

Aus der II. Medizinischen Universitätsklinik (Vorstand: Prof. Dr. G. GEYER), der I. Chirurgischen Universitätsklinik (Vorstand: Prof. Dr. A. FRITSCH), dem Institut für Blutgruppenserologie der Universität Wien (Vorstand: Prof. Dr. P. SPEISER) und dem Institut für Botanik, Technische Mikroskopie und Rohstofflehre der Technischen Universität Wien (Vorstand: Prof. Dr. E. BANCHER), Wien, Österreich

Hyperakute Nierentransplantat-Abstossung: Rasterelektronenmikroskopie der intrarenalen Arterien

CH. LEITHNER, H. PIZA-KATZER, P. KRUIK, M. WINTER, H. SINZINGER, W. R. MAYR und
H. STACHELBERGER

Im Rahmen einer hyperakuten Nierentransplantat-Abstossung kommt es vorwiegend durch präformierte Antikörper, die im Blut eines sensibilisierten Empfängers zirkulieren (WILLIAMS et al. 1967, 1968), zu einer plötzlichen schweren Endothelschädigung im Bereiche des Transplantates. Dies führt zu einem sofortigen Funktionsverlust des Organs, so dass die transplantierte Niere meist noch während der Transplantation wieder entfernt werden muss. Es handelt sich dabei um ein klinisch bedeutendes Phänomen. Experimentell stellt diese Form der Abstossung ein interessantes Modell einer plötzlich eintretenden, massiven immunologischen Schädigung des Endothels, das die Grenze zwischen Transplantat und Empfänger bildet, dar. Während licht- und transmissionselektronenoptische Berichte in der Literatur vorliegen (BUSCH et al. 1971, 1975a, b, BOHLE 1972, DEMPSTER 1973), sind unseres Wissens bisher keine eingehenden experimentellen, rasterelektronenmikroskopischen Befunde veröffentlicht worden. Das Rasterelektronenmikroskop (REM) erscheint besonders geeignet, Oberflächenveränderungen bei dieser Abstossungsreaktion in anschaulicher Weise zu demonstrieren. Im Rahmen dieser experimentellen Untersuchung soll im speziellen auf die Veränderungen im Bereiche der Nierenarterien eingegangen werden.

Material und Methoden

Die Transplantationen erfolgten zwischen streng histoinkompatiblen Inzuchtratten (PALM 1971, FELDMAN & LEE 1967, LIE et al. 1974). Als Nierentransplantat-Empfänger dienten männliche Lewis-Ratten, als Spender männliche Ratten der ersten F1-Generation zwischen Lewis und Brown-Norway (Lewis x BN)_{f1}. Nach Sensibilisierung durch drei aufeinanderfolgende Hauttransplantate wurden von 20 Lewis-Ratten Serumproben zur Bestimmung der lymphozytotoxischen Antikörper entnommen (AMOS et al. 1969). Diese Ratten erhielten anschliessend Nierentransplantate, wobei mikrochirurgische Techniken zur Anwendung kamen (FISHER & LEE 1965, LEE 1967). Je zwei Ratten wurden nach 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 30, 60 und 120 Minuten durch eine Perfusionsfixierung mit Cacodylat gepufferter, 2,5%iger Glutaraldehydlösung (pH 7,4) getötet. Eine entsprechende Serie von Isotransplantationen (Lewis auf Lewis) diente als Kontrolle. Zur weiteren Aufarbeitung wurden die Nieren entfernt, in Cacodylatpuffer (pH 7,4) gewaschen und in kleine Gewebstücke geschnitten. Diese wurden in einem Exsikkator mit Äthanol kontinuierlich dehydriert (SITTE 1962), anschliessend in mehrfach erneuertem, absolutem Äthanol belassen und mit einer eigens konstruierten Bruchapparatur unter flüssigem Stickstoff frakturiert. Weiters wurden die Präparate wieder in absolutem Äthanol aufbewahrt, mit CO₂ kritisch-Punkt-getrocknet und in einer Bahlzers-Apparatur (BAF 301) mit Gold-Palladium bedampft, wobei als Plasmagas Argon verwendet wurde. Schliesslich erfolgte die Untersuchung mit einem JEOL-100C-Elektronenmikroskop.

