

Aus der Anatomischen Anstalt
der Ludwig-Maximilians-Universität München, Lehrstuhl II
Vorstand: Prof. Dr. med. Ch. Schmitz



**Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen der
Milz vom Erwachsenen und Kleinkind unter besonderer
Berücksichtigung kontraktile Zellen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hiang-Hwa Teng
aus München

München 2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ulrich Welsch

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Karl-Hans Englmeier
Priv. Doz. Dr. Martin Storr

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 19.10.2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden.....	8
2.1	Material.....	8
2.2	Einbettung der Proben für die Lichtmikroskopie	8
2.2.1	Präparation und Fixation der Gewebe für Paraplastschnitte	8
2.2.2	Anfertigen der Paraplastschnitte.....	9
2.2.3	Entparaffinierung der Schnitte	9
2.2.4	Eindecken der Schnitte	9
2.3	Konventionelle histologische Färbungen	10
2.3.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (Romeis 1989)	10
2.3.2	Azanfärbung nach Heidenhain (Romeis 1989).....	10
2.3.3	Silberimprägnation nach Gomori (Romeis 1989)	11
2.3.4	Aldehydfuchsin-Färbung (Romeis 1989)	12
2.4	Immunhistochemische Nachweise	13
2.4.1	Prinzip der Avidin-Biotin-Komplex-Methode	13
2.4.2	Primärantikörper	14
2.5	Transmissionselektronenmikroskopie.....	15
2.5.1	Materialvorbereitung	15
2.5.2	Objekträger für Semidünnschnitte	15
2.5.3	Anfertigen der Semidünnschnitte.....	15
2.5.4	Objekträger für Ultradünnschnitte	15
2.5.5	Anfertigen der Ultradünnschnitte	16
2.5.6	Fotodokumentation der Ergebnisse.....	16
3	Ergebnisse	18
3.1	Befunde der histologischen Färbemethoden	18
3.1.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung)	18
3.1.1.1	Übersicht	18
3.1.1.2	Lymphfollikel	20
3.1.1.3	Periarterielle Lymphozytenscheide (PALS)	22
3.1.2	Azanfärbung nach Heidenhain	24
3.1.2.1	Übersicht	24
3.1.2.2	Blutgefäße	26
3.1.2.3	Trabekel und Trabekelarterie	26
3.1.2.4	Zentralarterie	30
3.1.2.5	Pinselarteriolen	32
3.1.2.6	Hülsenkapillaren.....	34
3.1.2.7	Trabekel- und Pulpavene.....	36
3.1.2.8	Milzsinus	38
3.1.3	Befunde des Silberimprägnationsverfahrens nach Gomori	39
3.1.3.1	Übersicht	39
3.1.3.2	Kapsel und Trabekel	40
3.1.3.3	Rote Pulpa	44
3.1.3.4	Trabekelarterie	46
3.1.3.5	Hülsenkapillaren.....	48
3.2	Befunde der histochemischen Reaktion mit Aldehydfuchsin	50
3.2.1	Kapsel und Trabekel	50

3.2.2	Trabekelarterie	52
3.2.3	Zentralarterie, Zentralarteriole.....	54
3.2.4	Pulpavene	55
3.3	Befunde der immunhistochemischen Nachweise	56
3.3.1	Kollagen Typ I	56
3.3.2	Kollagen Typ III	58
3.3.2.1	Kapsel und Trabekel	58
3.3.2.2	PALS	60
3.3.3	Aktin	61
3.3.3.1	Übersicht	61
3.3.3.2	Kapsel und Trabekel	64
3.3.3.3	Follikel	66
3.3.3.4	PALS	68
3.3.3.5	Rote Pulpa.....	70
3.3.4	Alpha-Tubulin, Sinus, Makrophagen	71
3.3.5	Myosin II	72
3.3.6	Vimentin, Sinus	74
3.3.7	Connexin 43, Sinus	76
3.3.8	CD 3, PALS.....	78
3.3.9	CD 8, PALS.....	79
3.3.10	CD 20, Follikel.....	80
3.3.11	CD 68 82	
3.3.11.1	Rote Pulpa.....	82
3.3.11.2	Follikel	84
3.3.12	CD 74 85	
3.3.12.1	Follikel	85
3.3.12.2	PALS	86
3.3.13	Neurofilamentprotein (NFPC), Nerv/Trabekel.....	87
3.3.14	Beta-Tubulin, Nerv/Trabekel	88
3.3.15	S100, Nerv/PALS	89
3.4	Befunde der Transmissionselektronenmikroskopie	90
3.4.1	Kapsel und Trabekel	90
3.4.2	Sinus	96
3.4.3	Pulpavene	100
4	Diskussion	106
4.1	Kapsel und Trabekel.....	107
4.1.1	Myofibroblasten, glatte Muskelzellen	107
4.1.2	Kollagenfasern	110
4.1.3	Elastische Fasern.....	111
4.2	Weißer Pulpa	111
4.2.1	Follikel	111
4.2.2	Periarterielle Lymphozytenscheide (PALS)	113
4.3	Rote Pulpa/ Pulpastränge	114
4.4	Blutgefäße	115
4.4.1	Arterien: Trabekel-, Zentralarterien, Pinselarteriolen	115
4.4.2	Hülsenkapillaren.....	116
4.4.3	Pulpa- und Trabekelvenen	116
4.4.4	Milzsinus.....	117
4.5	Nerven	118

4.6 Ausblick	119
5 Zusammenfassung	122
6.1 Literaturverzeichnis	125
6.2 Abbildungsverzeichnis	132
6.3 Tabellenverzeichnis	135
6.4 Abkürzungsverzeichnis	136
6.4.1 Histologische, histochemische und immunhistochemische Befunde	136
6.4.2 Transmissionselektronenmikroskopische Befunde	137
7 Danksagung	138

1 Einleitung

Die Milz ist das größte einzelne lymphatische Organ des Menschen (Pabst und Westermann 1993) und ist ein Organ, dessen Mikroanatomie und Funktion uns immer noch einige Rätsel aufgibt (Steiniger und Barth 2000). Dennoch sind die Grundzüge der Struktur der Milz bei Mensch und Ratte (als Modelltier) in den letzten zwei Jahrzehnten aufgeklärt worden. Dies beruht seinerseits auf zahlreichen detaillierten lichtmikroskopischen Untersuchungen im späten 19. und im 20. Jahrhundert z.B. (Schweigger-Seidel 1863; Weidenreich 1901; Jäger 1929; von Herrath 1958). Dass es immer noch Fragen über die funktionellen Abläufe in der Milz, auch der des Menschen, gibt, liegt zum Teil daran, dass einige Autoren einfach unkritisch histologische Befunde bei unterschiedlichen Tierstudien auf die Verhältnisse des Menschen übertragen haben, obwohl die tatsächliche Mikroanatomie der Humanmilz von der vieler Mammalia abweicht (van Krieken und te Velde 1988). Außerdem macht die Milz Altersveränderungen durch und zeigt auch interindividuelle Unterschiede (Steiniger und Barth 2000, eigene Beobachtungen). Ein weiteres Problem ist, dass unzulässig von Einzelschnitten auf das ganze Organ interpoliert wurde. Daher existiert in der gegenwärtigen Literatur über die Milz eine ganze Anzahl von verschiedenen Modellen, welche die humane Mikroanatomie der Milz beschreiben. Sogar in Lehrbüchern der Histologie existieren unterschiedliche Darstellungen des mikroskopischen Aufbaus der Milz. Das Gleiche gilt für die Primärliteratur (Steiniger und Barth 2000).

Sucht man histologische Abbildungen über den Mikroaufbau der Milz in einschlägiger Literatur, wird man vor allem bei histologischen Abbildungen von Säugetieren fündig werden (Ratte, Kaninchen, Katze, Hund, Schwein, Pferd, Affe u.a.) z.B. (von Herrath 1958). Die histologischen Bilder der Humanmilzen sind merklich in der Minderzahl.

Einige Studien über die Milz des Menschen aus jüngerer Zeit befassen sich vorrangig mit der Rekonstruktion morphologischer Strukturen in der Humanmilz (Steiniger, Rüttinger et al. 2003; Steiniger, Stachniss et al. 2007) oder setzen sich mit dem Vorhandensein und Verteilung bestimmter immunologischer Zellen im Milzparenchym im Vergleich zu anderen Spezies auseinander (Steiniger, Timphus et al. 2006). Im Folgenden wird eine Übersicht der mikroskopischen Anatomie der Milz des Menschen nach gegenwärtigem Kenntnisstand gegeben.

Die Milz des Menschen wird von einer kräftigen Bindegewebskapsel umgeben, von der aus sich verzweigende Trabekel (Milztrabekel, Balken) in das Organinnere ziehen und hier ein stützendes Gerüst aufbauen (Welsch 2010). Die Trabekel sind Bindegewebsstränge, durch die die Milz unvollständig in Kammern unterteilt wird (von Herrath 1958; Pabst 2004). Diese Trabekel bilden keine vollständigen Scheidewände, sondern sind rundliche oder abgeflachte und vernetzte stabförmige Gebilde. Sie dienen den großen Blutgefäßen als Lager (Lüllmann-Rauch 2009).

Betrachtet man die einzelnen Kapselschichten von außen nach innen, so liegt zu äußerst der Peritonealüberzug. Er ist beim Menschen unlösbar mit der Kapsel verbunden. Das Peritonealepithel besteht beim Menschen aus platten bis kubischen Zellen, deren Form wechselt und bei der nicht gedehnten Kapsel meistens kubisch ist (Hofmann 1949).

Im feineren geweblichen Aufbau wird die Milzkapsel im Allgemeinen beschrieben als ein derbfaseriges kollagenes Gewebe, welches besonders in den inneren Schichten reichlich von elastischen Fasern durchflochten wird, während in der äußeren Schicht der kollagene Anteil überwiegt (Hofmann 1949). Zwischen den Bindegewebszügen der Kapsel befinden sich Myofibroblasten und glatte Muskelzellen, die histologisch oft nicht klar voneinander zu unterscheiden sind. Die Trabekel enthalten ebenfalls spärlich glatte Muskulatur und reichlich Myofibroblasten. Das Grundgerüst der Milzpulpa besteht aus retikulärem Bindegewebe, weshalb die Milz wie die Lymphknoten zu den lymphoretikulären Organen zählt (Pabst und Westermann 1993).

Die Milzpulpa des Menschen gliedert sich in die weiße und rote Pulpa. Sie sind jeweils in den oben genannten Milzkammern untergebracht, die von den Trabekeln gebildet werden (Leonhardt 1990).

Weißer Pulpa

Die weiße Pulpa wird in die periarterielle lymphatische Scheide (PALS) und in die Follikel untergliedert (Pabst 2004). Während sich die rezirkulierenden T-Lymphozyten vorwiegend um die Zentralarterien und Zentralarteriolen gruppieren und so die PALS aufbauen, stellen die Follikel Ansammlungen ruhender und sich differenzierender B-Lymphozyten dar (Hsu, Cossman et al. 1983; Timens und Poppema 1985). Die periarterielle Lymphozytenscheide ist in mancher Hinsicht ähnlich wie die parafollikuläre Zone im Cortex des Lymphknotens organi-

siert. Sie besteht aus einem lockeren Netz aus Retikulumfasern verbunden mit Retikulumzellen und T-Lymphozyten (Raviola 1997). Als zentrale Achse besitzt die PALS die Zentralarterie, die sich verzweigt und in Arteriolen übergeht.

Die Anordnung der T-Lymphozyten in der periarteriellen Lymphozytenscheide (PALS) ist allerdings beim Menschen bei Weitem weniger regelmäßig als bei Nagern (van Krieken und te Velde 1988). So sind in der Nachbarschaft von Follikeln T-Zellen häufig unregelmäßig um die Zentralarteriolen herum verteilt und können streckenweise sogar fehlen. Mitunter scheint die PALS sogar durch B-Lymphozyten ersetzt zu sein, und man beobachtet Zentralarterien, die durch die Korona oder sogar durch das Keimzentrum eines Follikels ziehen (van Krieken und te Velde 1988; Steiniger und Barth 2000).

Die Follikel können als Primärfollikel mit kleinen Lymphozyten oder als Sekundärfollikel mit aktiven Keimzentren auftreten (Pabst 2004). Außerdem gibt es zugrunde gehende Follikel. Das Keimzentrum entsteht erst nach Antigenkontakt im Rahmen einer Immunreaktion und kennzeichnet so den Sekundärfollikel. Im Keimzentrum befinden sich vorwiegend B-Lymphozyten, aber auch T-Lymphozyten (fast ausschließlich T-Helferzellen) sowie follikuläre dendritische Zellen, NK-Zellen und Makrophagen (Kroese, Timens et al. 1990; Pabst 2004).

Die Korona, auch Mantelzone genannt, umschließt das Zentrum des Follikels und bildet das Äquivalent des Primärfollikels, der durch die Entstehung des Keimzentrums an den Rand gedrängt wurde. Sie variiert in ihrer Breite und wird von rezirkulierenden B-Lymphozyten gebildet (Steiniger und Barth 2000).

Ein weiteres Subkompartiment der weißen Pulpa ist die sog. Marginalzone. Sie umgibt schalenförmig die weiße Pulpa und wird beim Menschen durch flache und elongierte Zellen, welche Myofibroblasten repräsentieren, in einen inneren und äußeren Abschnitt unterteilt (Steiniger, Barth et al. 1997). Die Marginalzone wurde beim Menschen fast nur in der Umgebung von Follikeln beobachtet (Timens 1991). Hauptsächlich befinden sich darin IgM-positive und IgD-negative oder schwach IgD-positive B-Gedächtniszellen (Spencer, Perry et al. 1998; Steiniger, Barth et al. 2001). Mit größter Wahrscheinlichkeit spielen diese Zellen eine entscheidende Rolle bei der schnellen Antikörperbildung gegen Polysaccharide von Bakterienoberflächen (MacLennan und Liu 1991). Nicht selten ist entlang der Myofibroblasten ein Ring aus T-Zellen angeordnet, die CD 3 und CD 4 exprimieren (Steiniger und Barth 2000).

Eine weitere spezielle Region um den Follikel, welche in der Milz des Menschen vorkommt, aber nicht in der der Ratte (Steiniger und Barth 2000), ist die sog. perifollikuläre Zone. Sie befindet sich außerhalb der marginalen Zone und wurde erstmals von van Krieken und te Velde (van Krieken und te Velde 1986; van Krieken und te Velde 1988) als solche definiert. In früheren Schriften wurde ihre Präsenz schon von Weidenreich (1901) und Herrlinger (1949) erkannt und beschrieben. Sie wurde damals als „Knötchenrandzone“ bezeichnet. Die perifollikuläre Zone ist schwierig einzuordnen und abzugrenzen, da sie normalerweise ein Teil der roten Pulpa ist und gleichzeitig dem Follikel aufliegt. Laut in den meisten Beschreibungen von Steiniger und Barth (2000) enthält die perifollikuläre Zone blutgefüllte Räume, die sehr reich an Erythrozyten sind und auch viele Monozyten und Granulozyten enthalten, mehr als andere Teile der roten Pulpa. Unter bestimmten Umständen jedoch enthält die perifollikuläre Zone auch B-Lymphozyten. Diese gleichen dann denen in der äußeren Marginalzone (Steiniger und Barth 2000).

Die Region der perifollikulären Zone ist durch ein Netz aus retikulären Fasern gekennzeichnet, das sowohl die Follikel als auch die PALS umgibt. Die Maschen dieses Netzes sind weiter als in den Marksträngen der roten Pulpa (Steiniger, Rüttinger et al. 2003). In der Milz des Menschen findet der Übergang von der marginalen Zone über die perifollikuläre Zone hin zur eigentlichen roten Pulpa schrittweise und nahezu ohne eine genaue Abgrenzung statt (Steiniger und Barth 2000).

Rote Pulpa

Die rote Pulpa der Milz des Menschen besteht hauptsächlich aus den venösen Sinusoiden und dem retikulären Bindegewebe der Pulpastränge (Leonhardt 1990). Das Besondere ist, dass im Bereich der Pulpastränge das Blutgefäßsystem offen ist und dass hier also offene Blutkapillaren vorliegen (Fujita 1974; Welsch 2010). Wie gelingt es primär immotilen Anteilen des Bluts, den Erythrozyten und Thrombozyten, aus dem Bindegewebsraum der Pulpastränge zurück ins Lumen der Gefäße zu gelangen, konkret in das Lumen der angrenzenden Sinus (s.u.)?

Blutgefäßsystem der Milz des Menschen

Beim Menschen finden sich, anders als bei Ratten, Trabekelarterien (Steiniger und Barth 2000). Diese verlaufen gemeinsam mit den Venen in den Trabekeln.

Trabekelarterien geben Zweige ab, die in das Bindegewebe der Pulpa eintreten und hier Zentralarterien genannt und von einer PALS ummantelt werden. Diese verzweigen sich endständig und werden zu kleineren Arteriolen, die sich in ca. zwei bis sieben Arteriolen aufspalten können (Pinselarteriolen). Nachdem diese Arteriolen endgültig die weiße Pulpa verlassen haben, treten sie in die rote Pulpa ein, verzweigen sich weiter und gehen dann in Kapillaren über (Pabst 2004). Die Kapillaren werden z.T. abschnittsweise von einer dichten Lage kontraktiler Zellen und Makrophagen spindelartig umgeben und dann als Hülsenkapillaren oder Ellipsoide bezeichnet. Sie finden sich in der perifollikulären Zone und in der typischen roten Pulpa (van Krieken, te Velde et al. 1985; Sasou, Satodate et al. 1986). Andere Autoren wie Weiss (Weiss 1983) haben anstatt der Begriffe Ellipsoid oder Hülsenkapillaren einen anderen Begriff, und zwar „periarterielle Makrophagenscheide“ vorgeschlagen. Nach ihren Studien sind diese in der menschlichen Milz eher klein und auch nicht jede Endkapillare ist von ihr umschlossen, also anders als bei Hund und Katze (Weiss 1983). Steiniger und Barth (2000) sind der Meinung, dass ummantelte Kapillaren nur in der perifollikulären Zone beobachtet wurden. Ihrer Ansicht nach sei der Begriff „Ellipsoid“ in der Vergangenheit irreführend gewesen und tatsächliche „Ellipsoide“ als solche tauchen beim Menschen nicht auf (Steiniger und Barth 2000). Die genauen Verhältnisse sind bislang noch ungeklärt.

Kapillaren können kontinuierlich in den Sinus (s.u.) übergehen, der sog. „kontinuierliche Kreislauf“, oder sich in den Pulpasträngen öffnen, so dass das Blut frei im Bindegewebe zirkuliert, der sog. „offene Kreislauf“; das offen im Bindegewebe fließende Blut muss durch die Sinuswände hindurch seinen Weg zurück ins Kreislaufsystem finden.

Die Milzsinus (Sinus venulares) sind dünnwandige und weitlumige Gefäße, die sich funktionell an die Kapillaren anschließen. Mit ihnen beginnt der venöse Teil des Milzkreislaufs. Sie entspringen meistens „blind“ in der roten Pulpa und leiten das Blut über die Pulpavenen schließlich in die Trabekelvenen, die das Organ drainieren. Aufgebaut sind die Sinus aus Endothel mit elongierten stäbchenförmigen Endothelzellen (Leonhardt 1990). Die Basallamina ist diskontinuierlich und auf sog. Ringfasern beschränkt. Die Interzellularspalten sind zufolge Fujita (1974) größtenteils deutlich erweitert, also offen, ob nur zeitweise, ist nicht sicher bekannt. Im basalen Zytoplasma und auch entlang der Endothelschlitze sind kontraktile Aktin und Myosin enthaltende Filamentbündel (Stressfasern)

ausgebildet (Drenckhahn und Wagner 1986). Die Sinus werden in regelmäßigen Abschnitten von ca. 5 µm von gürtelförmig verlaufenden retikulären Fasern mit Basallaminakomponenten umgeben (Ringfaser), die das Endothel der Sinus von außen zusammenhalten (Pabst 2004).

Einer verbreiteten Theorie zufolge fließt also das Blut der Milz des Menschen aus den Pulpasträngen durch die Endothelschlitze in die Sinus (Fujita 1974; Fujita, Kashimura et al. 1982). Diese Theorie ist alt und wurde dann durch rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen gestützt. Die Problematik der Durchblutung der Milz wurde wiederholt diskutiert, ausführlicher in der jüngeren Vergangenheit (Raviola 1997; Steiniger und Barth 2000). Danach ist deutlich, dass zwar viel dafür spricht, dass es offene und geschlossene Anteile im Milzkreislauf gibt, dass aber auch noch einiges hypothetisch ist. Eine noch unbefriedigend beantwortete Frage betrifft z.B. den „Motor“ für den Durchtritt der Erythrozyten durch das Sinusendothel. Herrscht in den Pulpasträngen eine starke Strömung, die die Erythrozyten durch das Sinusendothel treibt? Da die Erythrozyten immotil sind, stellt sich die Frage, ob sie trotzdem in der Lage sind sich eine Öffnung im Endothel zu schaffen. Oder bilden sich nach Kontakt im Endothel Öffnungen, die weit genug sind, die Erythrozyten passiv durchströmen zu lassen?

Ob es neben dem „offenen“ auch einen „geschlossenen“ Kreislauf in der Milz des Menschen gibt, bei dem ein kontinuierlicher Endothelschlauch vorhanden ist, wurde in den vergangenen Jahren kontrovers diskutiert (Saitoh, Kamiyama et al. 1982; van Krieken, Te Velde et al. 1985; Schmidt, MacDonald et al. 1988). Gründliche rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen haben die Mikrozirkulation mit ihrer speziellen Kinetik wahrscheinlich weitgehend geklärt (Kashimura und Fujita 1987; Groom, Schmidt et al. 1991). Es existiert demzufolge beim Menschen sowohl ein offener als auch in geringem Maße der geschlossene Kreislauf. Steiniger und Barth (2000) vermuten, dass der offene Kreislauf dominiert.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Milz ausschließlich des Menschen, und zwar von Kleinkindern und Erwachsenen mit Hilfe moderner morphologischer Methoden unter besonderer Berücksichtigung des Vorkommens kontraktile Elemente. Die Suche nach kontraktile Elementen außerhalb der glatten Gefäßmuskulatur ist wegen der oben genannten Problematik sinnvoll und kann unter Umständen helfen, dem Mosaik der Fragen zum Blutstrom in der Milz einen weiteren Stein hinzuzufügen. Kleinkind und Erwachsener werden unter-

sucht, weil bei ihnen jeweils eine unterschiedliche Immunstimulation vorliegt. Bargmann (1977) führt aus, dass die Milz des Kleinkindes zahlreiche gleichmäßig verteilte Follikel besitzt. Im Vordergrund der Arbeit stehen nicht die immunologischen Funktionen der Milz, sondern Stroma, Kapsel- und Trabekelsystem, rote Pulpa und Gefäße. Wesentlich für diese Untersuchung sind histologische Techniken, immunhistochemische Methoden und Transmissionselektronenmikroskopie; wichtig ist außerdem gut fixiertes Gewebe.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Die in dieser Studie verwendeten Milzgewebe stammen von neun Erwachsenen und drei Kindern. Die neun Erwachsenenmilzen (75, 69, 69, 65, 54, 48, 30, 25 und 21 Jahre) wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. med. Graw und PD Dr. med. Peschel aus der Rechtsmedizin der LMU München zur Verfügung gestellt. Die uns vorliegenden drei Kindermilzpräparate (4 Jahre, 14 Monate und 11 Wochen) entstammen ebenfalls der Rechtsmedizin der LMU und von Prof. Dr. med. Anthuber aus der chirurgischen Klinik in Augsburg. Zwei der Kindermilzen wurden aufgrund einer Milzruptur und eine wegen Hepatitis C operativ bei den Kindern entfernt. Bei allen Milzpräparaten waren laut Angabe der Rechtsmedizin und der Kinderchirurgie keinerlei Vorerkrankungen bekannt. Insgesamt wurden ca. 700 Schnittpräparate angefertigt.

