

Eine Methode zur gleichzeitigen Analyse der zellulären und humoralen Komponente der Entzündung

Von

O. BÍLEK, J. ROVENSKÝ, P. JANSA und R. POSPÍŠIL

Forschungsinstitut für Pädiatrie, Brno, Tschechoslowakei

(Eingegangen am 7. Oktober, 1966)

Als einfachste Methode zur Verfolgung des Zeitablaufes der Zellemigration in ein Entzündungsfeld wird die Hautfenstermethode von REBUCK und CROWLEY [3] angesehen. In den letzten Jahren wurde sie von einer Anzahl von Autoren zur Klärung einiger Probleme der entzündlichen Zellmigration benützt. Die Methode ist einfach: mit Hilfe eines sterilen Skalpels oder einer Rasierklinge wird auf einer geeigneten Hautstelle, die vorher mit Äther gereinigt wurde, eine Ablation der oberflächlichen Schichten der Epidermis durchgeführt. Auf diese Läsion von einigen mm² wird ein Deckglas angelegt. In beliebigen Zeitabständen kann ein Deckglasaustausch erfolgen. Dieser Vorgang ermöglicht dann, den Zeitablauf der zellulären Emigration abzulesen.

Es konnte gezeigt werden, daß die Emigration in zwei Phasen, die wir je nach der überwiegenden Zellart Dominanten bezeichnen wollen, verläuft. Der Beginn wird von einer Neutrophilendominante gekennzeichnet, die 4 Stunden dauert. Diese wird nach 8—12 Stunden von einer anderen Dominante abgelöst: das Feld be-

herrschen mononukleäre Zellen. REBUCK und CROWLEY [3] halten sie für Lymphozyten, die hypertrophierten und sich in Makrophagen umgewandelt haben. Alle andere Autoren sind in dieser Hinsicht mehr zurückhaltend. Diese Dominante kann bis über 24 Stunden anhalten oder von einem zweiten Neutrophilenschub abgelöst werden.

Wir wollten die erwähnte Methode zum Studium der Reparationsvorgänge — die wir als Manifestation biologischer Rhythmen ansehen — benützen und die Verknüpfung einiger Regulationskreise analysieren. Es zeigte sich aber, daß die Originalmethode für diese Zwecke einige Nachteile hat. Auch bei sorgfältig durchgeführter Abrasionstechnik ist die Tiefe der Läsion verschieden. Wir suchten also eine Modifikation auszuarbeiten, welche die anatomische Läsion so weit wie möglich standardisiert.

Hinzu treten noch physiologische Aspekte, welche unserer Meinung nach nicht übersehen werden sollten und zwar, daß die Haut selbst als Träger des Entzündungsfeldes den

Vorgang auch aktiv modifizieren kann, und nicht nur ein passives Terrain darstellt, dessen Anteil an der Zellulation und Heilung unbedeutend ist. Eine Analyse des humoralen Exsudates erlaubt die Methode überhaupt nicht. Aus diesen Gründen mußten wir eine — wenn auch mikroskopische — Kapillarschädigung vermeiden. Auf eine Eröffnung der Kapillarschlingen bei der Originaltechnik weisen die Lymphozyten und Erythrozyten hin, die bestimmt durch einen passiven Vorgang, eine passive Ausschwemmung im Präparat erscheinen.

METHODE

Zur Ablation des Stratum corneum benützen wir den Vorgang, den SZAKALL [6] in die Dermatologie eingeführt hat. Ein $1,5 \times 3,5$ cm großer Heftpflasterstreifen wird auf die gewählte Hautstelle angeklebt und heruntergerissen. Dieser Vorgang wird auf derselben Stelle 15–17mal wiederholt. Dadurch wird die oberflächliche Hautschicht bis auf die Zona lucida entfernt. Die Freilegung dieser Hautschicht kann daran erkannt werden, daß die Stelle feucht glänzt und das Pflaster nicht mehr haften bleibt. Auf das derartig hergestellte Entzündungsfeld werden 0,02 ml Chloroform p. a. aufgetragen und ein Deckglas aufgelegt und fixiert. Der Glasaustausch erfolgt nach 4, 8, 12 und 24 Stunden.