Ergebnisse

Vor der Transplantation wiesen die Seren der sensibilisierten Tiere bei der Bestimmung der zytotoxischen Antikörper Titer zwischen 1 : 256 und 1 : 1024 auf. Die hyperakute Nierentransplantat-Abstos-

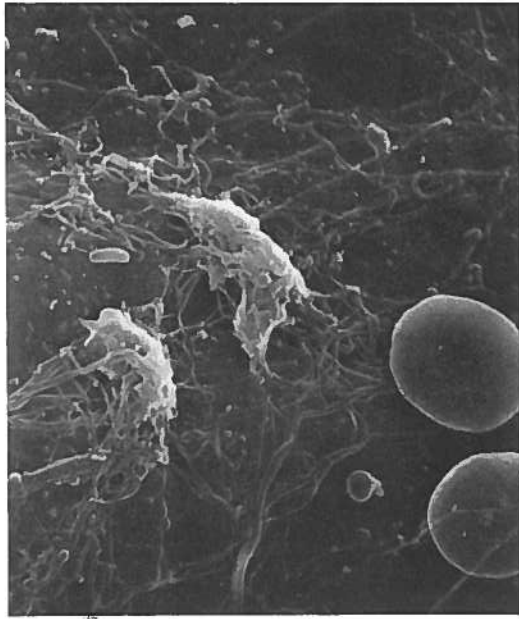


Abb. 1: 1 Minute nach Anastomosenöffnung; es finden sich zwei Thrombozyten und Fibrinfäden am Endothel angelagert, rechts zwei Erythrozyten; Originalvergrößerung 3100x.

sung zeigte sich rein makroskopisch in einer, sofort nach Anastomosenöffnung auftretenden, blau-roten Verfärbung und deutlichen Schwellung des Organs.

Rasterelektronenmikroskopie:

Bereits 1 Minute nach Anastomosenöffnung zeigte das Endothel in Teilbereichen nicht mehr die typische glatte Struktur, sondern wies abschnittsweise eine unregelmässige Oberfläche mit zahlreichen, verschieden grossen Zytoplasmafortsätzen auf. Zu diesem Zeitpunkt konnten die ersten Fibrinfäden beobachtet werden, die oft in Verbindung mit parietal angelagerten Thrombozyten standen (Abb. 1). Nach 2 Minuten war das Endothel hochgradig geschädigt, anscheinend nicht selten in einem Stadium der Desquamation (Abb. 2). Die Zahl der Thrombozyten, die zum Teil in Form von Aggregaten an der Gefässwand hafteten (Abb. 3) und der Fibrinfäden schien mehr und mehr zuzunehmen. Interessant war, dass das Verhältnis zwischen Fibrinfäden und angelagerten Thrombozyten von Ort zu Ort stark variierte. Die grösseren Arterien wiesen trotz Perfusionsfixierung meist eine deutliche Fältelung der

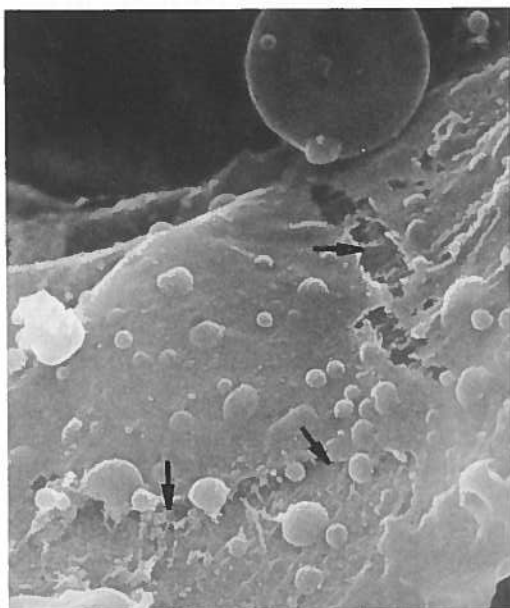


Abb. 2: Nach 2 Minuten zeigt das Endothel neben zahlreichen Zytoplasmafortsätzen Areale, in denen offensichtlich eine Desquamation stattfindet (siehe Pfeile); Originalvergrößerung 4650x.