2.2 Einbettung der Proben für die Lichtmikroskopie

2.2.1 Präparation und Fixation der Gewebe für Paraplastschnitte

Das frisch entnommene Milzgewebe wurde ohne Zeitverzögerung gleich nach der Entnahme zugeschnitten und in eine gepufferte Formalinlösung, bestehend aus einem Teil Formaldehyd (37%) und neun Teilen Phosphatpufferlösung (0,1 M) gegeben. Nach 24 Stunden wurde das Gewebe in Einbettkassetten gelegt und 30 Minuten unter fließendem Leitungswasser ausgewaschen. In einer aufsteigenden Alkoholreihe (s. Tab. 1) wurde das Gewebe dehydriert und über Xylol als Zwischenmedium auf 56°C erwärmtes flüssiges Paraplast überführt (48 Stunden). Als nächstes erfolgte die Einbettung der Gewebeproben in Paraplastblöcke. Nach einer halben Stunde sind diese auf der gerätezugehörigen Kühlplatte ausgekühlt und können geschnitten bzw. bei Raumtemperatur gelagert werden.

Lösung	Dauer
50% Ethanol	4 Stunden
70% Ethanol	2x4 Stunden
80% Ethanol	4 Stunden
96% Ethanol	4 Stunden
100% Ethanol	2x4 Stunden
Xylol	2x4 Stunden
Paraffin	3x4 Stunden

Tabelle 1: Einbettung

2.2.2 Anfertigen der Paraplastschnitte

Für diese Methode werden spezielle, mit einer einseitigen elektrostatisch anziehenden Beschichtung versehene Objektträger verwendet (Superfrost Plus, Fa. Menzel, Braunschweig). Die in Paraplastblöcke eingebetteten Gewebe wurden gekühlt und hiervon mit dem Mikrotom 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese werden mit einem Pinsel aufgenommen und zum Entfalten auf die Oberfläche des auf 37°C erwärmten destillierten Wasserbads gelegt. Anschließend werden sie auf die Superfrost-Plus-Objektträger aufgenommen und für 24 Stunden bei 48°C in einem Wärmeschrank vollends getrocknet. Dadurch wird eine Lagerungsfähigkeit von mehreren Monaten bei Zimmertemperatur erreicht.

2.2.3 Entparaffinierung der Schnitte

Zur Vorbereitung der Paraplastschnitte für die Färbungen oder immunhistochemischen Nachweise wurde das Paraffin durch zweimaliges Einstellen in Xylol von je 10 Minuten herausgelöst. Anschließend wurden die Schnitte durch zweiminütiges Einstellen in Alkohollösungen mit abnehmender Konzentration (100%, 96%, 80%, 70%, 50%) rehydriert und mit aqua destillata ausgewaschen.

2.2.4 Eindecken der Schnitte

Um die gefärbten Präparate dauerhaft aufzubewahren zu können, wurden die Schnitte nach der Färbung in Küvetten mit einer aufsteigenden Alkoholreihe für jeweils 2 Minuten eingestellt (70%, 80%, 96% und 2 x 100%). Danach wurden sie 2 x 10 Minuten in Xylol eingestellt und mit DPX eingedeckt.

2.3 Konventionelle histologische Färbungen

2.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (Romeis 1989)

Zur besseren Beurteilung der immunhistochemischen und histochemischen Färbungen wurde grundsätzlich eine Übersichtsfärbung mit Hämalaun-Eosinfärbung durchgeführt. Die entparaffinierten Schnitte wurden zur Kernfärbung zunächst für 5 Minuten in Hämalaun (saure Hämalaunlösung nach Mayer) eingestellt, anschließend 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut, wodurch der pH-Wert neutralisiert wurde und die rötliche Kernfärbung ins Blaue umschlug, und danach mit aqua destillata abgespült. Die Bindegewebsfärbung erfolgte durch 2-minütige Einstellen der Schnitte in wässriger Eosinlösung (0,1%). Nach kurzem Spülen in destilliertem Wasser wurden die Schnitte in Ethanol (80%) differenziert, dehydriert und eingedeckt.

2.3.2 Azanfärbung nach Heidenhain (Romeis 1989)

Die Azanfärbung ist eine Trichromfärbung, die speziell kollagene Fasern sehr klar und anschaulich darstellt. Die Bestandteile der Farblösung sind 1. Azokarmin, 2. Orange G und 3. Anilinblau. Der Name „Azan“ entstammt den Abkürzungen der Farbstoffe aus Azokarmin und Anilinblau. Mit der Azanfärbung stellen sich die Kollagenfasern (Kollagen Typ I) leuchtend blau, retikuläre Fasern (Kollagen Typ III) zartblau, das Zytoplasma rötlich, Zellkerne rot, Erythrozyten rot, elastische Fasernetze und elastische Membranen blassrot und das Muskelgewebe rötlich bis orange dar.

Nach dem Entparaffinieren und Rehydrieren in absteigender Alkoholreihe (s.o.) werden die Gewebeschnitte für eine Dauer von 10 bis 15 Minuten in eine im Wärmeschrank vorgewärmte Azokarminlösung bei 56°C gestellt. Anschließend werden die Schnitte mit destilliertem Wasser abgespült. Mit einer Anilin-Alkohol-Lösung (1 ml Anilinöl auf 1000 ml Alkohol (96%)) werden die Gewebeschnitte so weit entfärbt, bis nur noch die Zellkerne rot gefärbt sind. Um die Entfärbungsreaktion abzubrechen, werden die Schnitte in Essigsäure-Alkohol (1 ml Eisessig auf 100 ml Alkohol (96%)) ausgewaschen. Im Anschluss erfolgt 1- bis 3-stündiges Beizen in wässriger Phosphorwolframsäure (5%). Daraufhin erfolgt ein kurzes Spülen in aqua destillata und ein 5- bis 10-minütiges Färben in Anilinblau-

Orange-G-Essigsäure. Abschließend wird das Material mit destilliertem Wasser ausgespült, in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und über Xylol mit DPX und Deckgläschen eingedeckt.

2.3.3 Silberimprägnation nach Gomori (Romeis 1989)

Durch ein geeignetes Imprägnationsverfahren mit Silbersalzen können vor allem Faseranteile dargestellt werden. Die Sichtbarmachung der retikulären Fasern gelingt besonders gut mit der Versilberung nach Gomori. Da diese Fasern argyrophil sind, lassen sie sich spezifisch dunkelbraun bis schwarz darstellen.

Vorbehandlung: Nach Entparaffinierung und absteigender Alkoholreihe (100%, 96%, 80%, 70%) wurden die Schnitte 2 Minuten in Leitungswasser ausgewaschen. Eine Entfärbung erfolgte durch eine 1-minütige Behandlung mit Kaliumdisulfit-Lösung (0,5%) und anschließender 5-minütiger Wässerung in Leitungswasser.

Imprägnation: 2 Minuten lang wurden die Schnitte in frische 2%ige-Eisen-Ammonium-Sulfatlösung gestellt, welche die Wirkung einer Beize hat. Es raut die Fasern auf und sorgt gleichzeitig für die Bildung von Reifekeimen. Es folgte dann eine fließende Wässerung 5 Minuten lang unter Leitungswasser. Danach wurde mit destilliertem Wasser 2 x 2 Minuten gespült. Die Schnitte werden nun 1 Minute in ammoniakalische Silberlösung eingetaucht. Es folgt eine rasche 5- bis 10-Sekunden-Spülung mit destilliertem Wasser, um die Silbernitratlösung abzuspülen. Dieser Schritt ist färbeentscheidend. Es folgt eine Fixation der Präparate (5 Minuten) mit Formalinlösung (4%) und dann ein 5-minütiges Auswaschen unter Leitungswasser. Die kontrastreiche Darstellung der Fasern gelingt mit einer Gegenimprägnation Goldchloridlösung (0,1%) für mind. 20 Minuten mit einem folgenden Spülschritt mit destilliertem Wasser. Die Präparate werden in Kaliumdisulfitlösung (2%) für 1 Minute gestellt und danach 2 Minuten lang gewässert. Schließlich werden die Schnitte zur Fixierung mit Natriumthiosulfatlösung (1%) 1 Minute lang behandelt und dann 5 Minuten in Leitungswasser ausgewaschen. Nach der Entwässerung durch die aufsteigende Alkoholreihe, wurden die Präparate je 5 Minuten lang in Ethanol (100%) und Xylol gestellt und schließlich mit DPX eingedeckt.

2.3.4 Aldehydfuchsin-Färbung (Romeis 1989)

Die Aldehydfuchsin-Färbung ist eine spezielle Elastikafärbung zur Darstellung von elastischen Fasern, Mukosubstanzen und Mastzellen. Mit dem Farbstoff Aldehydfuchsin werden die elastischen Fasern, insbesondere das Elastin im Gewebe, blau-violett. Nach Entparaffinieren und Rehydrieren wurden die Schnitte 5 Minuten in Kaliumpermanganatlösung (1%) oxidiert, in fließendem Leitungswasser gewaschen und kurz in Oxalsäure (1%) getaucht, um überschüssiges Kaliumpermanganat zu entfernen. Nach kurzem Spülen unter Leitungswasser wurden die Schnitte in Ethanol (70%) gespült und für 15 Minuten in die Aldehydfuchsin-Lösung eingestellt. Zur Differenzierung wurde wiederum Ethanol (70%) verwendet. Anschließend wurden die Schnitte dehydriert und eingedeckt.

2.4 Immunhistochemische Nachweise

2.4.1 Prinzip der Avidin-Biotin-Komplex-Methode

Bei der ABC-Methode (für Avidin-Biotin-Komplex) wird die hohe Affinität zwischen dem Eiweißglykoprotein Avidin und dem Vitamin Biotin genutzt, um enzymgekoppelte Tertiärreagenzien an die Stelle der Primärantikörperbindung zu bringen. Man spricht auch von biotinylierten Brückenantikörpern, da der Sekundärantikörper mit Biotin konjugiert wird.

Die Antigennachweise in den Paraplastschnitten erfolgten mit Hilfe der indirekten Immunperoxidase-Methode (ABC-Methode). Die Schnitte wurden entparaffiniert und rehydriert, evtl. vorbehandelt in der Mikrowelle (2 x 10 Minuten kochen in Citratpuffer (0,01 M), pH 6,0 zur Reaktivierung formalininduzierter Vernetzungen der Antikörperbindungsstellen) und die endogene Peroxidase 5 Minuten mit H₂O₂ (3%) unter Lichtausschluss blockiert. Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit PBS-Puffer (0,01 M) pH 7,4 (Phosphat Buffered Saline) gewaschen.

Die unspezifischen Bindungen, die eine unerwünschte Hintergrundfärbung verursachen, wurden durch die 10-minütige Inkubation mit dem entsprechenden Nullserum minimiert. Der Primärantikörper (monoklonal oder polyklonal) wird dann in seiner jeweiligen Verdünnung in PBS aufpipettiert und die Schnitte über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Gewebeschnitte 3 x mit PBS gespült. Der entsprechende Sekundärantikörper wurde für eine Einwirkzeit von ca. 30 Minuten auf die Gewebeschnitte aufgetragen. Anschließend wurde wieder dreimal mit PBS gespült. Daraufhin wurde Avidin-Biotin-Komplex für 30 Minuten auf die Schnitte aufgetragen. Dann erfolgte dreimaliges Auswaschen mit PBS. Im Anschluss daran erfolgte die chromogene Darstellung mit DAB für ca. 10 Minuten. Im nächsten Schritt wurden die Kerne leicht mit Hämalaun angefärbt, abschließend dehydriert und mit DPX entfärbt.

2.4.2 Primärantikörper

Antikörper	Vorbehandlung	Verdünnung	Spezies	Herkunft
Kollagen I	MW	1 : 100	Maus	ICN
Kollagen III	MW	1 : 250	Maus	Acris
Aktin	-	1 : 500	Maus	Sigma
Alpha-Tubulin	MW	1 : 400	Maus	Zymed
Beta-Tubulin	MW	1 : 200	Maus	Zymed
Vimentin (V9)	-	1 : 50	Maus	Abcam
Connexin 43	MW	1 : 100	Maus	Zymed
CD 3	Trypsin	pur	Kaninchen	Zymed
CD 8	MW	1 : 20	Maus	Dako
CD 20	-	1 : 50	Maus	BioGenex
CD 68	MW	1 : 200	Maus	Dako
CD 74	MW	pur	Maus	Zymed
NFPC	-	1 : 200	Kaninchen	Biotrend
S100	-	pur	Kaninchen	Zymed
Myosin IIA	-	1 : 500	Kaninchen	Sigma

Tabelle 2: Primärantikörper

2.5 Transmissionselektronenmikroskopie

2.5.1 Materialvorbereitung

1 bis 2 mm große Gewebestückchen wurden 2 Stunden in phosphatgepuffertem Glutaraldehyd (3,5%) fixiert. Anschließend wurde das Gewebe über Nacht in Glutaraldehyd (1%) im Kühlschrank aufbewahrt. Nach Auswaschen in Phosphatpuffer erfolgte eine zweistündige Nachfixierung in Osmium (2%). Nach erneutem Auswaschen in Phosphatpuffer wurde das Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und über Propylenoxid in Araldit eingebettet. Die Aushärtung der Aralditblöckchen erfolgte im Brutschrank bei 60°C über 48 Stunden.

2.5.2 Objektträger für Semidünnschnitte

Standardisierte Glasobjektträger werden mit einer Lösung aus 1µg Poly-L-Lysin pro 1 ml TBS-Puffer 1 Stunde lang benetzt und 12 Stunden lang bei 37°C im Brutschrank getrocknet.

2.5.3 Anfertigen der Semidünnschnitte

Zur Lokalisation der gesamten Gewebeareale für die späteren Ultradünnschnitte werden zunächst Semidünnschnitte angefertigt. Mit einer Skalpellklinge wird aus dem etwa 1 cm x 0,5 cm x 0,5 cm großen Kunststoffgewebestück eine pyramidenförmige Probe geschnitten, die eine Grundfläche von 3 mm x 3 mm und eine Höhe von 1 mm nicht überschreitet. Aus dieser Probe werden mit einem Mikrotom 1 µm dicke Schnitte geschnitten und auf der Oberfläche eines kleinen Wasserbeckens aufgefangen. Die Oberflächenspannung des destillierten Wassers trägt die Semidünnschnitte, so dass sie mit einem Glasstab entnommen werden und auf die Poly-Lysin-beschichteten Objektträger aufgetragen werden können. Eine Streckung und Trocknung der Schnitte erfolgt in gleicher Weise wie bei den Paraplastschnitten.

2.5.4 Objektträger für Ultradünnschnitte

Kleine, handelsübliche kreisrunde Kupfernetze, die sog. Kupfergrids, dienen für die Transmissionselektronenmikroskopie als Objektträger.

2.5.5 Anfertigen der Ultradünnschnitte

An einem Ultracut E-Mikrotom werden mit einer Diamantklinge ca. 40 - 60 nm dicke Schnitte aus der pyramidenförmigen Kunststoff-Gewebeprobe geschnitten. Die optische Kontrolle der Schichtdicke erfolgt über die grau-silbrige Farberkennung mit bloßem Auge. Von der Wasseroberfläche des Auffangbeckens werden die Gewebeschnitte mit dem Kupfergrid entnommen.

2.5.6 Fotodokumentation der Ergebnisse

Über das Elektronenmikroskop Philips CM 10 werden die Dünnschnitte mit einer integrierten Kamera AGFA Pan 100 der Firma AGFA fotografiert. Die Negative wurden in einer Standarddunkelkammer von Hand entwickelt und abgezogen. Die lichtmikroskopischen Präparate wurden mit einem Olympus-Photomikroskop (BH-Z) auf Diafilm (Fujichrome, 64 T) aufgenommen und in einem gewerblichen Labor entwickelt und abgezogen.

-

3 Ergebnisse

3.1 Befunde der histologischen Färbemethoden

3.1.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung)

3.1.1.1 Übersicht

Die H.E.-Übersichtsfärbung zeigt Anzahl und Verteilung der Follikel im Milzgewebe.

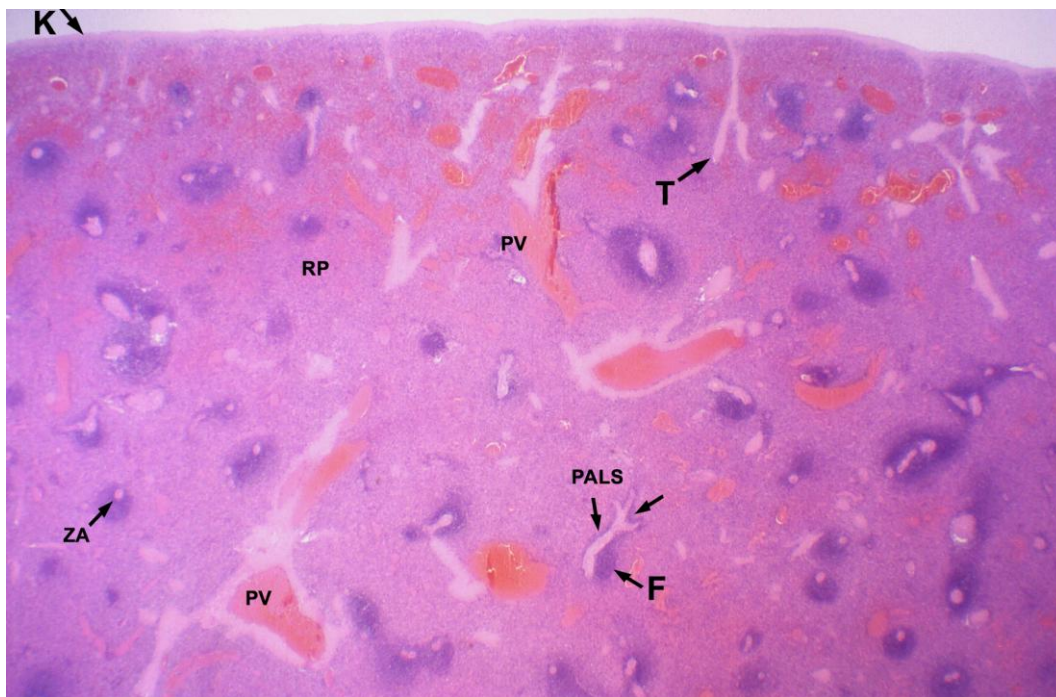


Abb. 1: Milz, erwachsener Mensch, 25 Jahre, H.E.-Übersicht, Vergr. 10-fach

Kapsel (K), Trabekel (T), Zentralarterie (ZA), Pulpavene (PV), rote Pulpa (RP), Follikel (F), periarterielle Lymphozytenscheide (PALS), die Pfeile deuten auf die entsprechende Struktur hin.

Bei der Übersichtsbetrachtung der Milz des erwachsenen Menschen (Abb. 1) erkennt man die periarterielle Lymphozytenscheide, PALS, und die Follikel als dunkelviolette rundlich-ovale Zellaggregate, die sich verstreut im Milzparenchym befinden. Überwiegend handelt es sich bei den Follikeln um Follikel ohne reaktive Zentren, die zum größten Teil aus B-Lymphozyten bestehen. Die lymphatischen Follikel bilden gemeinsam mit der periarteriellen Lymphozytenscheide (PALS) die

weiße Pulpa. Die PALS ist nicht deutlich von den Milzknötchen zu unterscheiden, der Übergang ist fließend.

Umgeben ist die weiße Pulpa von erythrozytenreichem retikulärem Gewebe der roten Pulpa. Sie enthält die Milzsinus mit spezialisiertem Endothelium, Arteriolen und Kapillaren. Darüber hinaus zeigen sich noch weitere Gefäße mit weitem Lumen, welche als Inhalt eine große Menge an Erythrozyten aufweisen, die Pulpavenen.

Bei dieser Schnittfläche sind zudem kapselnahe Oberflächenanteile erkennbar. Die Kapsel bedeckt die Oberfläche der Milz und führt ihr Bindegewebsgerüst in Form von Milzbalken bzw. Trabekeln ins Organinnere. Sie sind als Anschnitte überall im Schnittpräparat verteilt als längliche helle eosinophile Strukturen erkennbar.

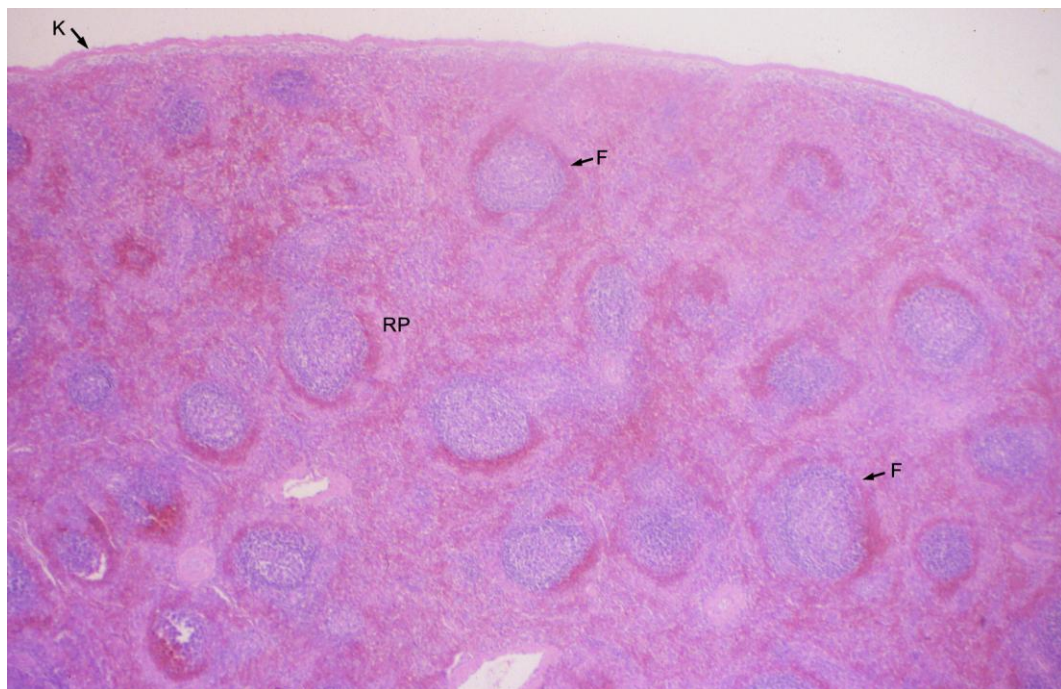


Abb. 2: Milz, Kind, 14 Monate, Kapsel (K), Rote Pulpa (RP), Follikel (F), H.E.-Übersicht, Vergr. 20-fach

Bei der Betrachtung der H.E.-Übersichtsfärbung der Kindermilz (Abb. 2) zeigen sich zahlreiche Lymphfollikel (Milzknötchen, Malpighische Körperchen) mit Reaktionszentren. Die Milzknötchen präsentieren typische Sekundärfollikel mit sich differenzierenden und proliferierenden B-Zellen im Keimzentrum und sich anschließendem Randwall.

3.1.1.2 Lymphfollikel

Die Milzknötchen können in der Milz des Menschen als Primär- oder als Sekundärfollikel vorliegen. Der Primärfollikel enthält einheitliche Ansammlungen von reifen, aber noch naiven B-Lymphozyten (Leonhardt 1990). Bei ihnen es ist noch nicht zu einem Antigenkontakt gekommen, so dass sie sich weder in einem Differenzierungsstadium noch einem Proliferationsprozess befinden. Der Sekundärfollikel ist viel auffälliger als der Primärfollikel und zeigt verschiedene Zonen auf. In seinem Inneren ist das Keim- oder Reaktionszentrum klar erkennbar. Die sich transformierenden B-Zellen sind nicht so dicht zusammengedrängt. Neben B-Lymphozyten sind desweiteren T-Lymphozyten und interdigitierende Zellen im Follikel enthalten.