Das Entzündungsfeld wurde auf der volaren Seite des Vorderarms und ein Kontrollfeld an der entsprechenden Stelle des anderen Vorderarms mit der klassischen Methode hervorgerufen. Nach pannotischer Pappenheim-Färbung wurden in jedem Abdruckpräparat ungefähr 1000 Zellen durchgemustert.

Exsudat wurde durch wiederholtes Abspülen des Entzündungsfeldes mit 1 ml

Kochsalzlösung gewonnen. Nach einigen Wiederholungen wurde die Flüssigkeit leicht opaleszent. Das Material wurde papierelektrophoretisch untersucht.

ERGEBNISSE

Die Untersuchungen wurden an 80 gesunden Kindern durchgeführt.

Die klassische REBUCK und CROWLEYSche Methode brachte Ergebnisse, die im vollem Einklang mit jenen in der Literatur stehen. Die von uns angegebene Modifikation führte zu folgenden Resultaten: Innerhalb der ersten 4 Stunden ist das Präparat fast ausschließlich aus Neutrophilen zusammengesetzt, Monozyten kommen höchstens in 5–6% vor. Eosinophile Granulozyten wie auch Lymphozyten erschienen zu diesem Zeitpunkt nur ausnahmsweise. Praktisch völlig fehlten die Erythrozyten. Nach 8 und 12 Stunden waren die Präparate sehr reich an Monozyten. Stellenweise fanden wir aus einigen hundert Zellen zusammengesetzte Monozytenteppeiche (Abb. 1) so daß die neutrophilen Granulozyten in Minderheit erschienen. Diese Monozytenteppeiche gingen in den Randzonen in ein gemischtes Zellfeld (Monozyten und neutrophile Granulozyten) über. Nach 24 Stunden konnten wir in der Mehrzahl der Fälle einen zweiten Anstieg der Neutrophilen beobachten. Nur selten dauerte die monozytäre Dominante 24 Stunden. Ein seltener Befund war eine monozytäre Dominante in den ersten Stunden, und eine nachfolgende neutrophile Dominante im späteren Ablauf. Dieser Befund wäre sozu-

sagen als eine Inversion des Zeitablaufes der reparativen Zellemigration anzusehen. Dieses Bild fanden wir in weniger als 10% der Fälle (Abb. 2).

len die Tiefe der Hautläsion praktisch die gleiche war. Wir entfernten nur die verhornten Schichten der Epidermis und überschritten in keinem Fall