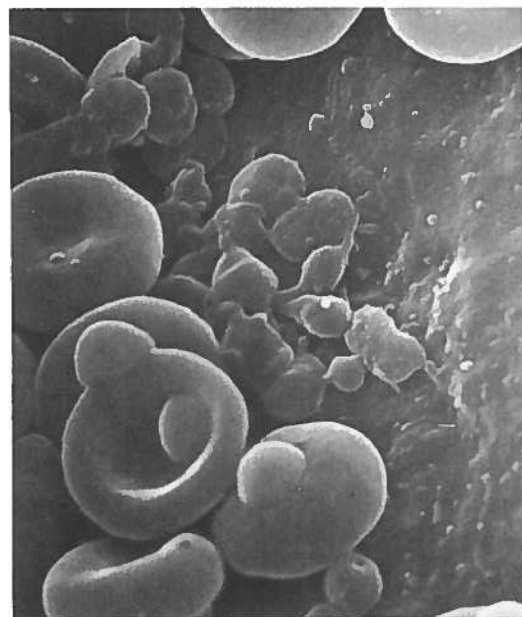


Abb. 3: Zum selben Zeitpunkt haften Thrombozyten, zum Teil in Form von Aggregaten an der Gefässwand, vereinzelt auch an parietal angelagerten Erythrozyten; Originalvergrößerung 3850x.

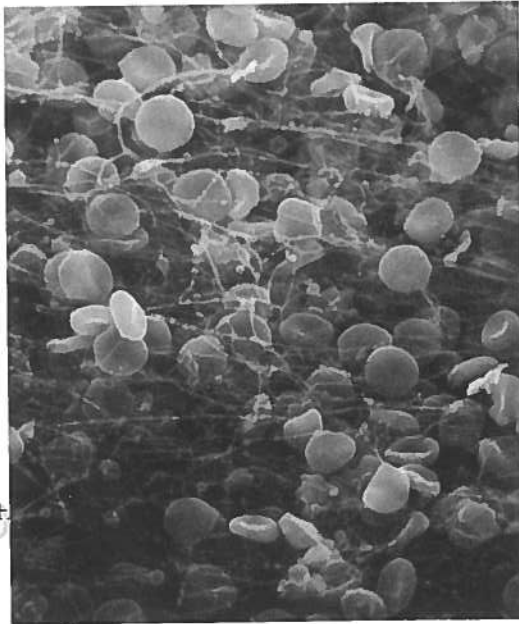


Abb. 4: 5 Minuten nach Anastomosenöffnung sind die Gefäßwände von einem dichten Fibrin-Netzwerk überzogen, in dem verschiedene zelluläre Elemente verfangen sind; Originalvergrößerung 1160 \times .

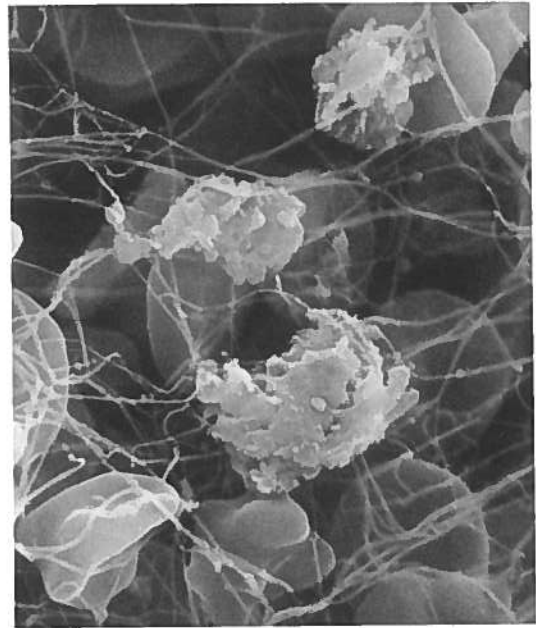


Abb. 5: 3 Thrombozytenaggregate und mehrere Erythrozyten in einem derartigen Netzwerk zum selben Zeitpunkt; Originalvergrößerung 3850 \times .