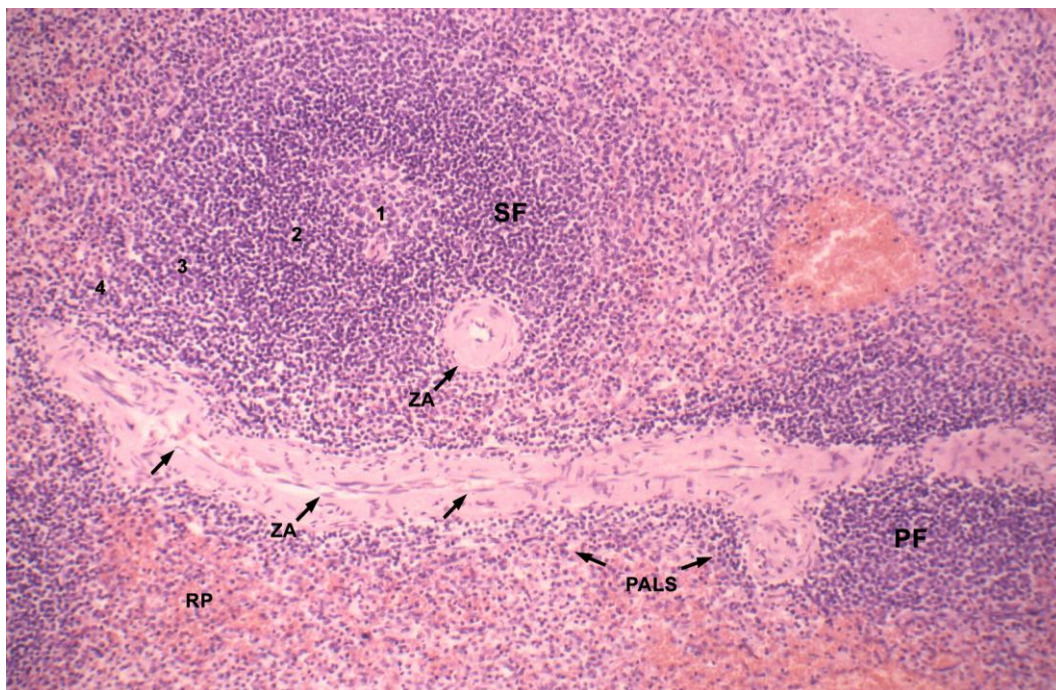


Abb. 3: Milz, erwachsener Mensch, 25 Jahre, PALS-Follikel, H.E.-Färbung, Vergr. 10-fach

Primärfollikel (PF), Sekundärfollikel (SF), 1 Keimzentrum, 2 Korona, 3 Marginalzone, 4 perifollikuläre Zone, Zentralarterie (ZA), periarterielle Lymphozytenscheide (PALS); die Pfeile deuten auf die Strukturen ZA und PALS.

Auf Abb. 3 sind 2 Milzknötchen erkennbar. Der 1. Follikel links im Bild ist rundlich und enthält zentral ein kleines helles Keimzentrum (Sekundärfollikel). Der 2. Follikel rechts unten im Bild ist ein Primärfollikel (PF). Er ist kompakt und hat kein Keimzentrum. Auffallend sind die arteriellen Gefäße der PALS, also die Zentralarterien, sowohl im Längs- als auch im Querschnitt. Sie stellen sich in der H.E.-Färbung hellrosa dar, enthalten kollagene und elastische Fasern und auch glatte Muskelzellen, die meistens zwei Schichten bilden. Desweiteren ordnen

sich T-Lymphozyten, gut an ihrem dunkelvioletten Kernmaterial erkennbar, um die Zentralarterien an und stellen die periarterielle Lymphozytenscheide (PALS) dar.

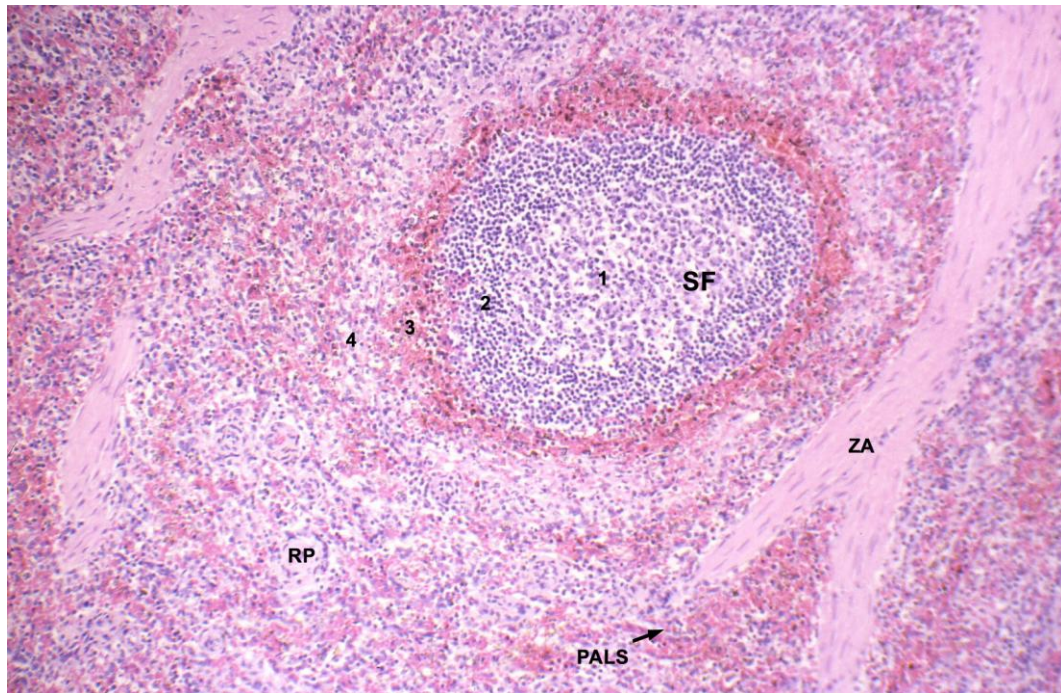


Abb. 4: Milz, Kind (mit Hepatitis C), Follikel, H.E.-Färbung, Vergr.120-fach

1 Keimzentrum, 2 Korona, 3 Marginalzone, 4 perifollikuläre Zone. Ausgereifter Sekundärfollikel (SF) in der Kindermilz. In ihm sind die einzelnen Zonen der Follikel, Keimzentrum, Korona, Marginalzone und perifollikuläre Zone gut unterscheidbar.

3.1.1.3 Periarterielle Lymphozytenscheide (PALS)

Größere Ansammlungen von T-Lymphozyten befinden sich in der unmittelbaren Umgebung der Zentralarterie. Sie bilden die periarterielle Lymphozytenscheide (PALS), die als sehr zellreicher violetter Belag auf den Zentralarterien zu erkennen ist. Die PALS ist zum Milzfollikel und zur roten Pulpa nicht scharf abgegrenzt.

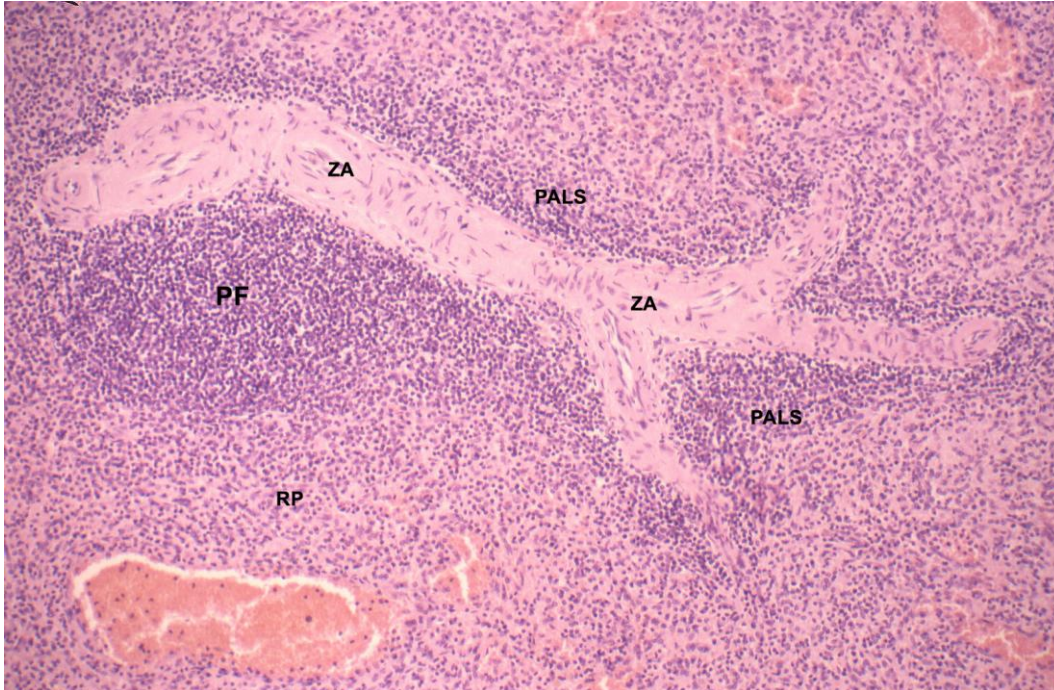


Abb. 5: Milz, erwachsener Mensch, 25 Jahre, PALS, H.E.-Färbung, Vergr. 120-fach

Zentralarterie (ZA); Primärfollikel (PF), rote Pulpa (RP), periarterielle Lymphozytenscheide (PALS)

-

3.1.2 Azanfärbung nach Heidenhain

3.1.2.1 Übersicht

Die Azanfärbung eignet sich besonders gut zur Veranschaulichung der Verteilung der Kollagenfasern. Im Übersichtspräparat der Humanmilz wird deutlich, dass die Hauptkomponenten der Kapsel- und Trabekelmatrix kräftige Kollagenfasern sind. Diese bestehen aus Kollagen Typ I (grobe, kräftige, mit Azan leuchtend blau anfärbbare Fasern). Die Milztrabekel führen größere Gefäße in sich, die Trabekelarterien bzw. -venen.

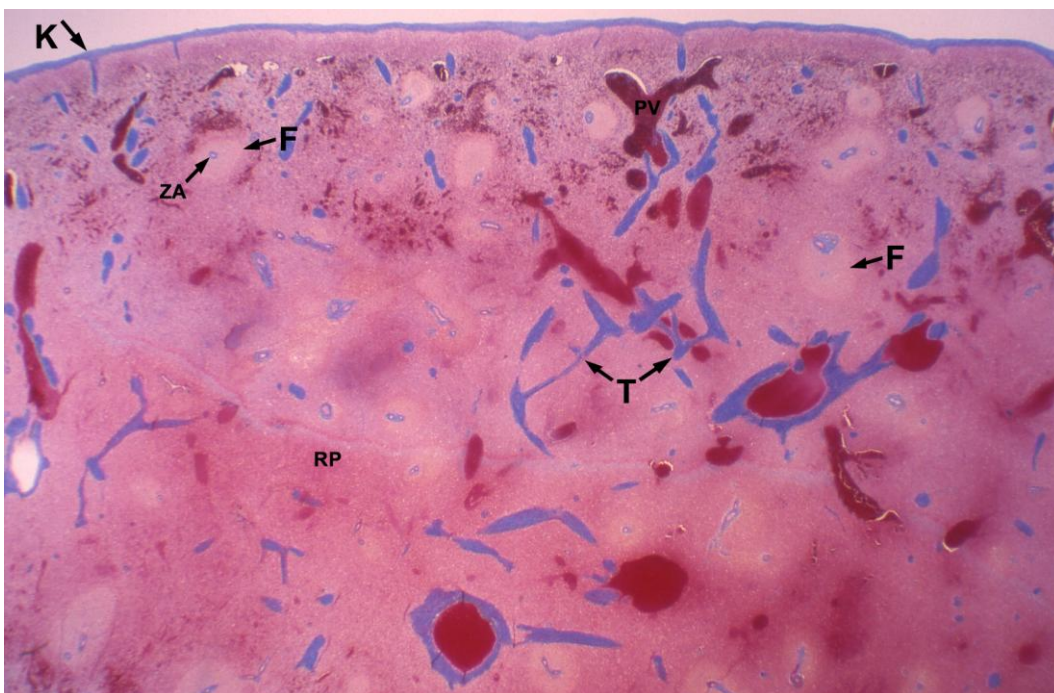


Abb. 6: Milz, erwachsener Mensch, Übersicht Azanfärbung, Vergr. 10-fach

Kapsel (K) Zentralarterie (ZA), Pulpavene (PV), rote Pulpa (RP), Trabekel (T), Follikel (F); die Pfeile deuten auf die entsprechenden Strukturen hin.

Die Übersichtsfärbung mit Azan markiert bei der Kindermilz ebenfalls Kapsel- und Trabekelmatrix blau. Wie im H.E.-Präparat sind zahlreiche sekundäre Milzfollikel in das Parenchym der Milz eingebettet.

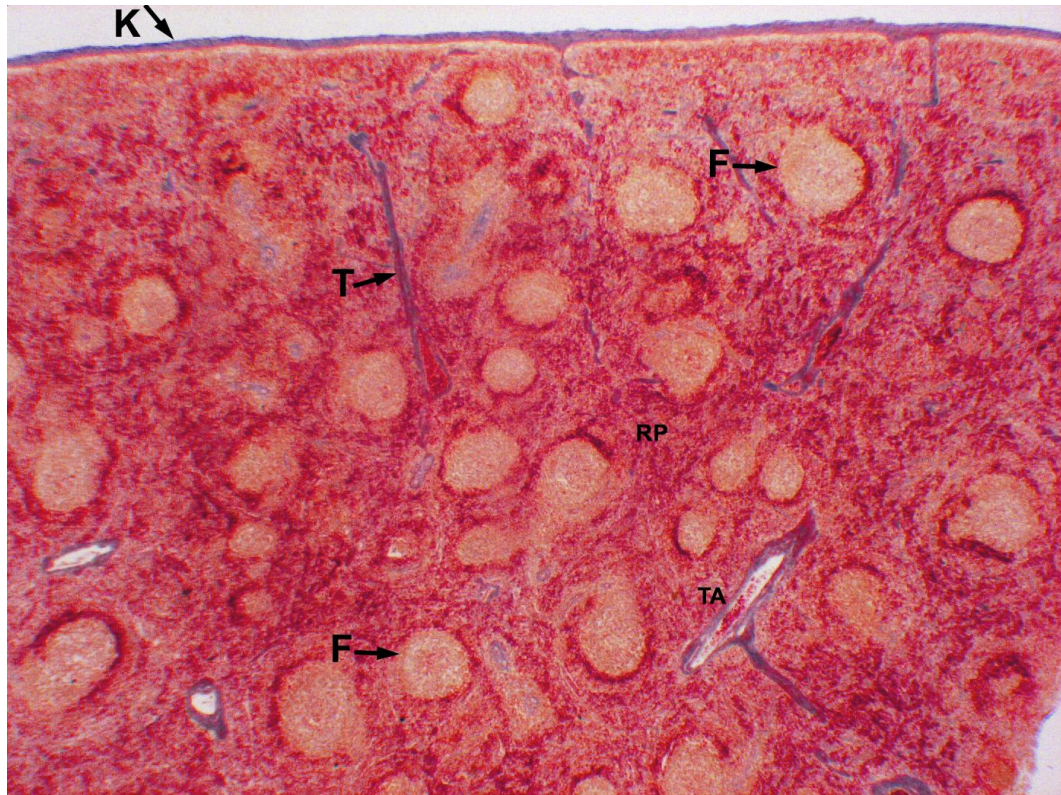


Abb. 7: Milz, Kind, 14 Monate, Hepatitis C, Azanfärbung, Vergr. 10-fach

Kapsel (K), Trabekelarterie (TA), rote Pulpa (RP), Trabekel (T), Follikel (F); Die Pfeile deuten auf die entsprechenden Strukturen hin.

3.1.2.2 Blutgefäße

3.1.2.3 Trabekel und Trabekelarterie

Mit Hilfe der Azanfärbung werden auf Abb. 8 gut die Kollagenfasern eines Milzbalkens bzw. -trabekels im Längsanschnitt blau markiert. Der Trabekel ist reich an groben kollagenen Fasern. Zwischen ihnen liegen zahlreiche glatte Muskelzellen (rot). Der Milzbalken kann im Schnittpräparat sowohl eine Trabekelarterie als auch eine Trabekelvene enthalten.

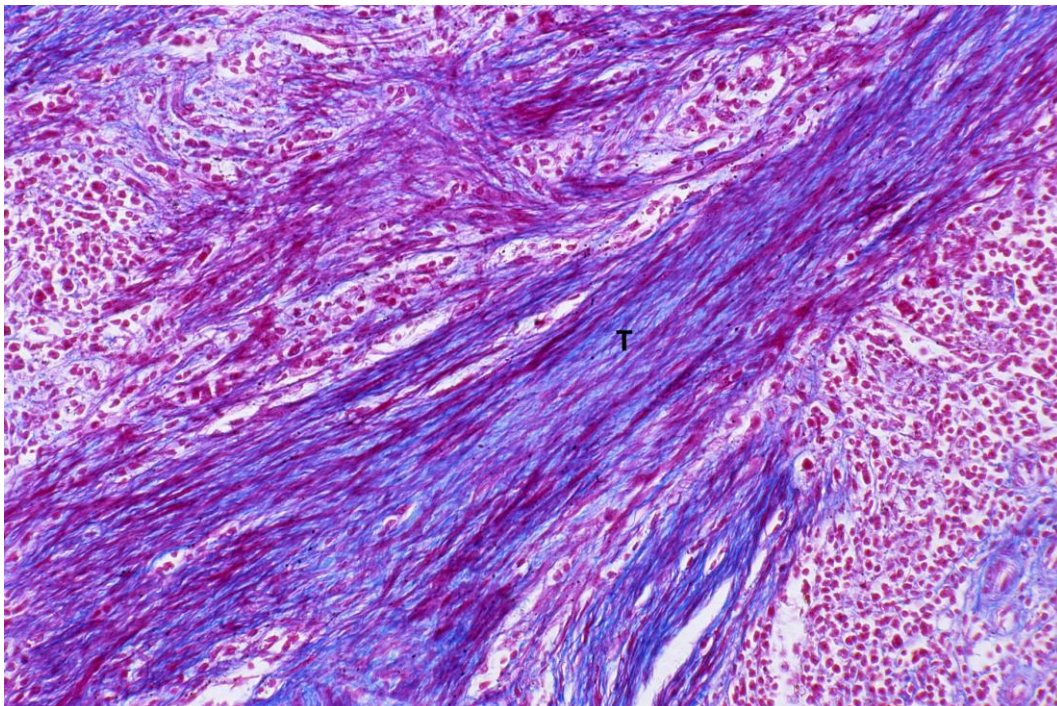


Abb. 8: Milz, erwachsener Mensch, Trabekel (T) mit zahlreichen rotgefärbten glatten Muskelzellen, Azanfärbung, Vergr. 250-fach

Der Trabekelarterienquerschnitt in Abb. 9 demonstriert die typische Wandschichtung einer Arterie vom muskulären Typ mit

1. Intima (oft einzelne, zarte, glatte Muskelzellen, mitunter kräftige, längsverlaufende Muskelzüge (Abb.10))
2. Media (viele glatte Muskelzellen; zwischen ihnen liegen kollagene Fasern und einzelne elastische Fasern)
3. Äußere, bindegewebige Adventitia

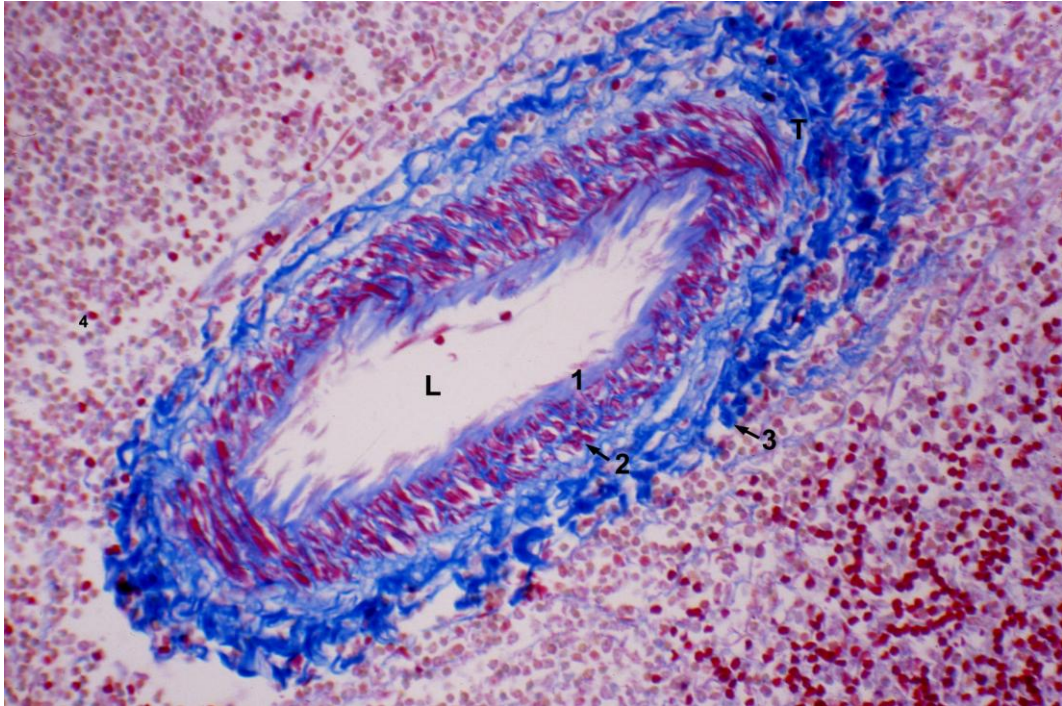


Abb. 9: Milz, erwachsener Mensch, Trabekelarterie, leicht schräg angeschnitten; Trabekel (T), Arterienlumen (L), 1 Intima 2 Media 3 Adventitia; Azanfärbung, Vergr. 250-fach

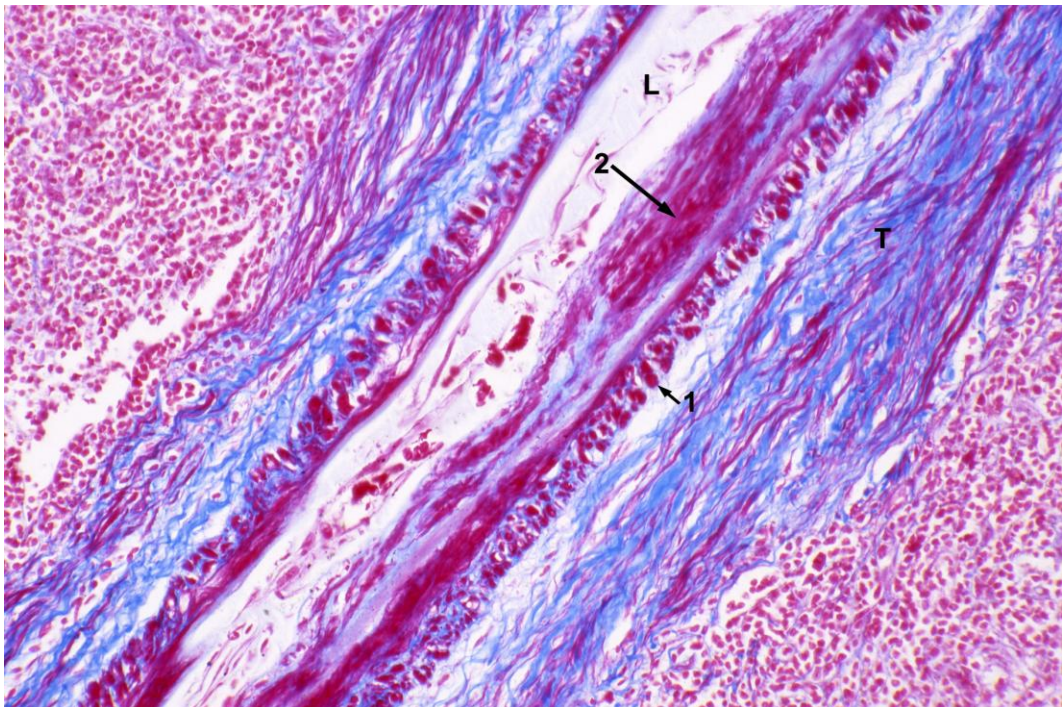


Abb. 10: Milz, erwachsener Mensch, Trabekel, Azanfärbung, Vergr. 250-fach

Trabekel (T) mit Trabekelarterie längs mit zirkulärer (1) und longitudinaler (2) glatter Muskulatur, Arterienlumen (L); das Endothel ist vielfach artifiziiell abgelöst.