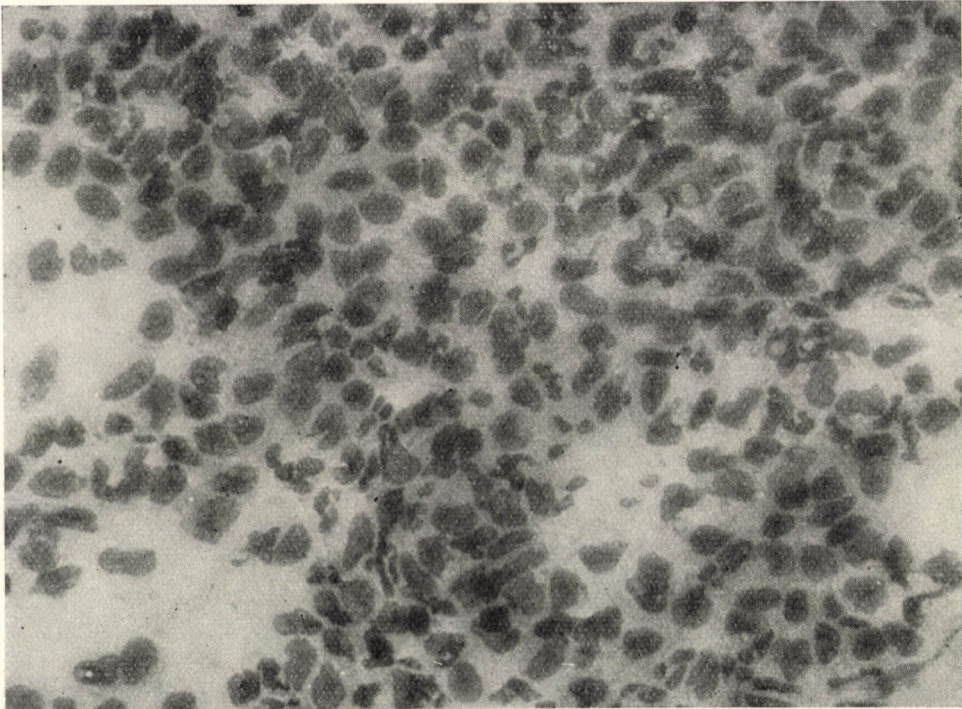


ABB. 1. Monozytenteppich während der Monozytendominante

Die elektrophoretische Untersuchung des Exsudats zeigte dessen große Ähnlichkeit mit den Serumweißkörpern. Abb. 3 demonstriert das Eiweißbild eines Exsudats, welches im Laufe der ersten 4 Stunden gesammelt wurde.

BESPRECHUNG

Wiederholte histologische Kontrollen zeigten, daß in den einzelnen Fäl-

die Zona lucida. Im Vergleich mit der Methode von REBUCK und CROWLEY waren unsere Präparate in den ersten Stunden zellärmer. Dagegen erbrachte die klassische Technik nur zwei Zellarten: Neutrophilen und Monozyten. Bei unserer Technik blieben die Kapillarschlingen der Hautpapillen intakt und waren von 2—3 Zellschichten bedeckt. Das war der Grund für die anfangs weniger reichliche und verzögerte Emigration der Zellen. Es

ist auch kaum zu bezweifeln, daß die Emigration als aktiver Vorgang der Zellen anzusehen ist.

biologischer Antigene nicht benützen, weil man dann eine anamnestiche Immunreaktion nie mit Sicherheit

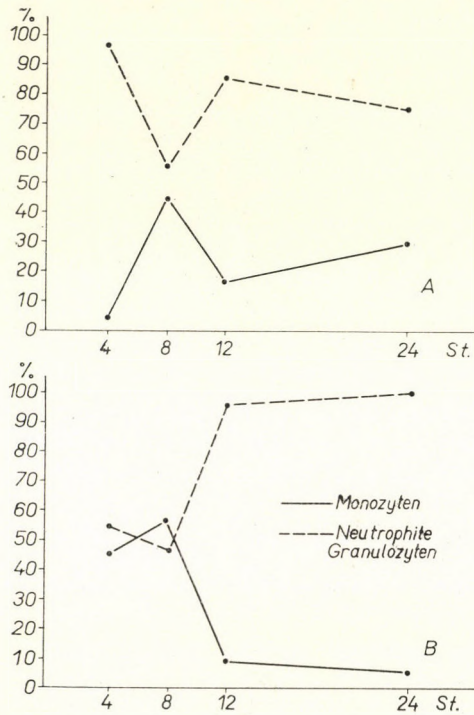


ABB. 2. Typischer Verlauf der Emigration (A) und Inversion in 10% der Fälle (B)

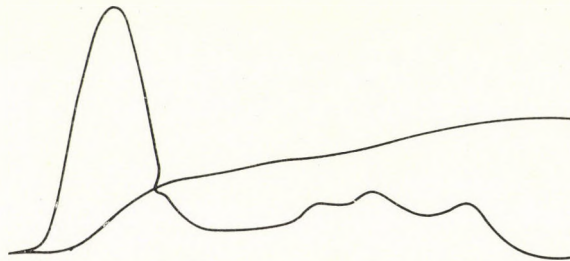


ABB. 3. (Erklärung im Text)

Zur Erhöhung der Emigration benützten REBUCK und CROWLEY [3] Antigenreize (Diphtherie-Toxoid, Alt tuberkulin usw.); diese Stoffe wurden auf die Wunde aufgetragen. Wir wollten diese leukotaktische Wirkung

ausschließen kann. Da es aber nötig ist, durch einen Reiz die Emigration zu erhöhen, benutzten wir Chloroform aus folgenden Bedenken: Der lokale, im Gewebe entstehende leukotaktische Reiz wird von einer Anzahl

verschiedener Mediatoren vermittelt. Die blockierenden Mechanismen werden durch Chloroform aufgehoben. Wir haben uns in Vorversuchen überzeugen können, daß das Chloroform als Akzelerationszeit wirkt, denn die Aktivierung erfolgt dann schneller, als der natürliche Verlauf im beschädigten Gewebe, angefangen von Dysionie und Dysosmie bis zu biologisch hochaktiven Substanzen wie z. B. Plasmin, HAGEMANScher Faktor, Bradykinin usw. Die Folge ist dann eine früher beginnende und quantitativ größere Zellemigration.