Intima auf, was als Folge einer Vasokonstriktion interpretiert werden könnte. Nach 5 Minuten waren die Gefäßwände von einem dichten Netzwerk von Fibrinfasern überzogen (Abb. 4), in dem Thrombozyten, Thrombozytenaggregate (Abb. 5), Erythrozyten, Granulozyten und Lymphozyten (Abb. 6) verfangen waren. Diese Netzwerke überspannten nicht selten das ganze Gefäßlumen. Die thrombotischen Veränderungen nahmen rasch zu und führten zu vollständigen Verschlüssen der Gefäße zwischen der 30. und 60. Minute, wobei die Thrombose von den peripheren, kleinen Arterien nach zentral fortschritt.

Die von Lewis auf Lewis-Ratten isotransplantierten Nieren zeigten sich nach Anastomosenöffnung rein makroskopisch gut durchblutet und begannen sofort mit der Harnproduktion. Mit dem REM wurden überwiegend normale Blutgefäße mit lediglich vereinzelt, geringgradigen Endothelschädigungen gefunden.

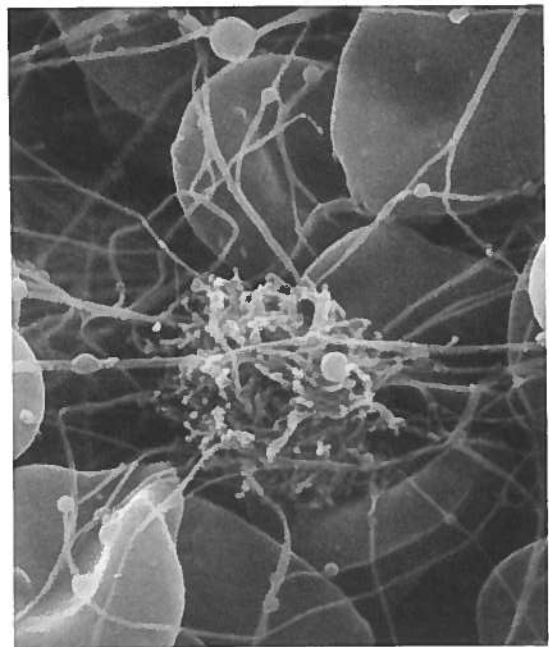


Abb. 6: Lymphozyt in einem Fibrinnetz 5 Minuten nach Anastomosenöffnung. Die Zelle weist reichlich Mikrovilli an der Oberfläche auf; Originalvergrößerung 6200 \times .

Diskussion

Bei der hyperakuten Abstossung kommt es nach Anastomosenöffnung zu einem Kontakt zwischen präformierten Antikörpern und dem Endothel des Transplantates, wobei das Komplementsystem aktiviert wird (KUX 1974). Dies führt zu einer sofortigen, massiven Endothelläsion, die eine lokalisierte, intravaskuläre Koagulation nach sich zieht (COLMAN et al. 1969, BUSCH et al. 1975b, BRENNAN et al. 1977). Vasokonstriktion, leukozytäre Infiltration und zelluläre Immunmechanismen verstärken diese für das Transplantat schädigenden Einflüsse, während die Aktivierung des Plasmin- und Kallikrein-Systems als eher schützende Faktoren aufzufassen sind (BUSCH et al. 1975b, COLMAN et al. 1976, KIRKMAN et al. 1979).

In unserer Versuchsanordnung zeigte sich bei der hyperakuten Abstossung als erster auffälliger Befund eine Endothelschädigung, die eine Thrombozyten- und Fibrinablagerung zur Folge hatte. Im Gegensatz dazu beschrieben FORBES et al. (1975) bei der hyperakuten Herztransplantatabstossung eine, den Endothelveränderungen vorangehende Bildung von Thrombozytenaggregaten. Eine diesbezügliche Erklärung könnte in der unterschiedlichen Methodik liegen. FORBES et al. wandte die Transmissionselektronenmikroskopie an. Ausserdem handelt es sich um zwei differente Organe. Die Rasterelektronenmikroskopie scheint uns allerdings gerade für das Aufzeigen von Endothelschädigungen, die letztlich Oberflächenveränderungen darstellen, eine besonders geeignete Technik zu sein. REIDY & BOWYER (1977) haben ähnliche Untersuchungen an Aortentransplantaten beim Kaninchen durchgeführt, wobei es sich um eine chronische Abstossungsreaktion handelte.