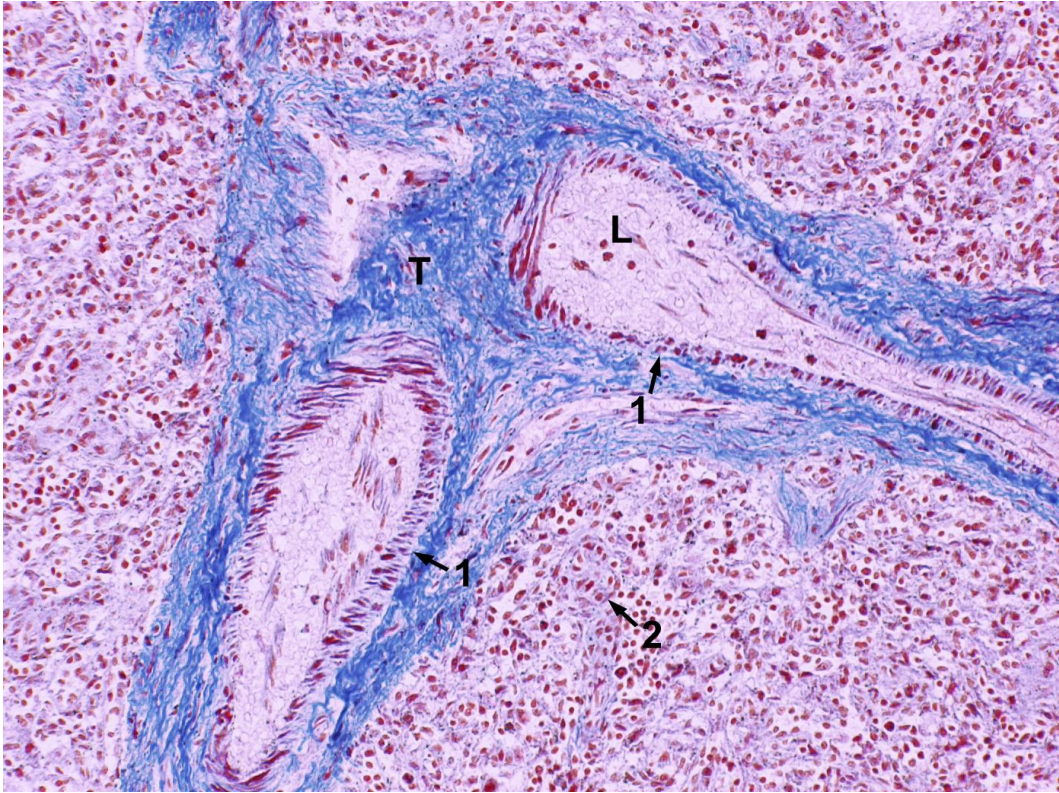


Abb. 11: Milz, Kind, Trabekulararterien, Azanfärbung, Vergr. 110-fach

Trabekulararterien (1) Trabekel (T), Arterienlumen (L), Sinus (2); die Pfeile deuten auf die jeweiligen Strukturen.

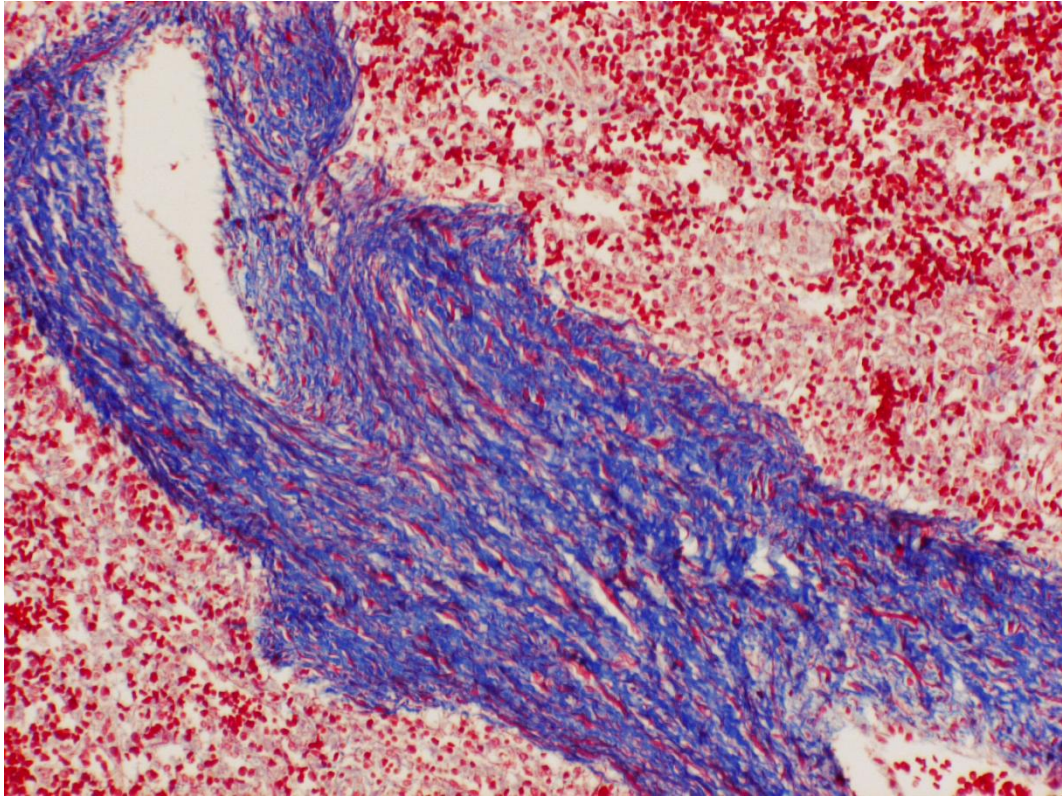


Abb. 12: Milz, Kind, Trabekel mit rotgefärbten glatten Muskelzellen, Azanfärbung, Vergr. 110-fach

3.1.2.4 Zentralarterie

Die Intima der Zentralarterie besteht aus dem Endothel, einer sehr dünnen Bindegewebsschicht und der *Elastica interna*. Die *Media* ist aus zwei bis drei regelmäßigen zirkulären Lagen glatter Muskelzellen zusammengesetzt. Umhüllt werden sie von Kollagenfasern (leuchtend blau gefärbt).

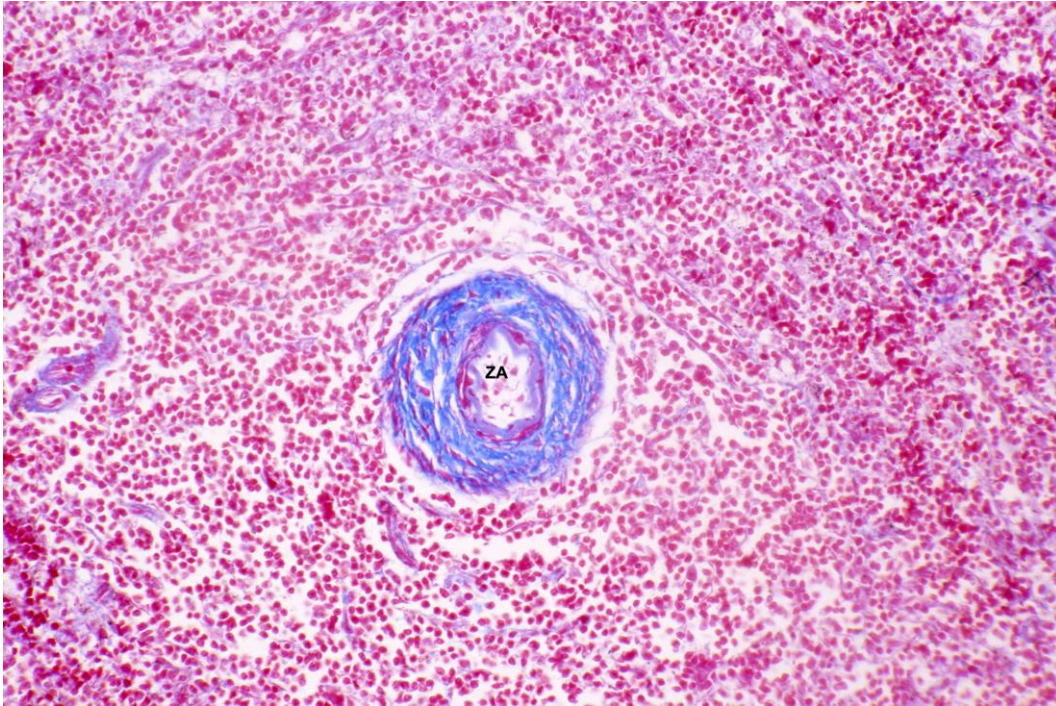


Abb. 13: Milz, erwachsener Mensch, Zentralarterie (ZA), Azanfärbung, Vergr. 250-fach

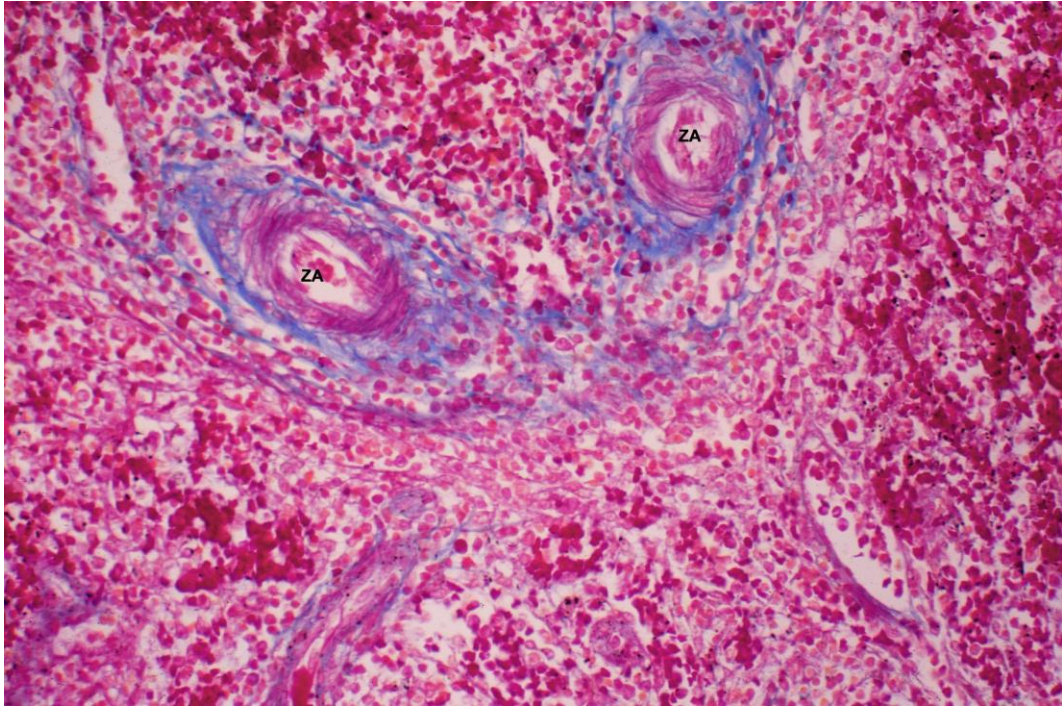


Abb. 14: Milz, Kind, Zentralarterie (ZA), Azanfärbung, Vergr. 250-fach

3.1.2.5 Pinselarteriolen

Häufig spalten sich die Zentralarterien in ca. 15 Pinselarteriolen auf (Abb. 15, 16). Diese Arteriolen besitzen eine Schicht glatter Muskulatur und werden von einer relativ kräftigen Adventitia umhüllt.

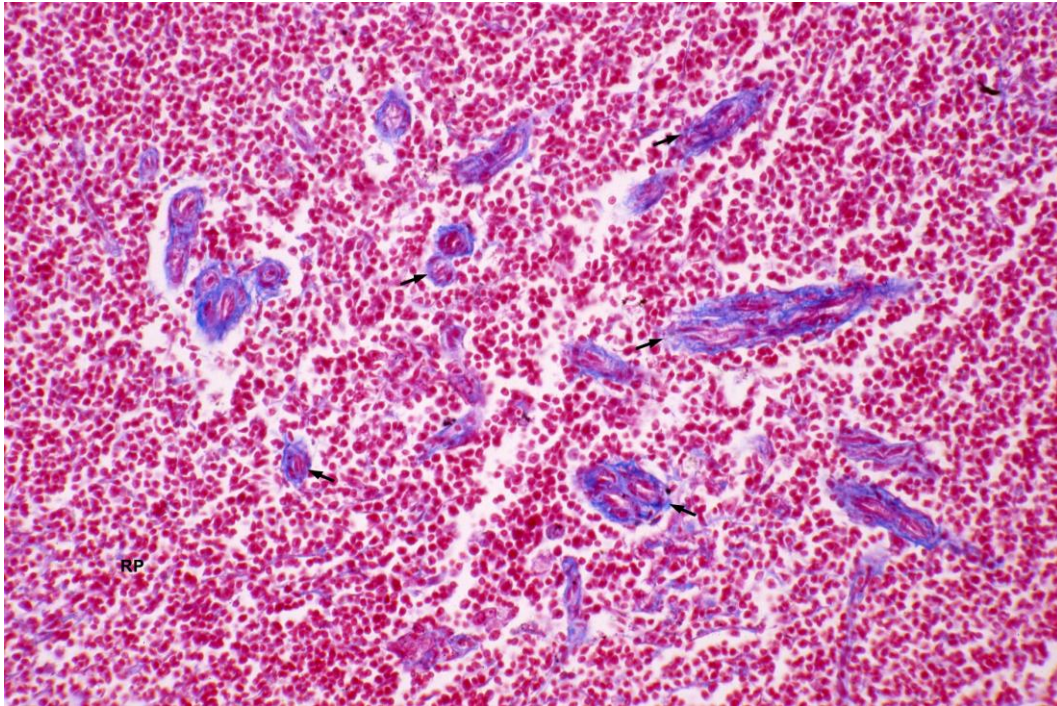


Abb. 15: Milz, erwachsener Mensch, Pinselarteriolen (Pfeile), quer angeschnitten, rote Pulpa (RP), Azanfärbung, Vergr. 110-fach

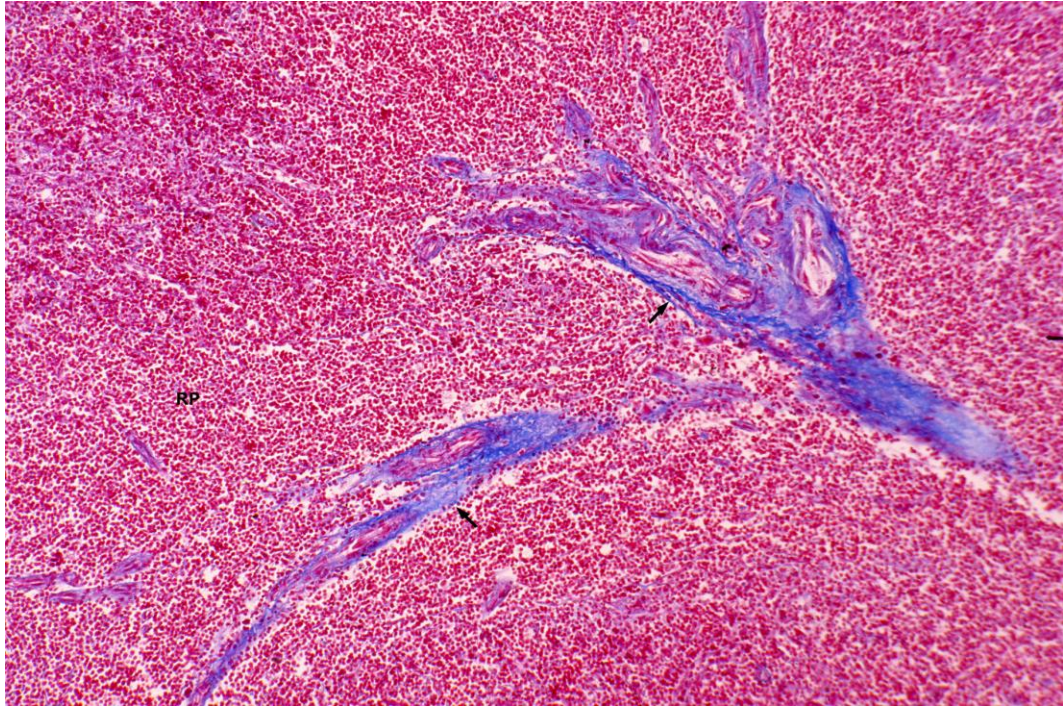


Abb. 16: Milz, erwachsener Mensch, Pinselarteriolen (Pfeile) längs angeschnitten, rote Pulpa (RP), Azanfärbung, Vergr. 110-fach

3.1.2.6 Hülsenkapillaren

Im Anschluss an die Pinselarteriolen entstehen Kapillaren, die z.T. von einer kleinen Hülse (Bargmann 1977) umgeben werden. Diese Hülse kann mittels der Azanfärbung dargestellt werden. Die Kollagenfasern umschließen die kleinen Gefäße meist in 2 oder 3 Lagen. Mitunter ist erkennbar, dass auch kleine Arteriolen eine Hülse haben.

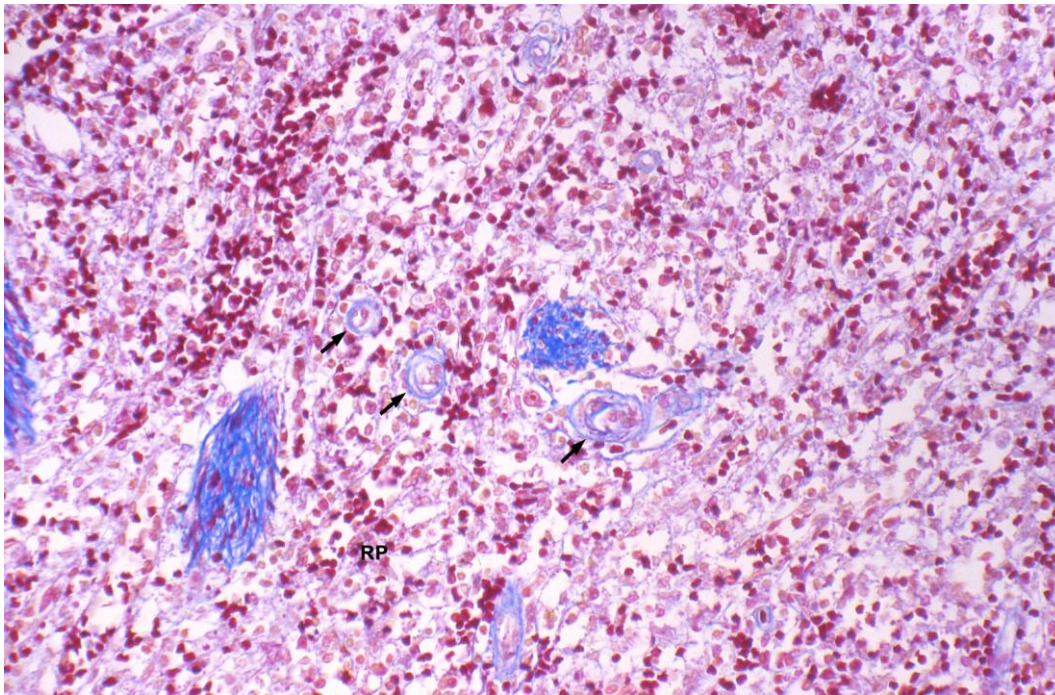


Abb. 17: Milz, erwachsener Mensch, Hülsenkapillaren (Pfeile) , rote Pulpa (RP), Azanfärbung, Vergr. 250-fach

Beim Präparat Abb. 18 der Kindermilz liegen wahrscheinlich überwiegend Pinselarteriolen vor, unter Umständen treten auch einzelne Hülsenkapillaren auf.

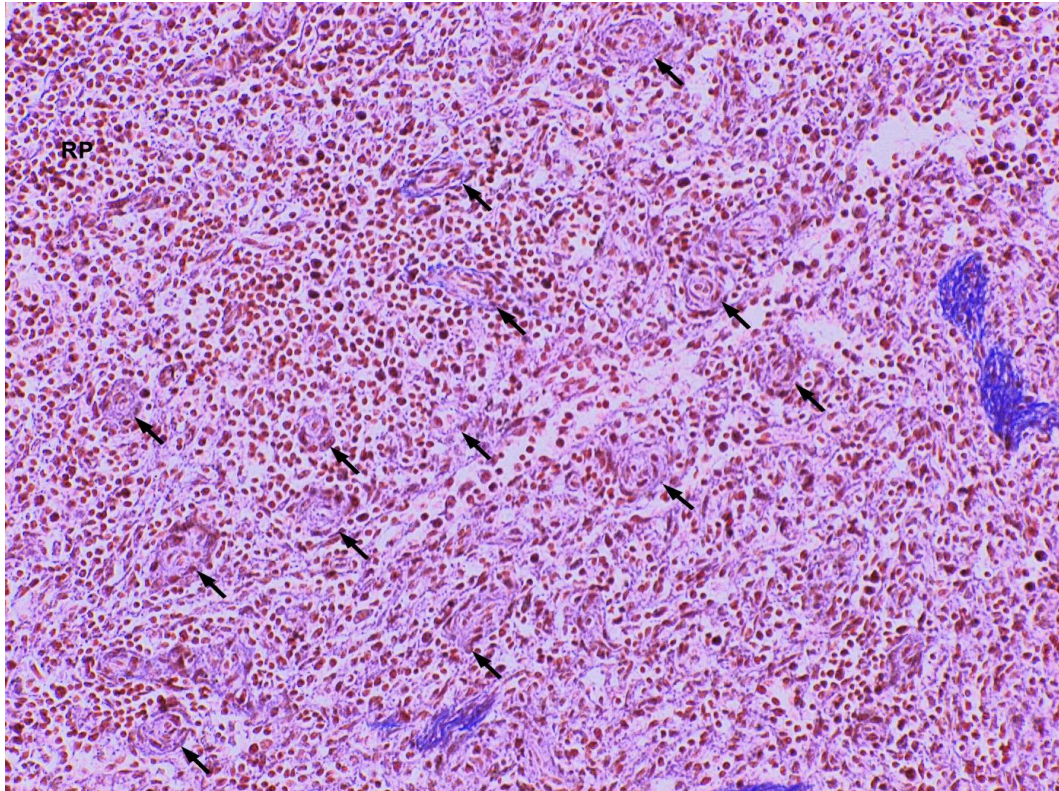


Abb. 18: Milz, Kind, Pinselarteriolen (Pfeile), Azanfärbung, Vergr. 110-fach

3.1.2.7 Trabekel- und Pulpavene

Trabekel bestehen aus kräftigen Kollagenfasern und glatten Muskelzellen. Sie umgeben auf Abb.19 vollständig eine weitlumige Trabekel- oder Balkenarterie (TA), welche glatte, muskuläre Zellen in ihrer Wand aufweist. Ihr gegenübergestellt ist die Trabekel- oder auch Balkenvene (TV). Man sieht auf Abb. 19 den Übergang der von der roten Pulpa umschlossenen Pulpavene zur Trabekelvene.

