine, M., Veith, F. J.: Surface active alveolar lining material and pulmonary disease. *Surg. Gynec. Obstet.* **123**, 853—858 (1966)

- Mitchell, R. I., Taranger, L. A., Tumiel, A.: Radioisotope scanning in experimental lung transplantation. *Chest* **57**, 468—474 (1970)
- Molokhia, F. A. S., Ponn, R. B., Asimacopoulos, P. J., Norman, J. C.: Microscopic and ultrastructural changes in unmodified canine lung allografts. *Arch. Surg.* **103**, 490—495 (1971)
- Noirelce, M., Sudan, N., Grosjeau, O., Payan, H., Lebreuil, G., Otte, H., Gayraud, P.: Ultrastructural study of rejection phenomena in the homografted dog lung. In: *Morphology in lung transplantation*, p. 37—45. Basel: Karger 1973
- Roda, C. L. P., Strandberg, J. D., Baker, J. W., Baker, R. R.: Serial changes in pulmonary blood flow occurring during acute rejection of a lung allograft. *J. thorac. cardiovasc. Surg.* **65**, 88—93 (1973)
- Smith, R. T.: The mechanism of graft rejection. *Clin. Orthop.* **87**, 15—18 (1972)
- Staudacher, C., Di Carlo, V., Bevilacqua, G., Bragherio, G., Sibilla, E., Staudacher, V.: Ultrastructural changes in canine lung allografts. In: *Morphology in lung transplantation*, p. 46—63. Basel: Karger 1973
- Veith, F. J., Sinha, S., Siegelmann, S. S., Hagstrom, W. C., Gliedman, M. L.: Canine lung allograft rejection with and without immunosuppression. In: *Morphology in lung transplantation*, p. 85—95. Basel: Karger 1973
- Veith, F. J., Koerner, S. K., Siegelmann, S. S., Palezari, P., Torres, M., Chandler, P., Kawakami, M., Hagström, J. W. C., Gliedman, M. L.: Recognition and treatment of rejection in experimental and human lung allografts. *Transplant. Proceedings* **5**, 783—786 (1973)
- Waldhausen, J. A., Giamonna, S. T., Kilman, J. W., Daly, W. J.: Effect of canine lung on pulmonary compliance and surfactant. *J. Amer. med. Ass.* **191**, 1002—1005 (1965)
- Warren, B. A., De Bono, A. H. B.: The ultrastructure of early rejection phenomena in lung homografts in dogs. *Brit. J. exp. Path.* **50**, 593—599 (1969)
- Wildevuur, Ch. R. H., Jerusalem, Ch. R., Lauweryns, L.: Morphological alterations after simultaneous bilateral lung homotransplantation under various conditions. In: *Morphology in lung transplantation*, p. 96—111. Basel: Karger 1973

Dr. T. Radaszkiewicz
Path.-Anatom. Institut
der Universität Wien
Spitalgasse 4
A-1090 Wien
Österreich

Dr. R. Gherardini, Dr. A. Keiler
Dr. W. Kreuzer, Dr. G. Salem
II. Chirurg. Universitätsklinik
Spitalgasse 23
A-1090 Wien
Österreich