Im Experiment lässt sich die hyperakute Transplantatabstossung nur in geringem Masse medikamentös beeinflussen. Es wurden vor allem Heparin und Thrombozytenaggregationshemmer, aber auch andere Substanzen, wie Zytosinarabinosid, Methylprednisolon, Azathioprin und Phenoxybenzamin angewendet (SHARMA et al. 1972, BUSCH et al. 1975b, 1976, COLMAN et al. 1976). Die relativ besten Ergebnisse konnten mit antikomplementär wirkenden Stoffen wie Kobragift-Faktor und Na-Zitrat erzielt werden (GEWURZ et al. 1966, KUX 1974, WHITTUM & LINDQUIST 1977). Zu

brauchbaren, am Patienten anwendbaren therapeutischen Richtlinien ist man allerdings bis heute nicht gekommen. Auf der Suche nach neuen Behandlungsmöglichkeiten könnte das REM bei der Auswertung derartiger Experimente gute Dienste leisten.

Zusammenfassung

Nach einer Präsensibilisierung durch drei aufeinanderfolgende Hauttransplantate wurden Nieren von (Lewis x BN)_{f₁}-Ratten auf Lewis-Ratten transplantiert, zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen der 1. und 120. Minute nach Anastomosenöffnung perfusionsfixiert und mit dem REM untersucht. Eine Serie von Isotransplantaten diente als Kontrolle. Bei der hyperakuten Abstossung kommt es schon nach 1 Minute zu Endothelschädigungen, die Fibrin- und Thrombozytenablagerungen nach sich ziehen. Nach 5 Minuten lassen sich parietale Netzwerke aus Fibrinfäden nachweisen, in dem verschiedene zelluläre Elemente haften. Die thrombotischen Veränderungen resultieren letztlich in vollständigen Gefässverschlüssen zwischen der 30. und 60. Minute. Offenbar kommt es bei der hyperakuten Transplantatabstossung zu einer plötzlich einsetzenden, immunologischen Endothelschädigung, die eine lokale intravaskuläre Koagulation zur Folge hat.

Summary

After praesensitization by three consecutive skin grafts kidneys of (Lewis x BN)_{f₁}-rats were transplanted to Lewis rats, fixed by perfusion at certain intervals between the 1st and 120th minute after opening the vascular anastomoses and examined using REM. A series of isotransplants served as controls. In hyperacute rejection endothelial lesions occur just after 1 minute, which were followed by depositions of fibrin and platelets. After 5 minutes parietal networks of fibrin fibres can be demonstrated, in which different cellular elements are adhering. The thrombotic alterations finally result in complete vascular occlusions between the 30th and 60th minute. Obviously a sudden immunological endothelial lesion occurs in hyperacute transplant rejection, which results in a localized intravascular coagulation.

Bibliographie

- AMOS, D. B., BASHIR, A., BOYLE, W., MAC QUEEN, M., TULLIKAINEN, A.: A simple microtoxicity test. *Transplantation* 7, 220, 1969. - BOHLE, A.: Die Pathomorphologie der transplantierten Niere. *Klin. Wschr.* 50, 636, 1972. - BRENNAN, T. G., GILES, G. R., RAJAH, S. M., DAVIDSON, A. M., GUILLOU, P. J.: Coagulation changes in sensitized canine renal allografts. *Brit. J. of Surgery* 64, 15, 1977. - BUSCH, G. J., REYNOLDS, E. S., GALVANEK, E. G., BRAUN, W. E., DAMMIN, G. J.: Human renal allografts. The role of vascular injury in early graft failure. *Medicine* 50, 29, 1971. - BUSCH, G. J., MARTINS, A. C. P., HOLLENBERG, N. K., WILSON, R. E., COLMAN, R. W.: A primate model of hyperacute renal allograft rejection. *Am.*