Das Blut fließt aus der Sinus (s.u.) in die Pulpavenen und von dort über die Balkenvenen in die V. lienalis.

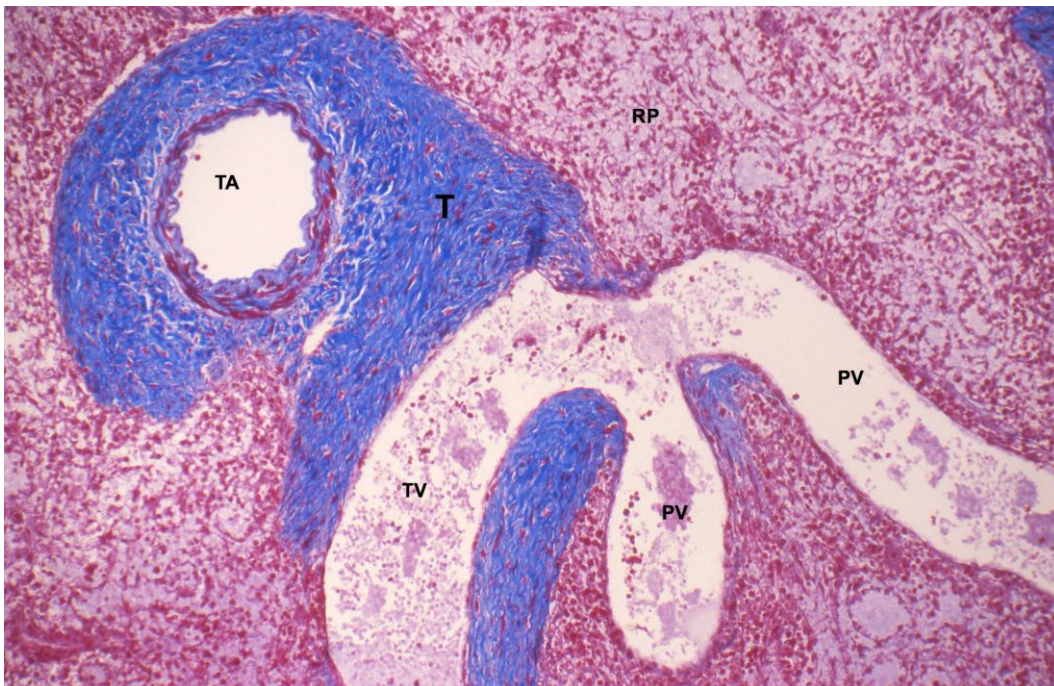


Abb. 19: Milz, erwachsener Mensch, Trabekel mit Pulpavene (PV), Trabekelarterie (TA), Trabekel (T), Trabekelvene (TV), Pulpavene (PV), rote Pulpa (RP); Azanfärbung, Vergr. 110-fach

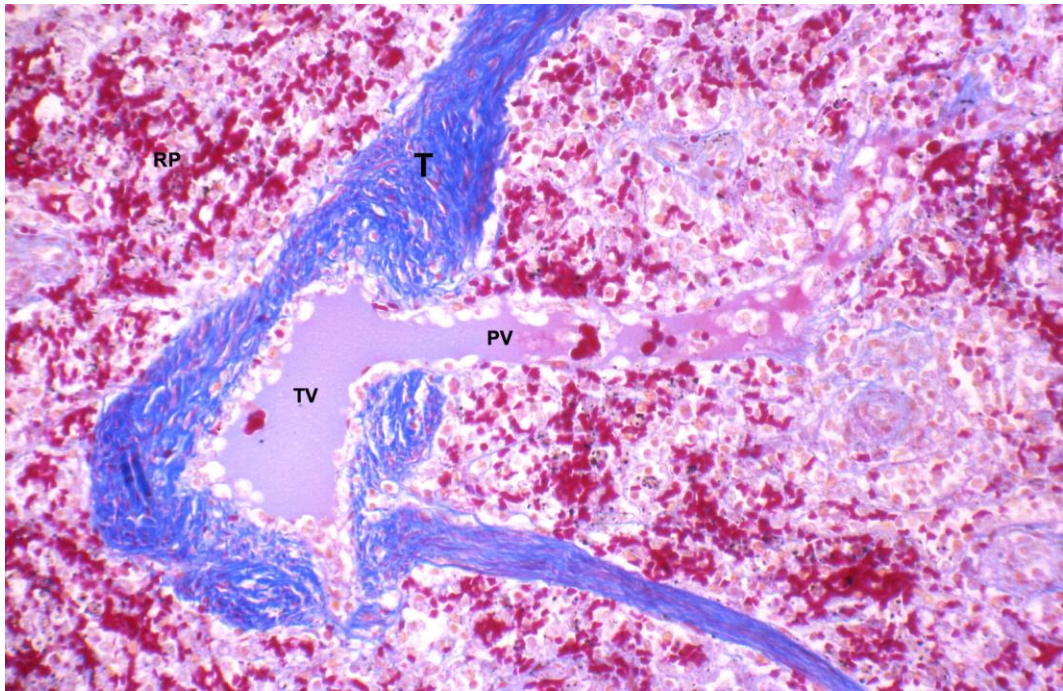


Abb. 20: Milz, Kind, Trabekel (T) mit Pulpavene (PV), Trabekelvene (TV), rote Pulpa (RP); Azanfärbung, Vergr. 110-fach

3.1.2.8 Milzsinus

Im zellreichen Areal der roten Pulpa der Milz des Erwachsenen zeigen sich zahlreiche weite Milzsinus, deren Durchmesser variabel ist; neben weiten kommen auch enge Querschnittsfiguren vor. In ihrem Lumen und in ihrer Umgebung befinden sich Erythrozyten, so dass sie manchmal schwer zu erkennen sind. Die Sinuswände zeigen außen eine zarte hellblaue Färbung im Azanpräparat, welche auf die Anwesenheit von retikulären Fasern hinweist. Das Endothel ist hell und im Querschnitt durch die Sinus fast kubisch. Im Längs- oder Flachschnitt ist erkennbar, dass die Endothelzellen längsgestreckt sind und stabförmig aussehen.

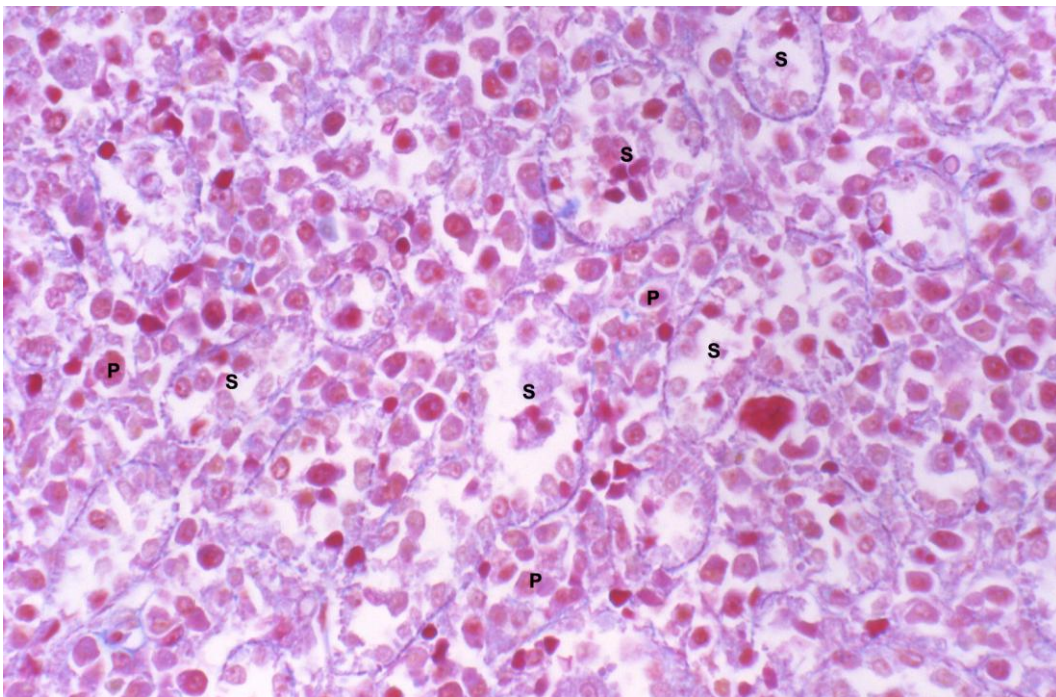


Abb. 21: Milz, erwachsener Mensch, Sinus (S) in der roten Pulpa, Pulpastränge (P), H.E- Färbung, Vergr. 450-fach

3.1.3 Befunde des Silberimprägnationsverfahrens nach Gomori

3.1.3.1 Übersicht

Die Versilberung nach Gomori bestätigt die mit der H.E.- und der Azanfärbung erhobenen Befunde. Sie zeigt aber deutlicher die Verteilung von retikulären Fasern und Kollagenfasern. Die retikulären Fasern sind schwarz und die typischen Kollagenfasern sind rotbraun gefärbt.

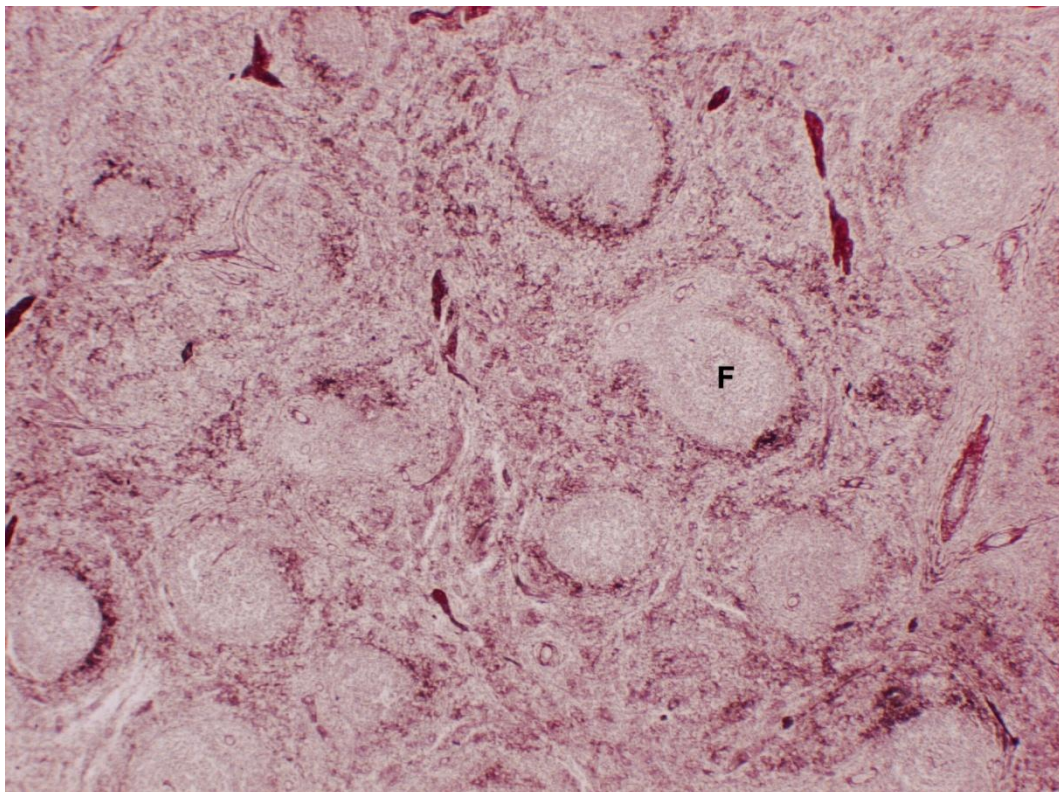


Abb. 22: Milz, Kind (mit Hepatitis C), Follikel (F), Silberimprägnation nach Gomori, Vergr. 20-fach

3.1.3.2 Kapsel und Trabekel

Die Silberimprägnation nach Gomori eignet sich besonders gut, um retikuläre Fasern in der Milz aufzuzeigen. Durch die Imprägnation mit Silbersalzen werden diese Faseranteile tiefschwarz dargestellt.

Kollagenfasern vom Typ I sind nach der Versilberung nach Gomori kräftig tiefbraun gefärbt. In diesem Farbton zeigen sich die Kollagenfasern der Kapsel (Abb. 23, 24) und der Trabekel (Abb. 25, 26). Bei Betrachtung der Kapsel wird eine schichtende Anordnung der rotbraun angefärbten Fasern deutlich. Die oberste Grenzschicht ist dünn und besteht aus feinen parallelen Fasern. Es folgt im Anschluss eine lockere Schicht aus unregelmäßig angeordneten Fasern. Innerhalb der nächsten und breitesten Schicht der Kapsel liegen große Bündel an Kollagenfasern. Die Wellung der kollagenen Fasern ist wechselnd stark ausgeprägt. Teilweise liegen sie auch geradlinig parallel. Im Übergang zur roten Pulpa wird wiederum eine Schicht mit feinen Kollagenfasern deutlich. Die rotbraunen Kollagenfasern vom Typ I durchmischen sich mit den fein schwarz angefärbten retikulären Fasern, die mit dem retikulären Netz innerhalb der roten Pulpa, welches auch aus Kollagen vom Typ I und III aufgebaut ist, verknüpft sind.

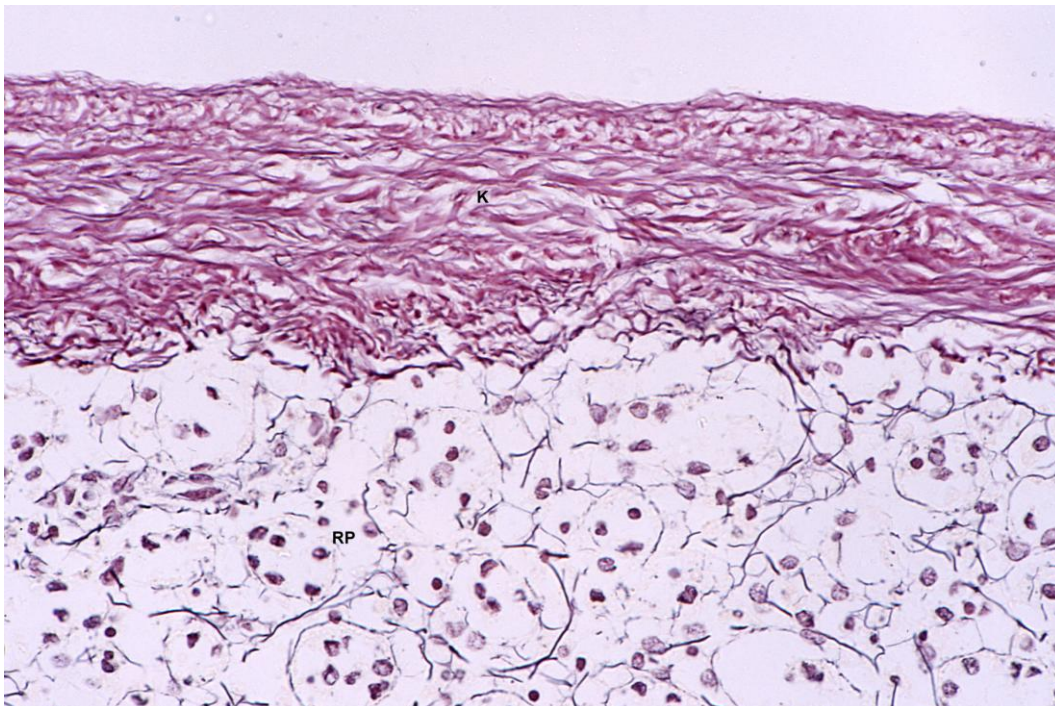


Abb. 23: Milz, erwachsener Mensch, Kapsel (K), rote Pulpa (RP), Silberimprägnation nach Gomori, Vergr. 250-fach

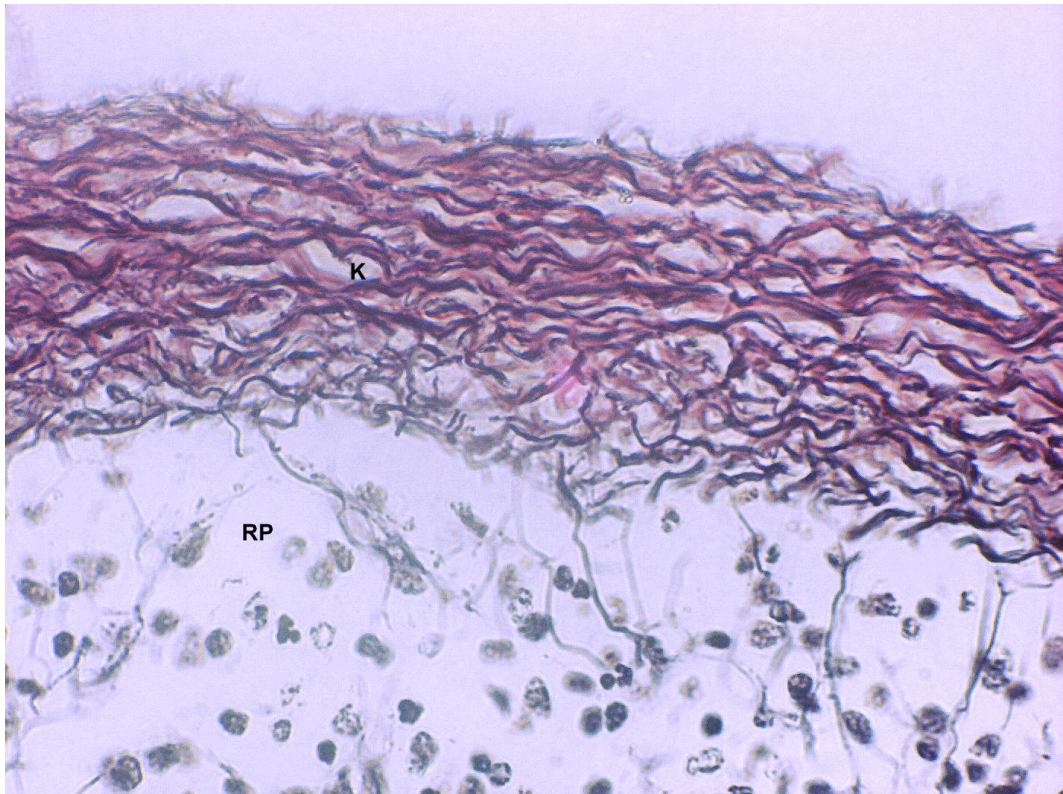


Abb. 24: Milz, Kind, Kapsel (K), rote Pulpa (RP), Silberimprägnation nach Gomori, Vergr. 450-fach

Die Silberimprägnation nach Gomori bringt verschiedene Feinstrukturen im Kapsel- und Trabekelwerk zur Darstellung. Die rot markierten Kollagenfasern des Typ I haben Wellenstruktur, sie sind bündelweise und parallel zueinander angeordnet. Die miteinander vernetzten retikulären Fasern in der Kapsel und in der roten Pulpa sind intensiv schwarz gefärbt. Sie sind aus dem Kollagentyp III aufgebaut.

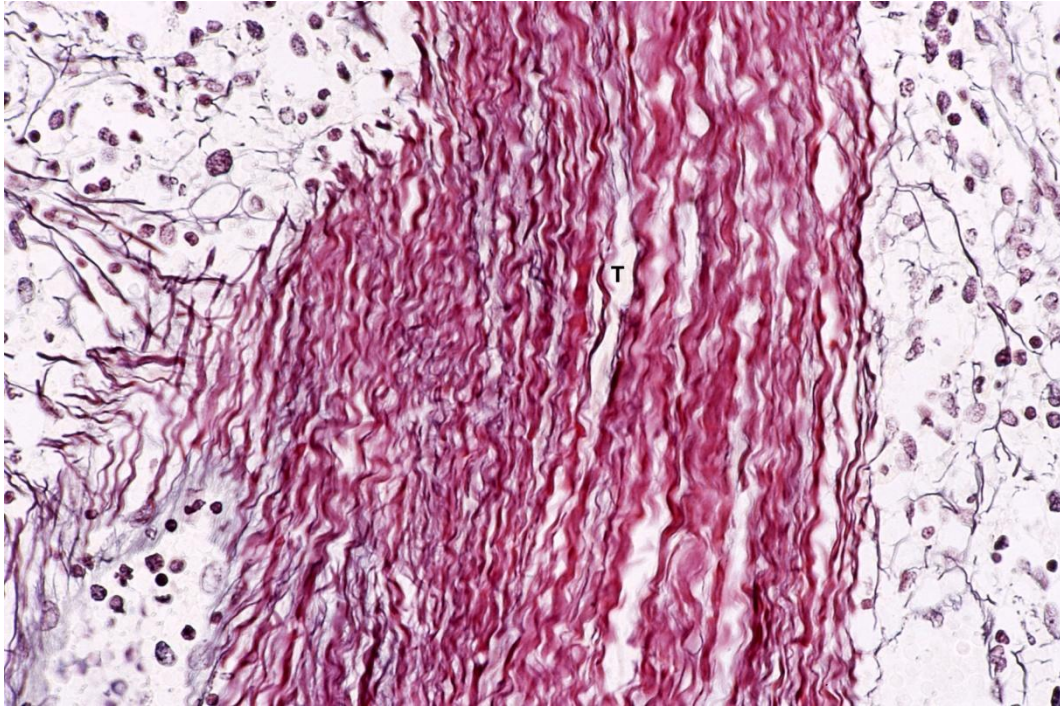


Abb. 25: Milz, erwachsener Mensch, Trabekel (T), Silberimprägnation nach Gomori, Vergr. 450-fach

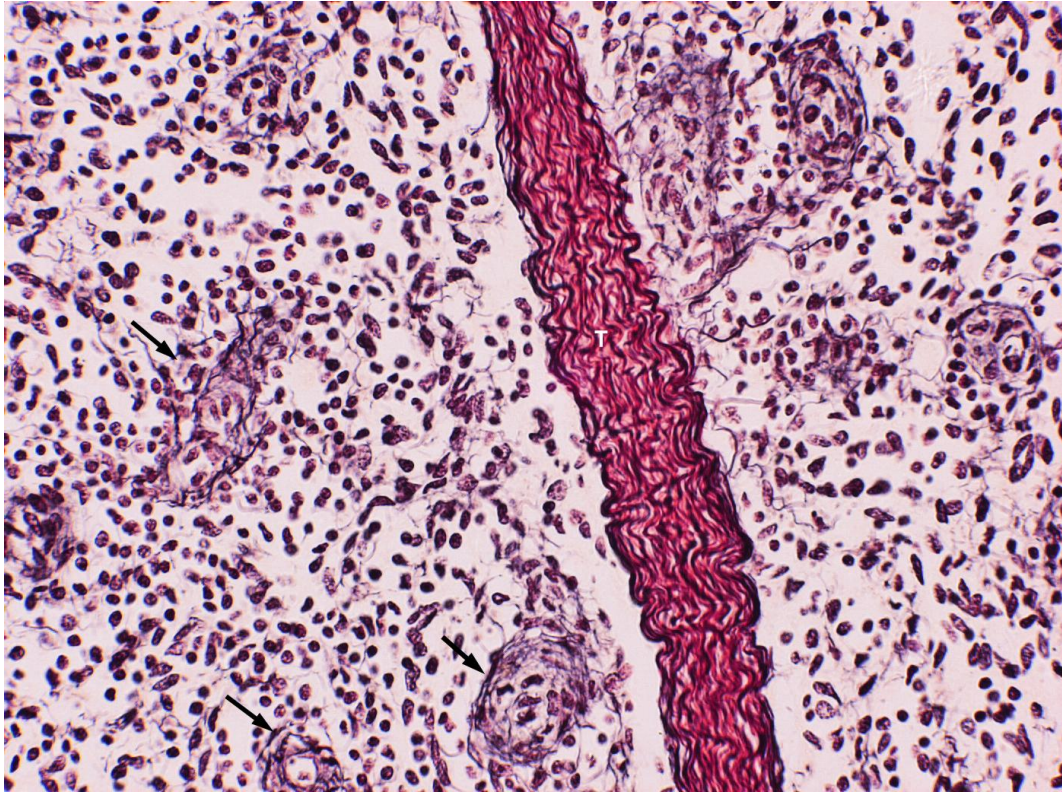


Abb. 26: Milz, Kind, Trabekel (T), Arteriolen (Pfeile), Silberimprägnation nach Gomori, Vergr. 220-fach

3.1.3.3 Rote Pulpa

In der roten Pulpa sind retikuläre Fasern weit verbreitet und bilden hier ein vernetztes Grundgerüst. Sie sind aus dem Kollagentyp III aufgebaut. Deutlich zu erkennen ist der Verlauf der Pulpastränge. Das weitmaschige Netzwerk der Retikulumzellen und der retikulären Fasern ist die Hauptkomponente des Bindegewebes der roten Pulpa. Retikuläre Fasern umgeben auch reifenartig die Sinus (Abb. 27, 28).