Ein Unterschied von der Originalmethode ist allerdings zu verzeichnen. In den späteren Phasen der Entzündung ist in den meisten Fällen, doch nicht gesetzmäßig, ein zweiter Neutrophilenschub zu beobachten, wie das von allen Autoren festgestellt wurde. Eine kausale Erklärung können wir zur Zeit nicht geben. Eine sekundäre Infektion ist nicht auszuschließen. Die größere Fläche des Feldes ist eine günstige Voraussetzung für diesen Vorgang.

Es bietet sich noch eine andere hypothetische Erklärung. Bekanntlich kommt es in jedem beschädigten Gewebe zum Ausfall des Fibrins, als Voraussetzung der Reparatur. Bei unserer Methode konnten wir bei der histologischen Untersuchung der Hautläsion am dritten Tag eine parakrateröse, aus Fibrin gebildete Schicht nachweisen. Da, wie RIDDLE und BARNHART bewiesen haben [4], die Neutrophilen ein fibrinolytisches Enzym enthalten, kann es angenommen werden, daß ein massiver Neutro-

philenschub in den späteren Phasen, wenn schon eine Fibrinschicht ausgebildet ist, eine notwendige Bedingung für die definitive Epithelisation ist. Da wir diese Hypothese zur Zeit nicht beweisen können, beenden wir unsere Beobachtungen nach 24 Stunden.

Da REBUCK und CROWLEY, die Entdecker der Hautfenstermethode, die mononukleären Zellen in den späteren Entzündungsstadien für transformierte Lymphozyten halten und wir für diese Zellen ausschließlich die Benennung Monozyten im Sinne von UNDRITZ [7, 8] benützen, möchten wir noch darauf hinweisen, daß die mononukleären Zellen in unseren Präparaten allen morphologischen Kriterien der Monozyten entsprechen. Ohne morphologische Dogmen anwenden zu wollen, stützten wir uns auf unsere Zellbilder, wo wir massive Monozytenteppiche, doch praktisch keine Lymphozyten sahen, von Übergangsformen gar nicht zu reden. Diese Ansicht wird auch durch die von LEDER und SCHOMERUS [2] durchgeführte Analyse des nukleolären Apparats bestärkt.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine neue Modifikation der Hautfenstermethode beschrieben. Die Vorteile im Vergleich zur klassischen Methode sind:

1. Die Läsion ist maximal standardisiert.
2. Bei dem angegebenen Vorgang ist die Zellemigration ein ausschließlich aktiver Prozeß.

3. Es wird kein Antigen zur Emigrationserhöhung benutzt. Komponente kann bei der Reparation gleichzeitig analysiert werden.
4. Die zelluläre und die humorale

LITERATUR

1. CHRISTENSEN, L. R.: Activation of plasminogen by chloroform. *J. gen. Phys.* **30**, 149 (1946).
2. LEDER, L. D., SCHOMERUS, H.: Nucleolenuntersuchungen zur Genese der Makrophagen an Hautfensterpräparaten. *Klin. Wschr.* **41**, 87 (1963).
3. REBUCK, J. W., CROWLEY, J. H.: A method of studying leucocytic functions in vivo. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **59**, 757 (1955).
4. RIDDLE, J. M., BARNHART, M. I.: Ultrastructural study of fibrin dissolution via emigrated polymorpho-
5. nuclear neutrophils. *Amer. J. Path.* **45**, 805 (1964).
6. RIIS, P.: The cytology of inflammatory exudate, Munksgaard, Copenhagen 1959.
7. SZAKÁLL: zit. SPRUIT, D., MALTEN, K. E.: Epidermal water-barrier formation after stripping of normal skin. *J. invest. Dermat.* **45**, 6 (1965).
8. UNDRITZ, E.: Hämatologische Tafeln. Sandoz A. G., Basel 1952.
9. UNDRITZ, E.: Die regionären Monocyten der Blutkörperchennester. *Folia haemat. (Frankfurt)* **70**, 32 (1950).

MUDR. O. BÍLEK
 Černopolni 9
 Brno, Tschechoslowakei