J. Pathol. 79, 31, 1975. - BUSCH, G. J., KOBAYASHI, K., HOLLENBERG, N. K., BIRTCH, A. G., COLMAN, R. W.: Hyperacute renal allograft rejection in the primate: Intrarenal effects of heparin and associated net release of factor VIII activity and kallikrein activation. Am. J. Pathol. 80, 1, 1975. - BUSCH, G. J., MARTINS, A. C. P., HOLLENBERG, N. K., MORETZ, R. C., WILSON, R. E., COLMAN, R. W.: Successful short-term modification of hyperacute renal allograft rejection in the primate. Am. J. Pathol. 82, 43, 1976. - COLMAN, R. W., BRAUN, W. E., BUSCH, G. J., DAMMIN, G. J., MERRILL, J. P.: Coagulation studies in the hyperacute and other forms of renal-allograft rejection. N. Engl. J. Med. 281, 685, 1969. - COLMAN, R. W., HABAL, M., HOLLENBERG, N. K., BIRTCH, A. G., BUSCH, G. J.: Hyperacute renal allograft rejection in the primate. Therapeutic limitations of antiplatelet agents alone and combined with heparin. Am. J. Pathol. 82, 25, 1976. - DEMPSTER, W. J.: Nature of hyperacute rejection. Brit. Med. J. 1, 740, 1973. - FELDMAN, J. D., LEE, S.: Renal homotransplantation in rats. I. Allogeneic recipients. J. Exp. Med. 126, 783, 1967. - FISHER, H. B., LEE, S.: Microvascular surgical techniques in research, with special reference to renal transplantation in the rat. Surgery 58, 904, 1965. - FORBES, R. D. C., KURAMOCHI, T., GUTTMANN, R. D., KLASSEN, J., KNAACK, J.: A controlled sequential morphologic study of hyperacute cardiac allograft rejection in the rat. Lab. Invest. 33, 280, 1975. - GEWURZ, H., CLARK, D. S., FINSTAD, J., KELLY, W. D., VARCO, R. L., GOOD, R. A., GABRIELSEN, A. E.: Role of the complement system in graft rejection in experimental animals and man. Am. NY Acad. Sci. 129, 673, 1966. - KIRKMAN, R. L., FLYE, M. W., WILLIAMS, G. M., COLVIN, R. B., SACKS, D. H.: Evidence for cellular immune mechanisms in hyperacute rejection of renal

allografts in miniature swine. Transplant Proc. 11, 790, 1979. - KUX, M.: Die Bedeutung des Komplementsystems für die experimentelle und klinische Nierentransplantation. W. Klin. Wschr. 86, 29, 1974. - LEE, S.: An improved technique of renal transplantation in the rat. Surgery 61, 771, 1967. - LIE, T. S., EBATA, H., FUETING, F., NAKANO, H., KIM, Y. Z.: Die humorale Immunantwort bei der Haupt- und Nierenallotransplantation in histoinkompatiblen Inzuchttratten. Langenbecks Arch. Chir. 336, 257, 1974. - PALM, J.: Immunogenetic analysis of AG-B histocompatibility antigens in rats. Transplantation 11, 175, 1971. - REIDY, M. A., BOWYER, D. E.: Scanning-electron microscope studies of the endothelium of aortic allografts in the rabbit: effect of azathioprine, prednisolone and promethazine on early cellular invasion. J. Path. 124, 1, 1978. - SHARMA, H. M., MOORE, S., MERRICK, H. W., SMITH, M. R.: Platelets in early hyperacute allograft rejection in kidneys and their modification by sulfapyrazone (anturan) therapy. Am. J. Pathol. 66, 445, 1972. - SITTE, P.: Ein Verfahren zur stufenlosen Gewebeerwässerung für die elektronenmikroskopische Präparation. Naturwissenschaften 49, 402, 1962. - WHITTUM, J. A., LINDQUIST, R. R.: Mechanismus of cardiac allograft rejection in the inbred rat. The effect of complement depletion by cobra venom factor on hyperacute cardiac allograft rejection. Transplantation 24, 226, 1977. - WILLIAMS, G. M., LEE, H. M., WEYMOUTH, R. F., HARLAN, W. R., HOLDEN, K. R., STANLEY, C. M., MILLINGTON, G. A., HUME, D. M.: Studies in hyperacute and chronic renal homograft rejection in man. Surgery 62, 204, 1967. - WILLIAMS, G. M., HUME, P. M., HUDSON, R. P. JR., MORRIS, P. J., KANO, K., MILGROM, F.: Hyperacute renal-homograft rejection in man. N. Engl. J. Med. 279, 611, 1968.