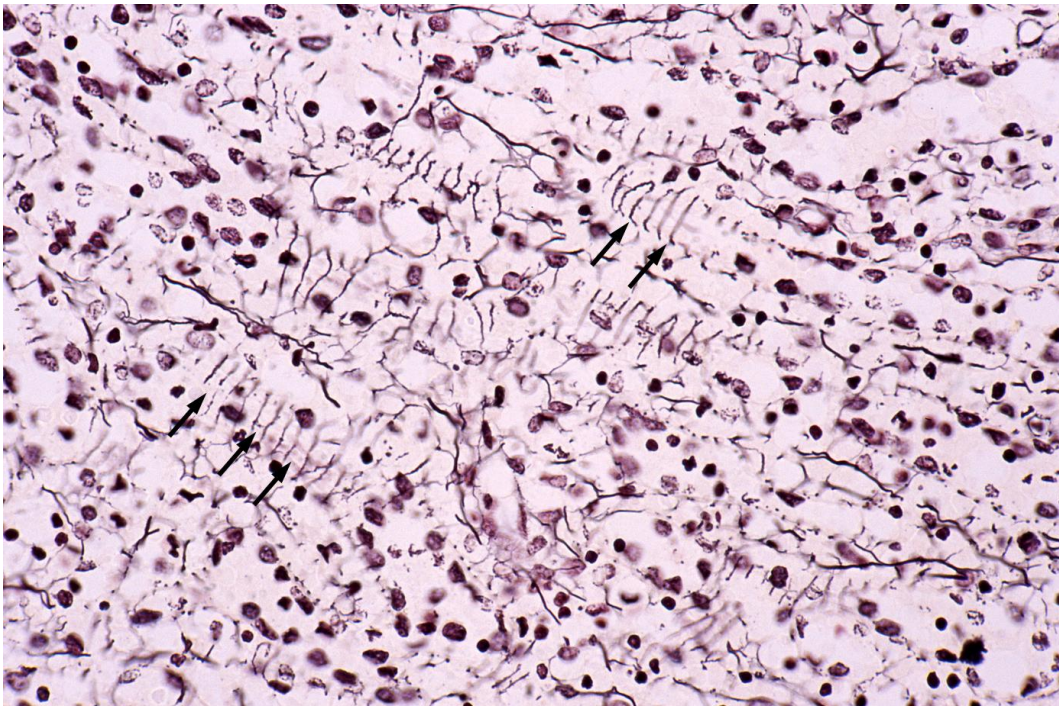


Abb. 27: Milz, erwachsener Mensch, rote Pulpa, Reifefasern (Pfeile), Silberimprägnation nach Gomori, Vergr. 450-fach

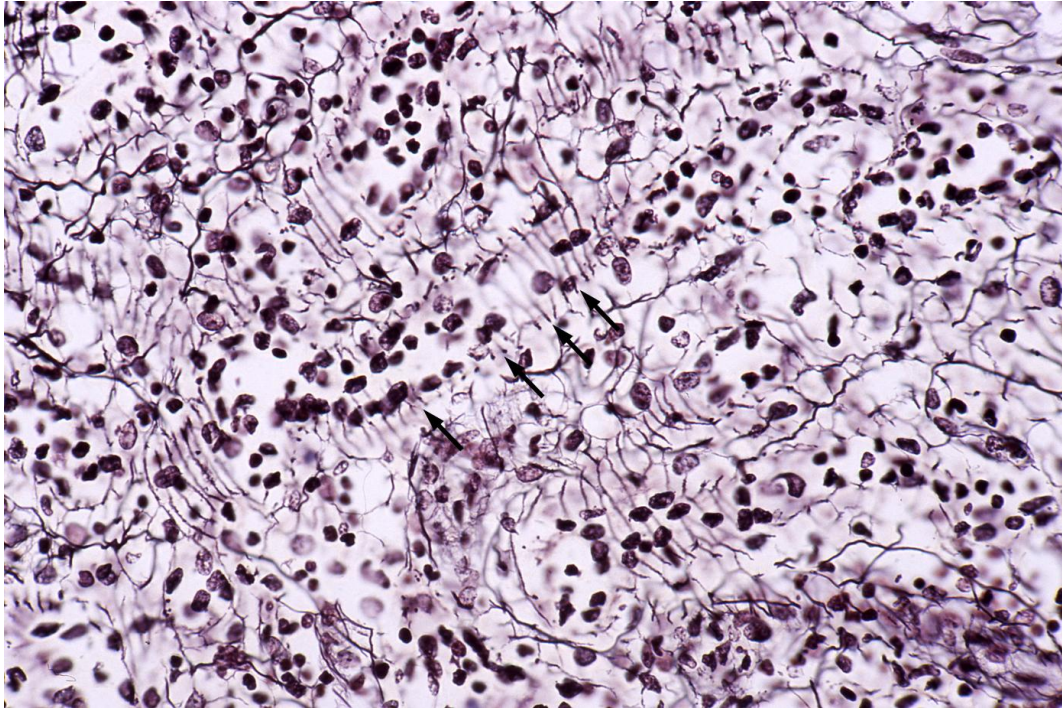


Abb. 28: Milz, Kind, rote Pulpa, Sinus mit Reifenfasern (Pfeile), Silberimprägnation nach Gomori, Vergr. 450-fach

3.1.3.4 Trabekelarterie

Der Trabekelarterienquerschnitt demonstriert wie bei der Azanfärbung die typische Wandschichtung einer Arterie vom muskulären Typ:

Intima

Media (retikuläre Fasern schwarz)

Äußere, bindegewebige Adventitia (Kollagenfasern rotbraun)

Umgeben wird die Trabekelarterie von groben rotbraunen kollagenen Fasern der Milztrabekel.

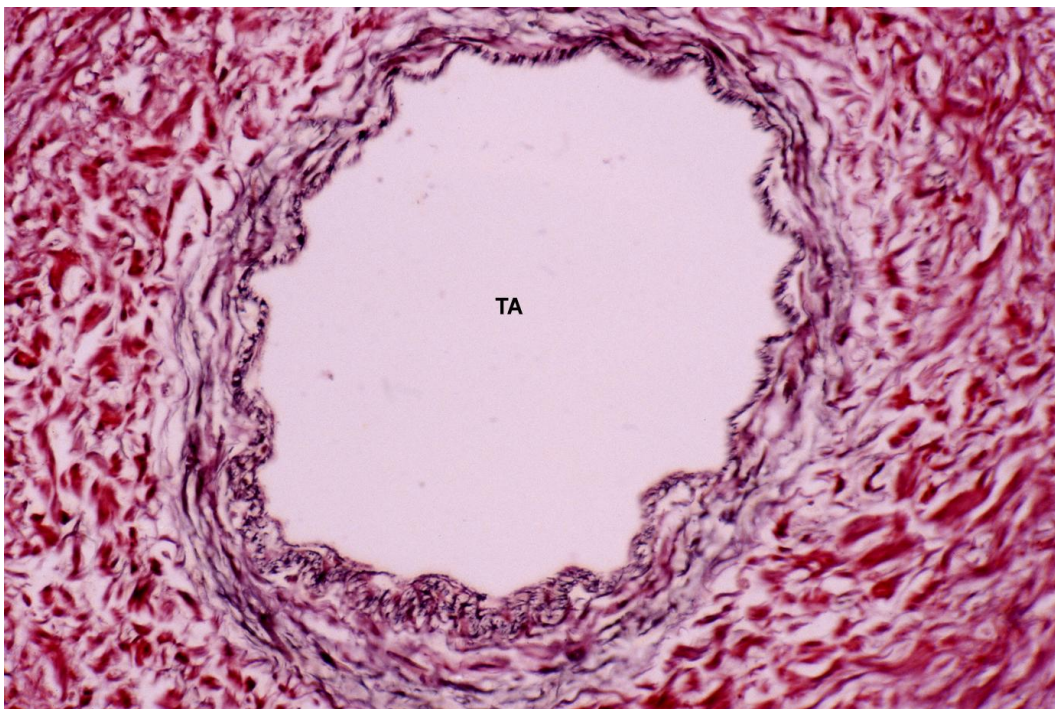


Abb. 29: Milz, erwachsener Mensch, Trabekelarterie (TA), Silberimprägnation nach Gomori, Vergr. 450-fach

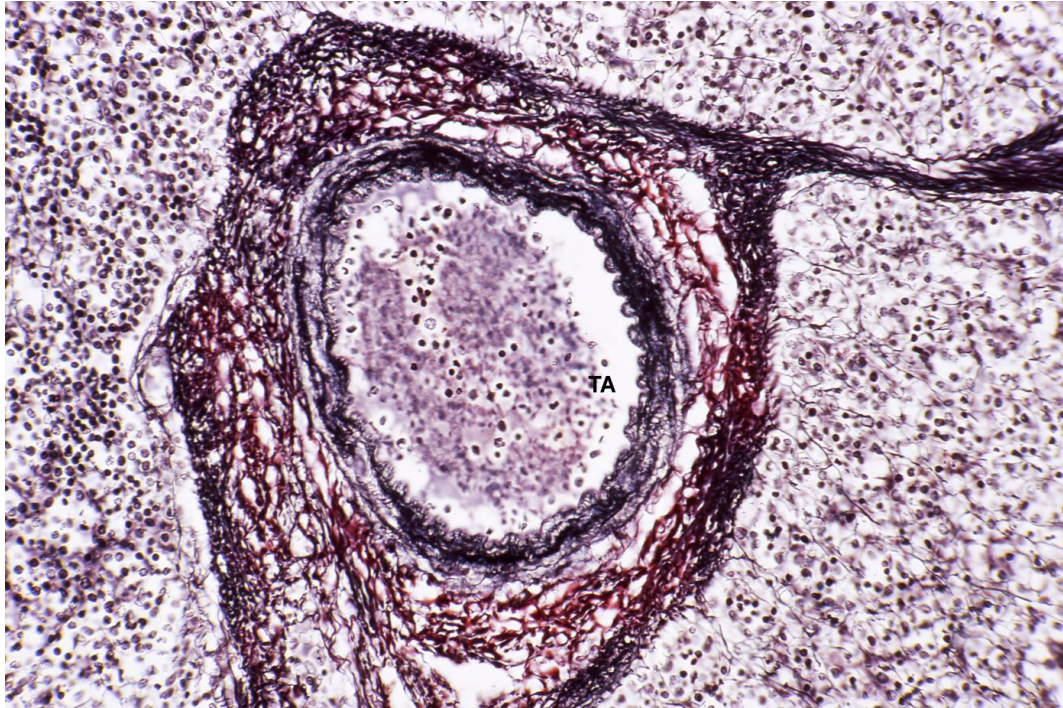


Abb. 30: Milz, Kind, Trabekelarterie (TA), Silberimprägnation nach Gomori, Vergr. 220-fach

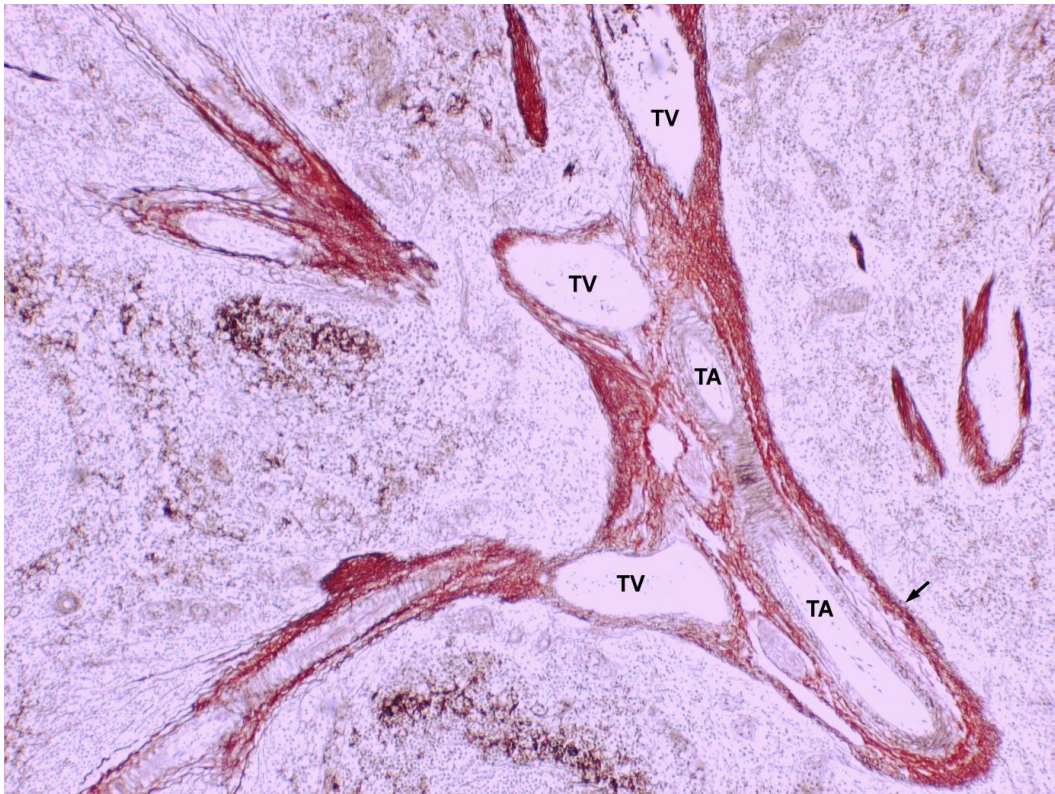


Abb. 31: Milz, Kind, Trabekel, Silberimprägnation nach Gomori, Vergr. 110-fach

In diesem Trabekel sind mehrere Blutgefäße enthalten. Darin befinden sich Trabekelarterien (TA) und Trabekelvenen (TV). Letztere sind im Wandaufbau viel dünner und lockerer aufgebaut als die Arterien.

3.1.3.5 Hülsenkapillaren

In der Versilberung nach Gomori sind relativ selten kleine Gefäße mit zwei oder drei Lagen retikulärer Fasern zu erkennen. Die feinen retikulären Fasern umschließen das zentrale Gefäß in mehreren Lagen. Sie gehören zur Schweigger-Seidelschen Hülse. Öfter ist erkennbar, dass nicht nur Kapillaren eine Hülse besitzen, sondern auch Arteriolen (Abb. 33).

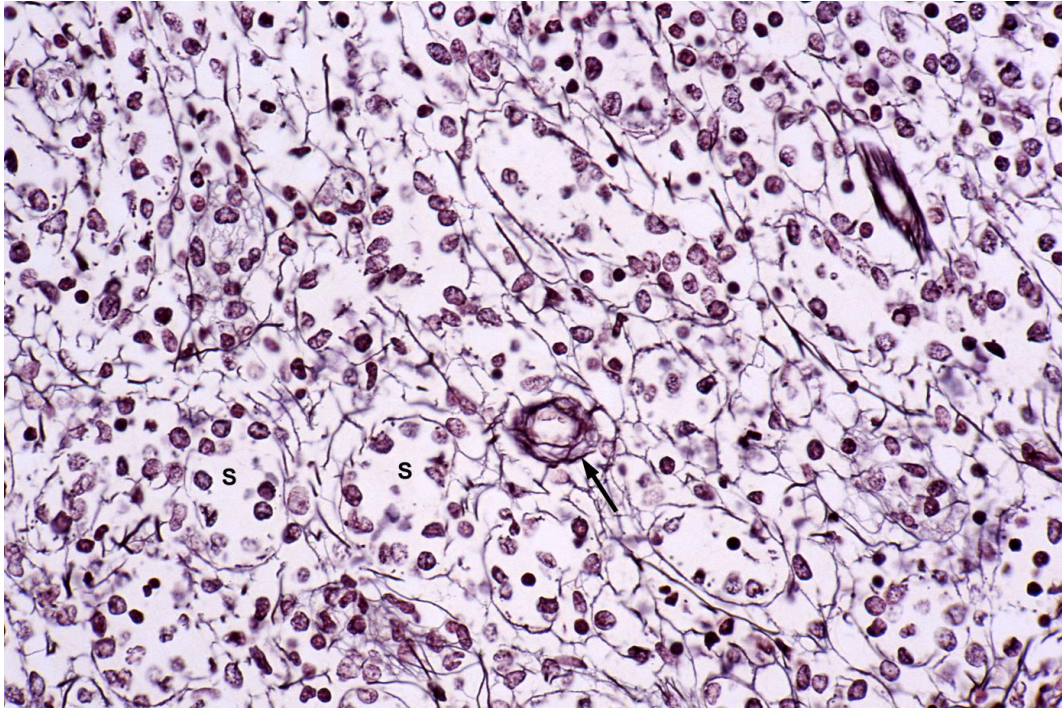


Abb. 32: Milz, erwachsener Mensch, Pfeil zeigt auf vermutliche Hülsenkapillare, Sinus (S), Silberimprägnation nach Gomori, Vergr. 450-fach

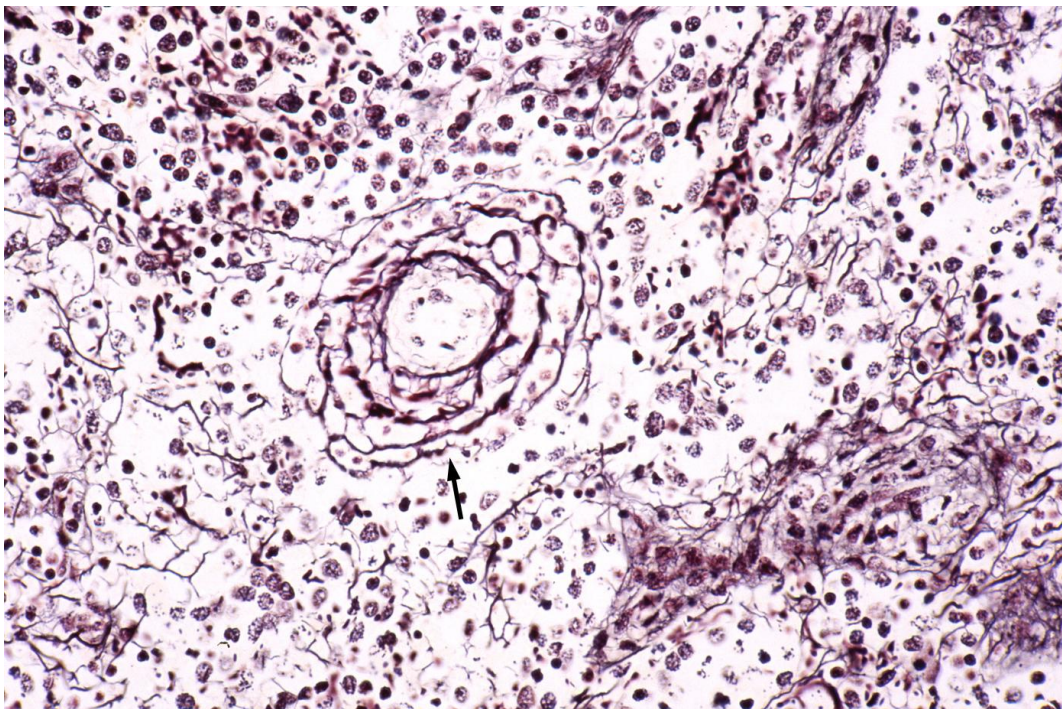


Abb. 33: Milz, Kind, Pfeil zeigt auf Arteriole mit Hülle, Silberimprägnation nach Gomori, Vergr. 450-fach

3.2 Befunde der histochemischen Reaktion mit Aldehydfuchsin

Aldehydfuchsin hebt in der Milz elastische Fasern unterschiedlichen Kalibers hervor. Diese finden sich vor allem in Kapsel und Trabekel und arteriellen Blutgefäßen. In der roten Pulpa kommen elastische Fasern nicht vor.

3.2.1 Kapsel und Trabekel

Die Aldehydfuchsinfärbung (AF) eignet sich gut, feine elastische Faserstrukturen des Kapsel- und Trabekelwerks sichtbar zu machen. Aldehydfuchsin färbt grobe und feine elastische Fasern violett an (Abb. 34, 35).

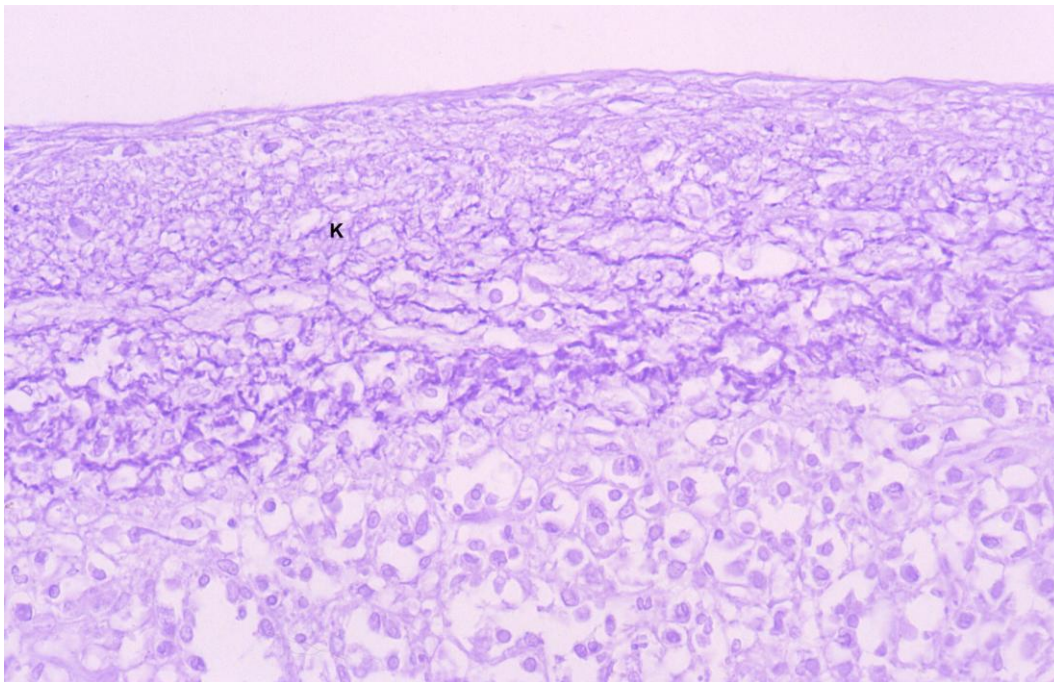


Abb. 34: Milz, erwachsener Mensch, Kapsel (K) mit elastischen Fasern (lila), Aldehydfuchsin, Vergr. 450-fach

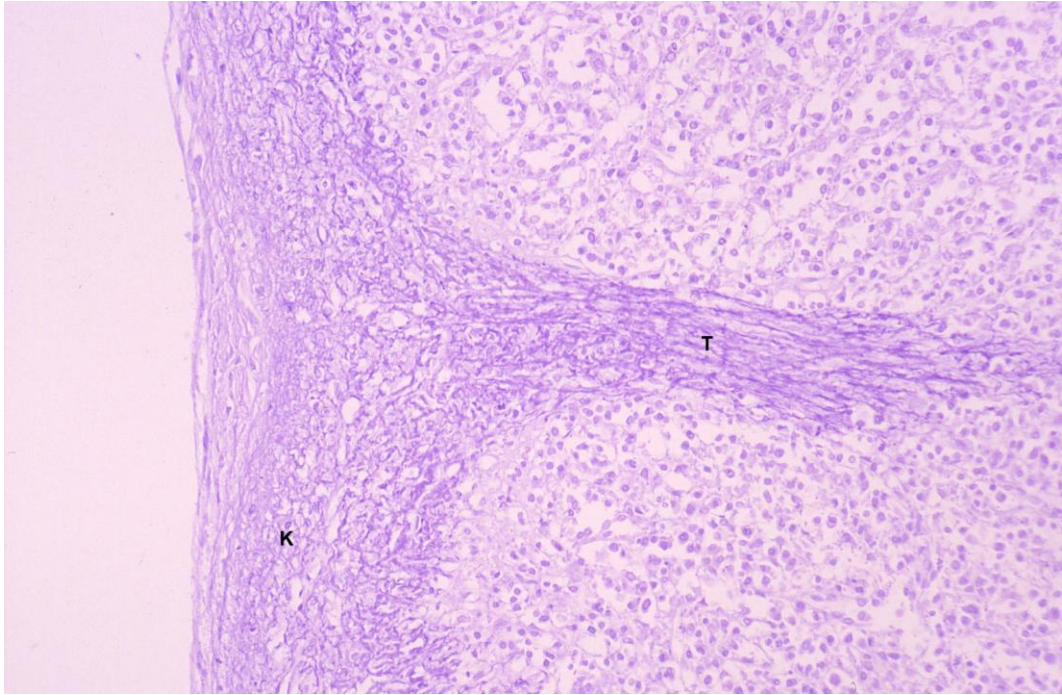


Abb. 35: Milz, erwachsener Mensch, Kapsel (K) und Trabekel (T) mit zahlreichen elastischen Fasern, Aldehydfuchsin, Vergr. 20-fach

3.2.2 Trabekelarterie

In den Blutgefäßen konnten mit Hilfe der AF auch elastische Bestandteile in ihrer Wand nachgewiesen werden.

Der Trabekelarterienquerschnitt demonstriert die typische Wandschichtung einer muskulären Arterie:

Intima (mit intensiv violetter Elastica interna)

Media (heller Bereich mit wenigen zarten elastischen Fasern)

Äußere, bindegewebige Adventitia mit angedeuteter Elastica externa

Elastica interna und externa sind deutlich markiert.

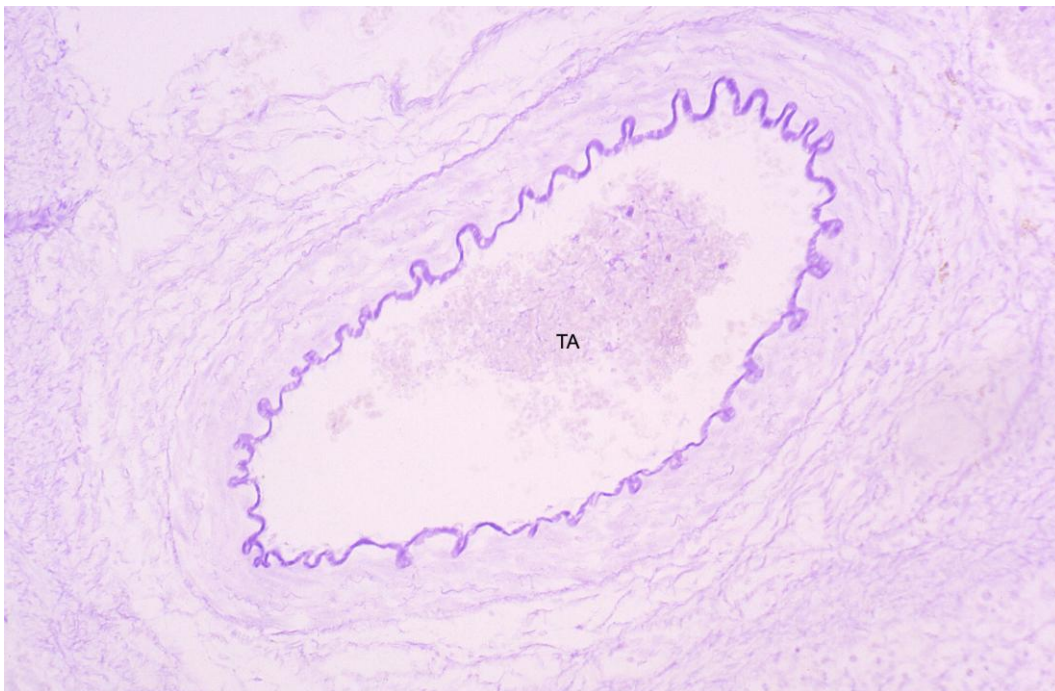


Abb. 36: Milz, erwachsener Mensch, Trabekelarterie (TA), Aldehydfuchsin, Vergr. 450-fach

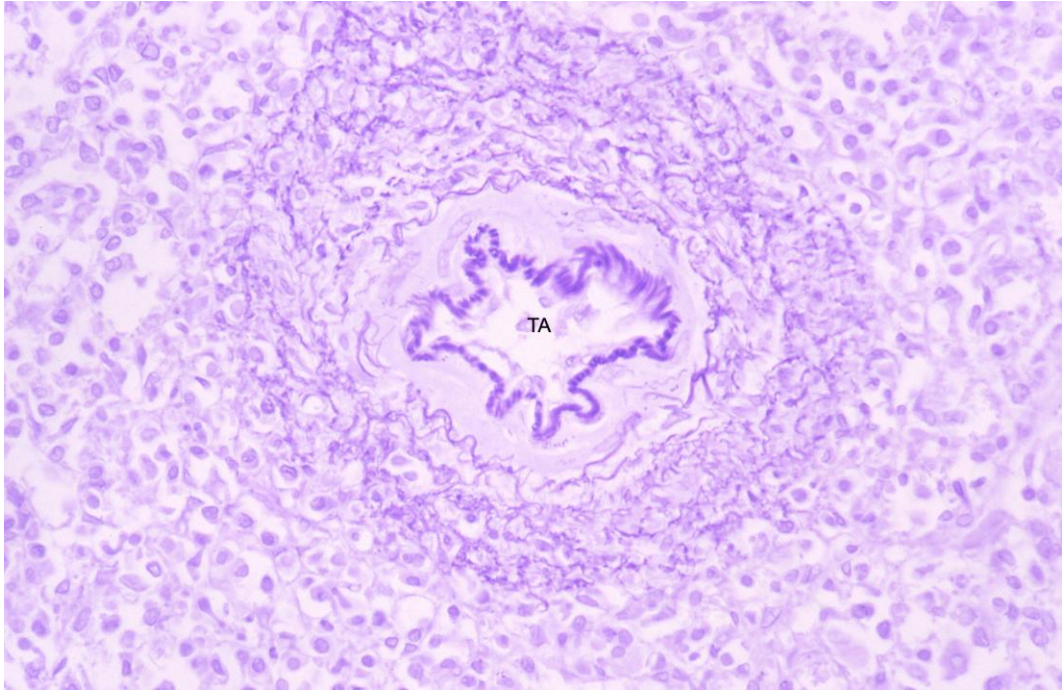


Abb. 37: Milz, erwachsener Mensch, Trabekularterie (TA), Aldehydfuchsin, Vergr. 450-fach

3.2.3 Zentralarterie, Zentralarteriole

AF markiert in der Zentralarterie die *Elastica interna* besonders kräftig; auch die *Elastica externa* ist manchmal angedeutet.

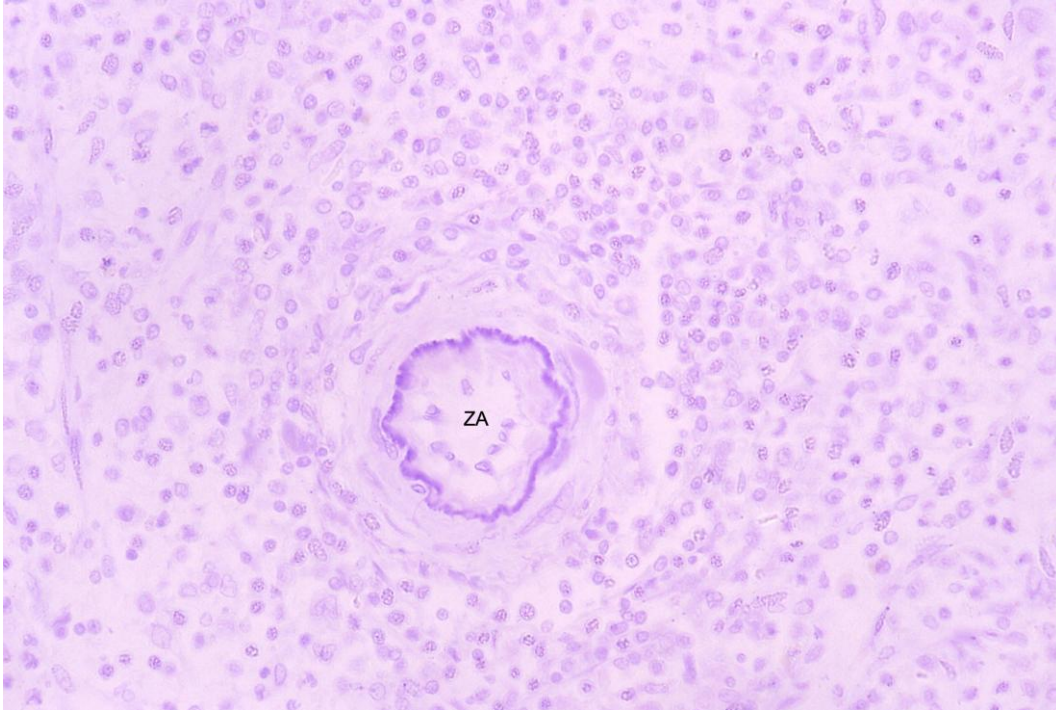


Abb. 38: Milz, erwachsener Mensch, Zentralarterie (ZA), Aldehydfuchsin, 450-fach

3.2.4 Pulpavene

AF färbt die rote Pulpa und Pulpavene unspezifisch zartviolett, elastische Fasern kommen nicht vor (Abb.39). Der Wandaufbau der Pulpavene ist dünn, eine klare Schichtung ist nicht erkennbar.

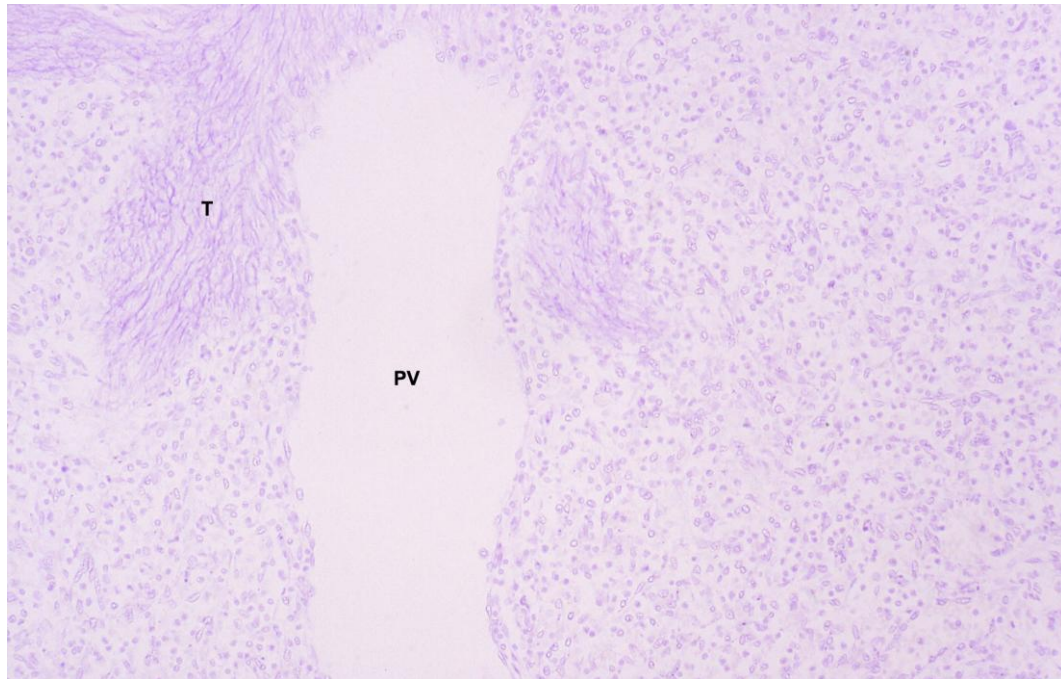


Abb. 39: Milz, erwachsener Mensch, Pulpavene (PV), Trabekel (T), Vergr. 250-fach

3.3 Befunde der immunhistochemischen Nachweise

3.3.1 Kollagen Typ I

Kollagen vom Typ I kommt in der Kapsel und in den Trabekeln vor (Abb. 40). In der Mehrzahl der Präparate kommt es in ähnlicher Menge wie Kollagen vom Typ III vor.

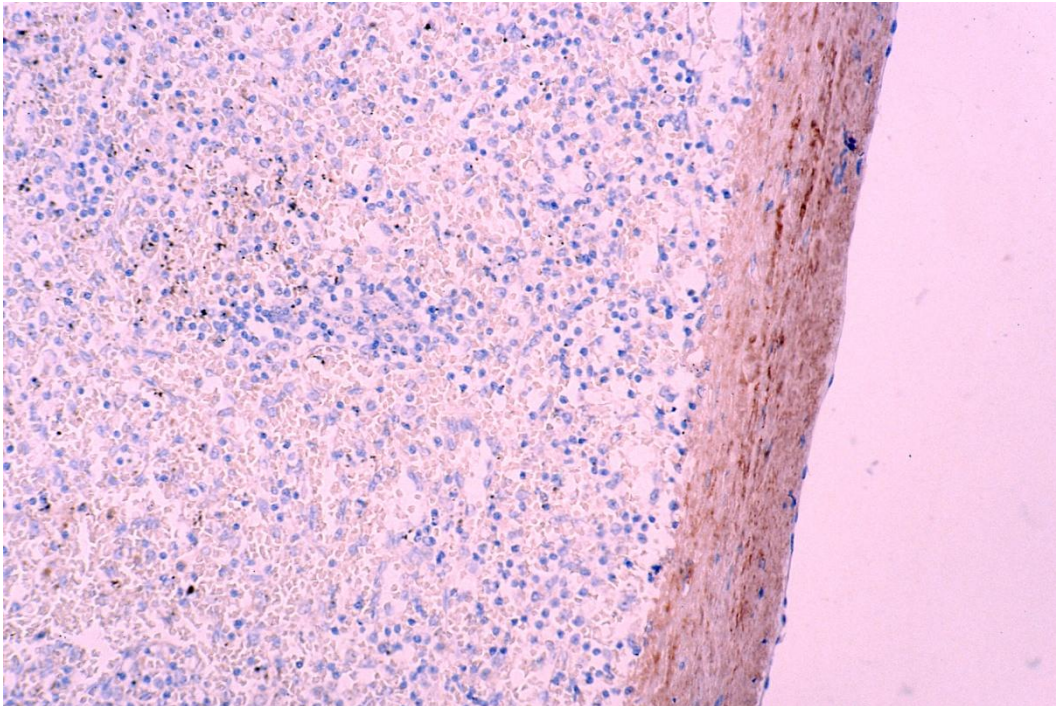


Abb. 40: Milz, erwachsener Mensch, Kollagen Typ I, Vergr. 20-fach

-

3.3.2 Kollagen Typ III

3.3.2.1 Kapsel und Trabekel

Ein Nachweis für Kollagen III konnte in der Kapsel und in den Trabekeln erbracht werden. Diesem Befund entspricht der Nachweis von retikulären Fasern in Kapsel und Trabekeln. Der immunhistochemische Nachweis erbrachte aber konsistentere Ergebnisse als die Silberimprägnation und zeigte konstant, dass Trabekel und die Kapsel zahlreiche Kollagenfibrillen vom Typ III besitzen (Abb. 41, 42).

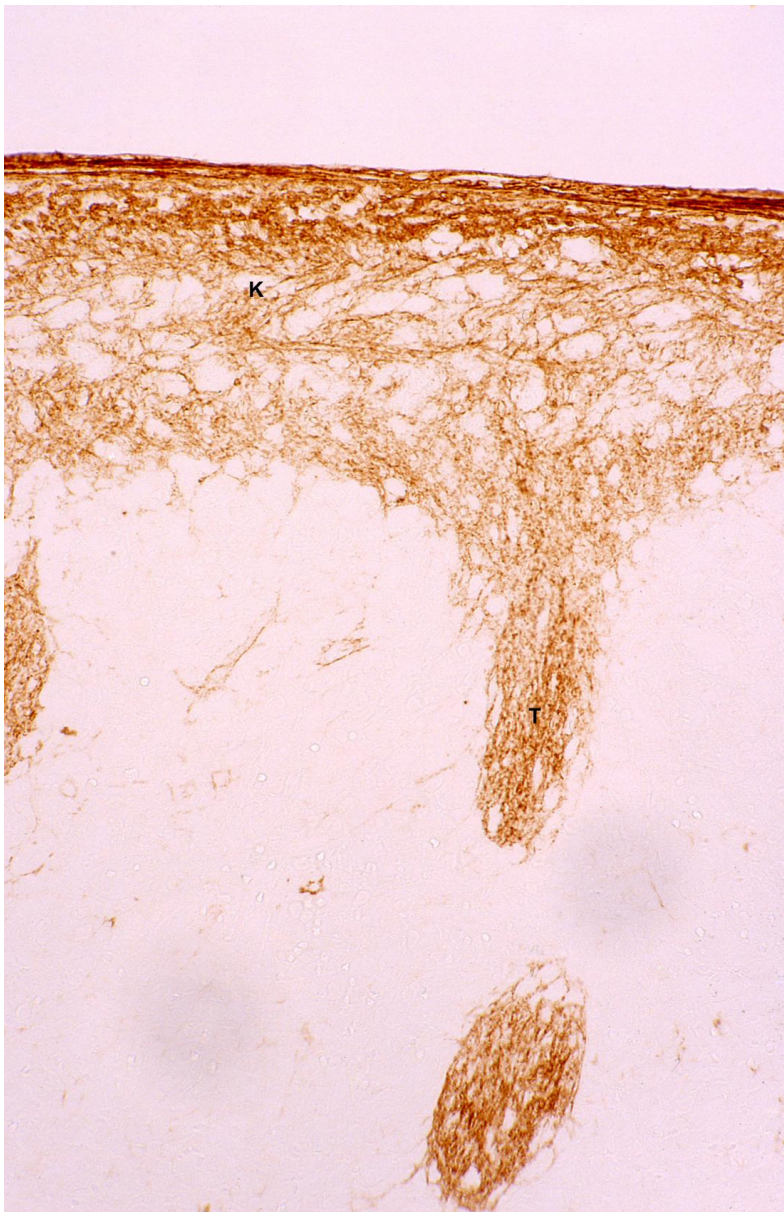


Abb. 41: Milz, erwachsener Mensch, Nachweis von Kollagen Typ III in Kapsel (K) und Trabekel (T), Vergr. 250-fach

In der Media der Trabekelarterien kommen zarte kollagen-Typ-III-positive Fasern vor. Auch die Wand der Pulpavenen enthält einzelne kollagen-Typ-III-positive Fasern.

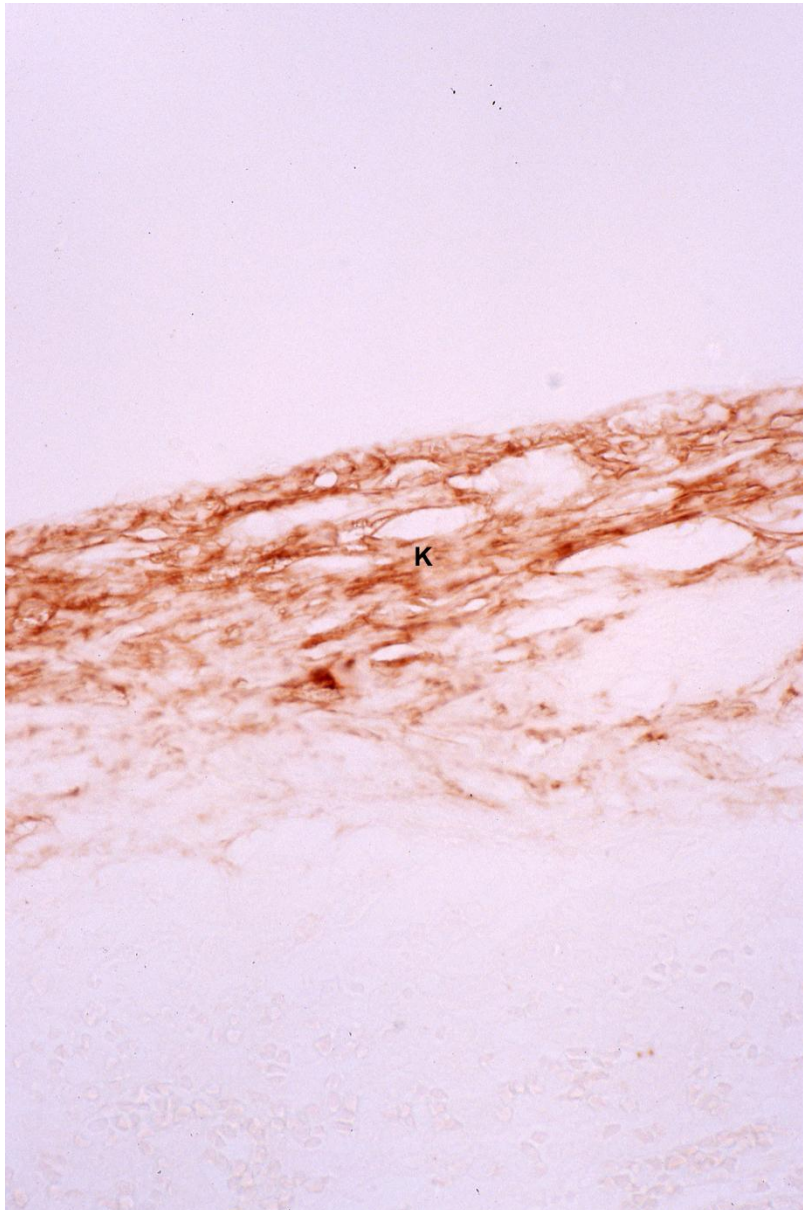


Abb. 42: Milz, Kind, Nachweis von Kapsel (K) und Kollagen Typ III, Vergr. 450-fach

3.3.2.2 PALS

Kollagen III konnte auch in der PALS nachgewiesen werden; so in der Wand der Zentralarterie der PALS. Deutlich positiv mit Kollagen Typ III reagiert auch das Bindegewebe der PALS (Abb. 43).