Dr. med. Ch. Leithner, II. Medizinische Universitätsklinik, Garnisongasse 13, A-1090 Wien

Ultrastrukturelle Veränderungen bei der Atrophie blanche*

H. J. LEU, A. WENNER, M. A. SPYCHER und U. BRUNNER

Die Atrophie blanche (weisse Atrophie, white atrophy) stellt eine häufige Teilerscheinung im Rahmen der fortgeschrittenen chronisch-venösen Insuffizienz dar. Klinisch äussert sie sich durch kleinere und grössere Felder von leicht eingesunkener, derber, weisslich-glänzender Haut, die von rötlichen stippchenartigen Blutgefässen durchsetzt werden. Diese Hautbezirke liegen besonders im Bereiche der medialen Gamaschenregion vor allem in Zonen mit Ödem und anderen trophischen Hautveränderungen wie Hyperpigmentationen, Para- und Hyperkeratose und Ulkusnarben. Sie neigen zur Ulzeration und bilden dann kleine bis ausgedehnte, oberflächliche, sehr schlecht heilende und ausgesprochen schmerzhaft Hautgeschwüre.

Die ultrastrukturelle Morphologie dieser Bezirke ist wenig erforscht. Kapillarmikroskopisch sind sie durch sogenannte avaskuläre Felder mit vereinzelt erweiterten bis riesenhaften Kapillaren mit ödematösem Gefässhalo charakterisiert (BOLLINGER [1]).

Im Rahmen einer Untersuchungsstudie über die Ultrastruktur der chronisch-venösen Insuffizienz (WENNER et al. [4]) haben wir bei 6 Fällen Biopsien aus Regionen mit Atrophie blanche elektronenoptisch untersucht und folgende Befunde erheben können.

Material und Methode

Genauere Angaben über die technischen Details unserer elektro-

* Unterstützt von den Schweiz. Ges. für Angiologie und für Phlebologie.

nenoptischen Präparationsmethode sind an anderer Stelle publiziert worden (WENNER et al. [4]).

Das Biopsiematerial wurde im Rahmen von ohnehin notwendigen gefässchirurgischen Eingriffen am Venensystem in Allgemeinnarkose an typischen Stellen entnommen und unmittelbar in 3 verschiedenen Fixierlösungen eingelegt (Glutaraldehyd-Cacodylat, Osmiumtetroxyd-Cacodylat und Osmiumtetroxyd-Collidin-Sucrose).

Die weitere Behandlung erfolgte nach dem Routineverfahren an unserem Institut. Die Doppelkontrastierung wurde mit Uranylacetat und Bleicitrat durchgeführt. Die Einbettung erfolgte in Epon 812. Die Schnitte wurden mit einem LKB Ultra-

Tab.: Ultrastrukturelle Veränderungen an Kapillaren, Postkapillaren und kleinen Venulen der Haut und Subkutis bei der chronisch-venösen Insuffizienz.

Gefässe: Häufige Dilatation (Kapillaren, Postkapillaren, Venulen) bis zu einem DM von 100 µm (Norm 7–25 µm)

Perivaskulärer Raum: Ödematöse Auflockerung
Extravasale Erythrozyten einzeln oder in Gruppen

Endothelzellen: in dilatierten Gefässen abgeflacht, an nicht-dilatierten Kapillaren z. T. hoch-zerklüftet.

Gelegentlich intrazelluläres Ödem

Gelegentlich Invaginationen, Fenestrae, Vakuolen und Makrovesikel.

Reichlich: Mikropinozytosevesikel, besonders apikal und entlang der Interzellularfugen, oft in Ketten aneinandergereiht.

Weibel-Palade-Körperchen, oft in Kontakt mit dem lumenseitigen Plasmalemm

Rauhes endoplasmatisches Retikulum

Multivesikuläre Körperchen

Interzellular-Fugen: häufig bis auf 180 nm erweitert, oft Passage von deformierten Erythrozyten durch erweiterte IZF

Basalmembran: nicht wesentlich verbreitert, bei Endothellücken gelegentlich in Kontakt mit dem Lumeninhalt

Thrombozyten: trotz häufiger Endothellücken nur vereinzelt Aggregationen an der Kapillarwand