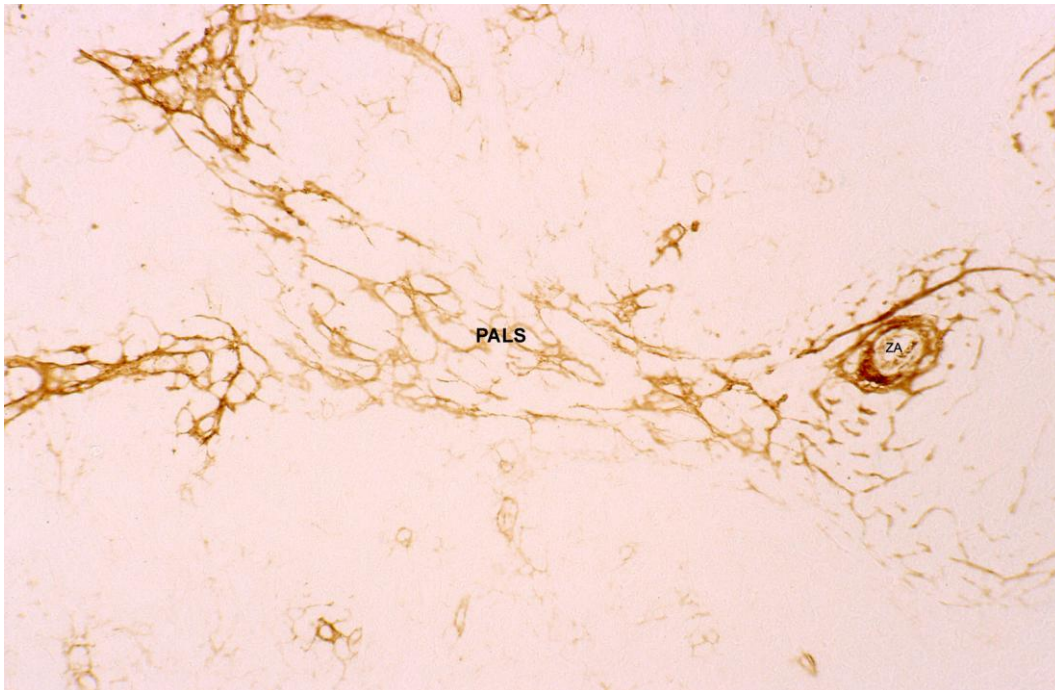


Abb. 43: Milz, erwachsener Mensch, PALS, Nachweis von Kollagen III mit Zentralarterie (ZA), Vergr. 250-fach

3.3.3 Aktin

Aktin lässt sich an vielen Stellen der Milz nachweisen, die folgende Zusammenstellung gibt eine erste Übersicht:

3.3.3.1 Übersicht

1. Kapsel und Trabekel: In diesen Strukturen der Milz sind die Zellen sehr aktinreich.
2. Blutgefäße: Die Zellen der arteriellen Gefäßwände, z.B. der Zentralarterien und -arteriolen, reagieren mit dem Aktinantikörper sehr kräftig.
3. Follikel: In der Marginalzone des Follikels reagiert der Aktinantikörper ebenfalls positiv. In diesem Teil der Milz befinden sich Myofibroblasten.
4. PALS: Die äußerste Zellschicht der PALS zeigt auch eine positive Reaktion und ist erheblich aktinhaltig. Diese Zellen gehen in die Marginalzone des Follikels über.
5. Rote Pulpa: In der roten Pulpa sind das Sinusendothel und viele fortsatzreiche Zellen, wahrscheinlich die fibroblastischen Retikulumzellen, aktinpositiv.

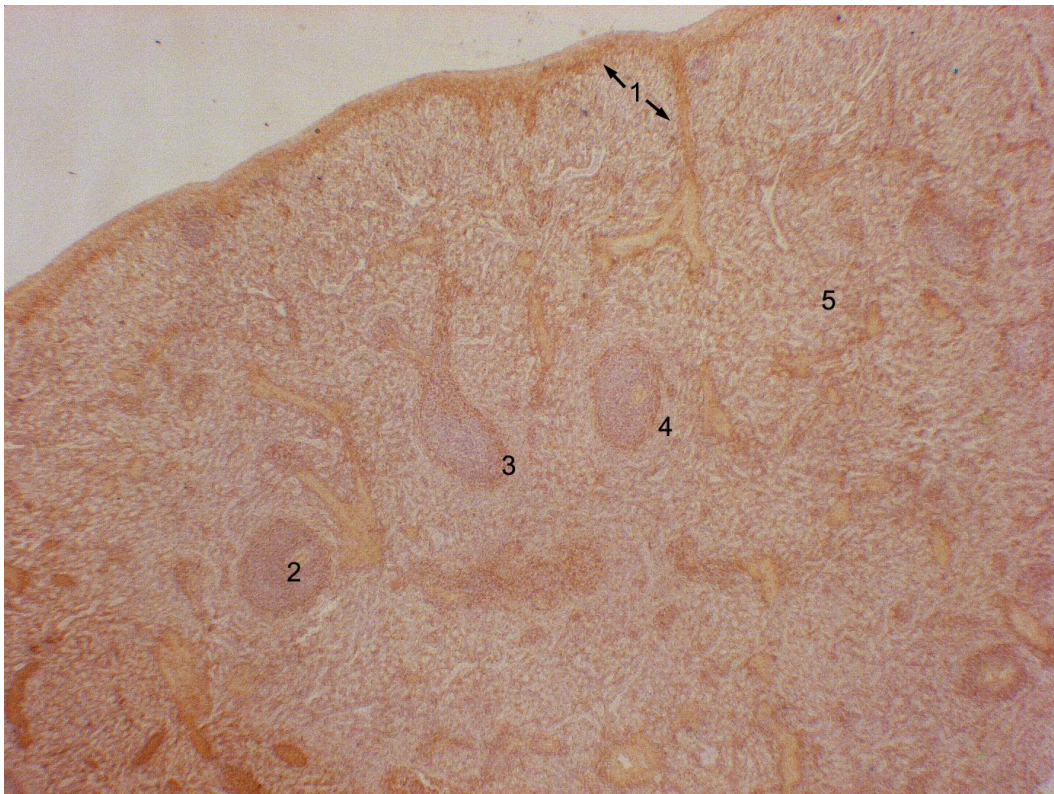


Abb. 44: Milz, erwachsener, Nachweis von Aktin in der Übersicht, Vergr. 45-fach

1 Kapsel und Trabekel, 2 Zentralarterie, 3 Marginalzone eines Follikels, 4 äußere Zellschicht der PALS, 5 rote Pulpa

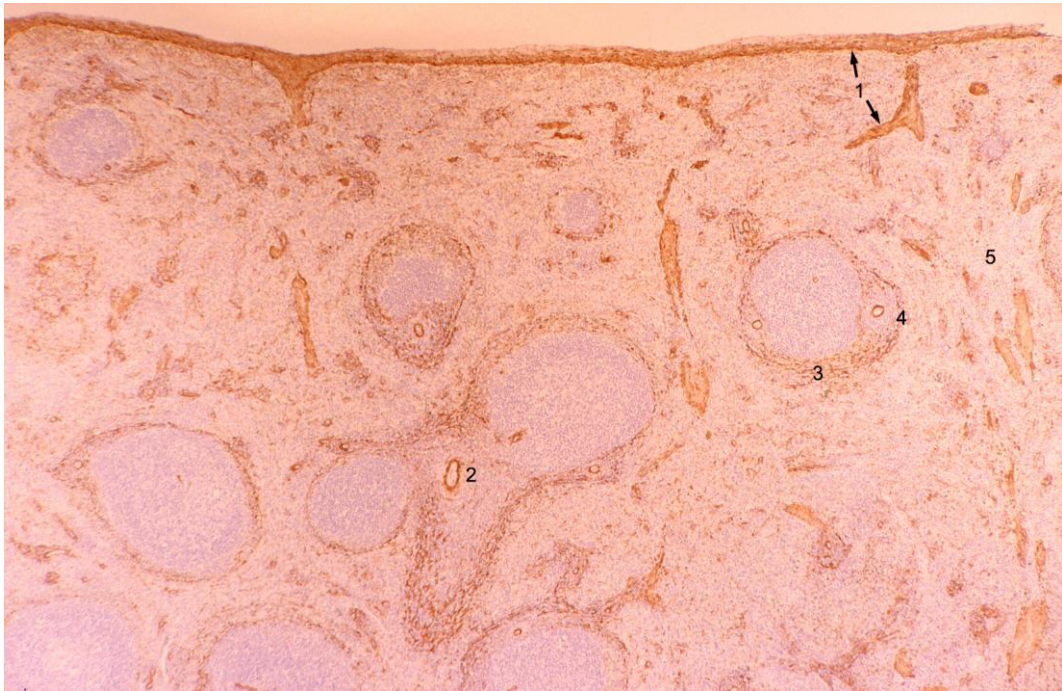


Abb. 45: Milz, Kind, Nachweis von Aktin, Vergr. 45-fach

1 Kapsel und Trabekel, 2 Zentralarterie, 3 Marginalzone eines Follikels, 4 äußere Zellschicht der PALS, 5 rote Pulpa

3.3.3.2 Kapsel und Trabekel

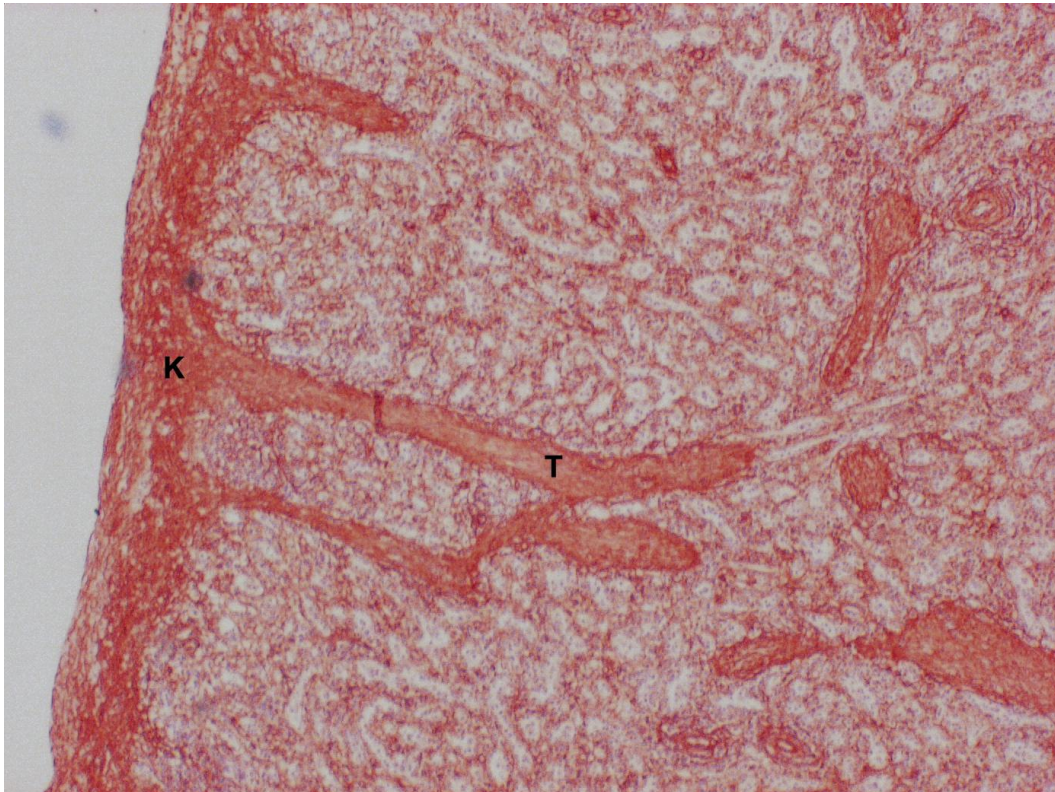


Abb. 46: Milz, Erwachsener, Aktinnachweis in der Milz Kapsel (K), und Trabekel (T), Vergr. 120-fach

In der Kapsel und in den Trabekeln reagieren so gut wie alle Zellen positiv mit dem Aktinantikörper (Abb. 46, 47, 48). Die zahlreichen Zellen sind langgestreckt oder spindelförmig und lassen sich als Myofibroblasten oder auch glatte Muskelzellen bezeichnen.

Auch in der roten Pulpa (RP) fallen große verzweigte aktinpositive Zellen auf; die blasseren Zellen sind wahrscheinlich fibroblastische Retikulumzellen, die kräftig reagierenden Zellen sind wahrscheinlich zu erheblichen Anteil Makrophagen.

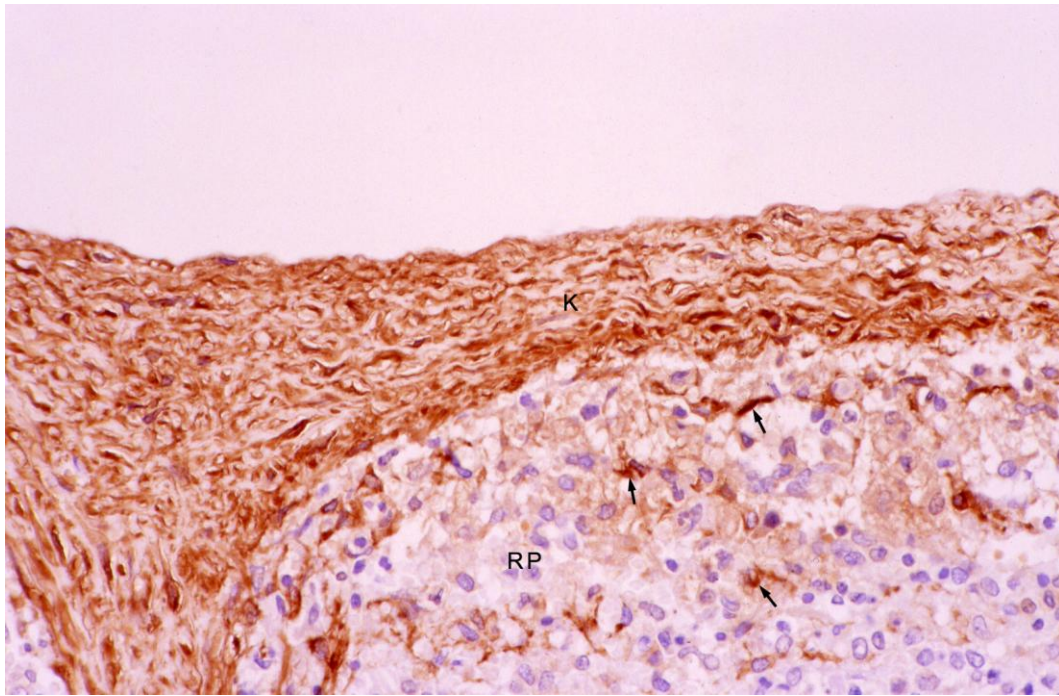


Abb. 47: Milz, Kind, Kapsel (K), Aktinnachweis, Vergr. 450-fach

Rote Pulpa (RP) mit positiven und fibroblastischen Retikulumzellen (Pfeile) sowie z.T. positiven Sinusendothelzellen. Die kräftig positiv reagierenden Zellen in der roten Pulpa sind zu erheblichem Teil Makrophagen.

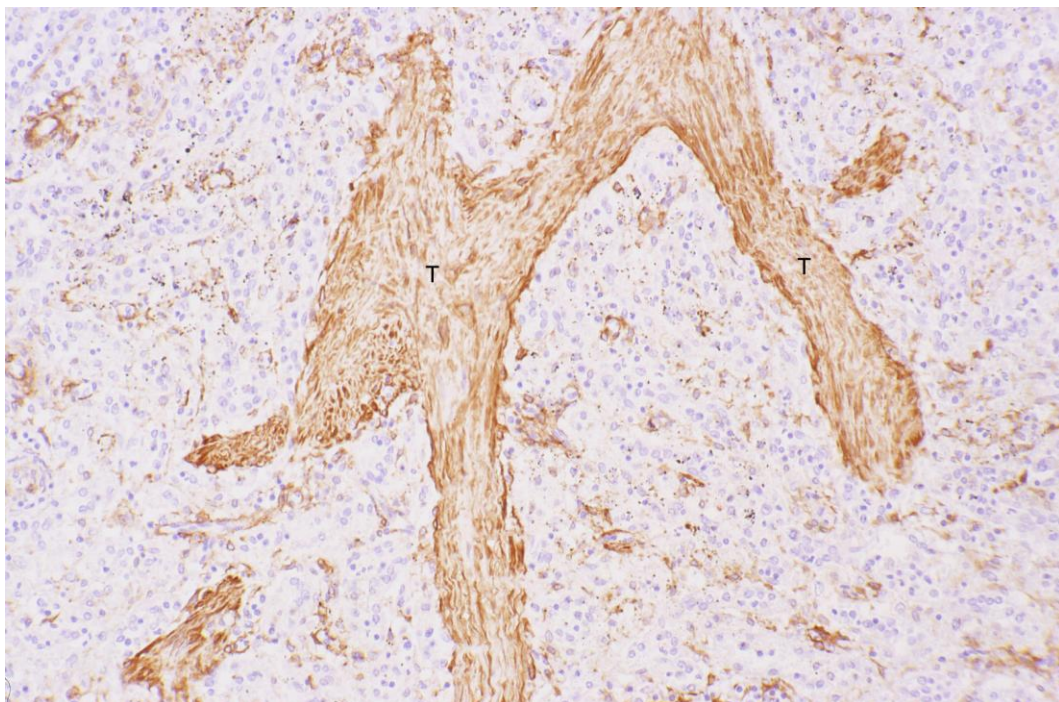


Abb. 48: Milz, Kind, Trabekel (T), Aktinnachweis, Vergr. 250-fach.

Die langgestreckten Myofibroblasten sind, in etwas unterschiedlichem Ausmaß, aktin-positiv.

3.3.3.3 Follikel

Die Follikel sind durch intensive Aktinfärbung in der Marginalzone gekennzeichnet (Abb. 49, 50). Die Zentralarteriole innerhalb des Follikels ist ebenfalls positiv markiert. Um sie herum befindet sich die PALS. Ein konzentrisches Netzwerk aus aktinpositiven Zellen, primär sind das wahrscheinlich die fibroblastischen Retikulumzellen, die hier als Myofibroblasten bezeichnet werden können, umgibt den Follikel. Die am weitesten nach außen gelegene Myofibroblastenreihe der PALS setzt sich in der Marginalzone des Follikels fort. Diese ist lediglich ein- bis zweireihig.

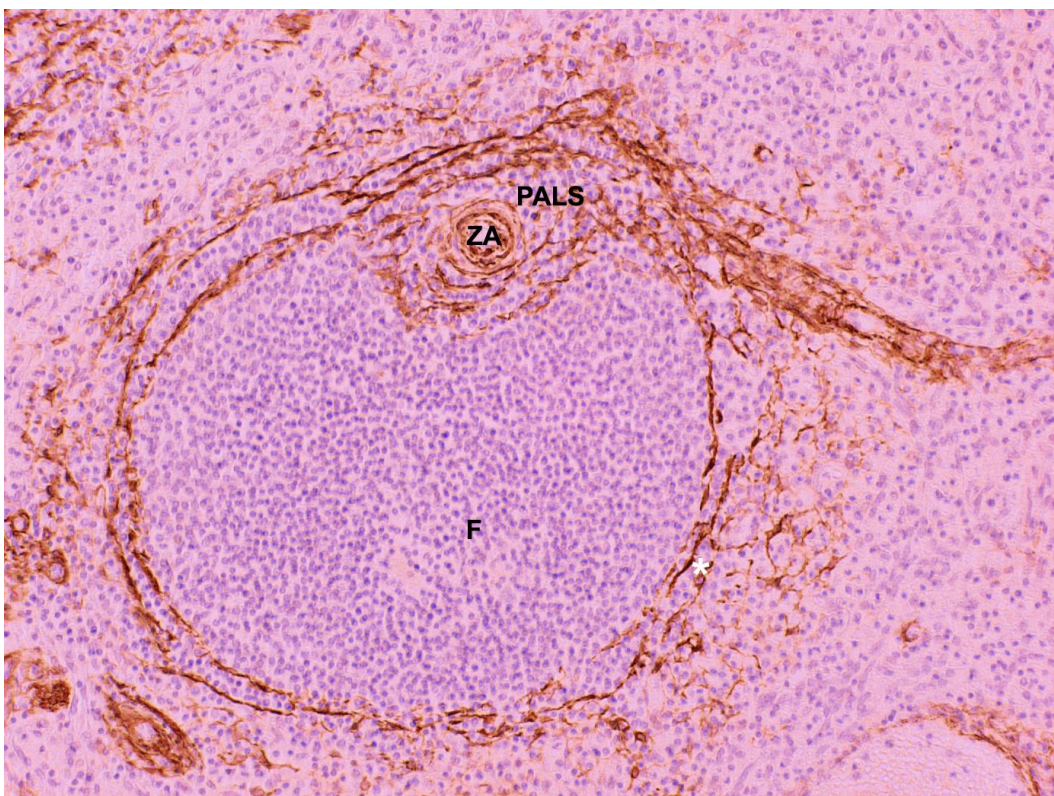


Abb. 49: Milz, erwachsener Mensch, Follikel mit kräftigem Aktinnachweis in der Marginalzone (* (Sternchen)), PALS und die Zentralarterie (ZA) reagieren auch kräftig positiv, Vergr. 110-fach

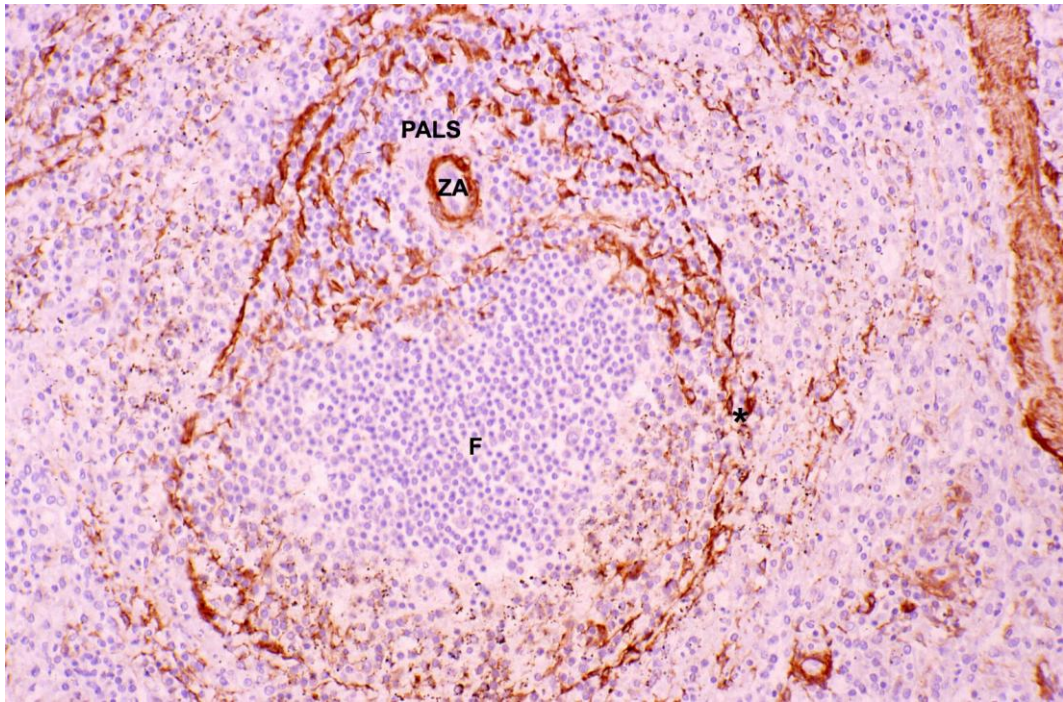


Abb. 50: Milz, Kind, Aktinnachweis in der Marginalzone *(Sternchen)) des Follikels (F), in der PALS und in der Zentralarterie (ZA), Vergr. 220-fach

3.3.3.4 PALS

Der Aktinnachweis der PALS fällt in den fibroblastischen Retikulumzellen, die hier als Myofibroblasten differenziert sind, positiv aus.

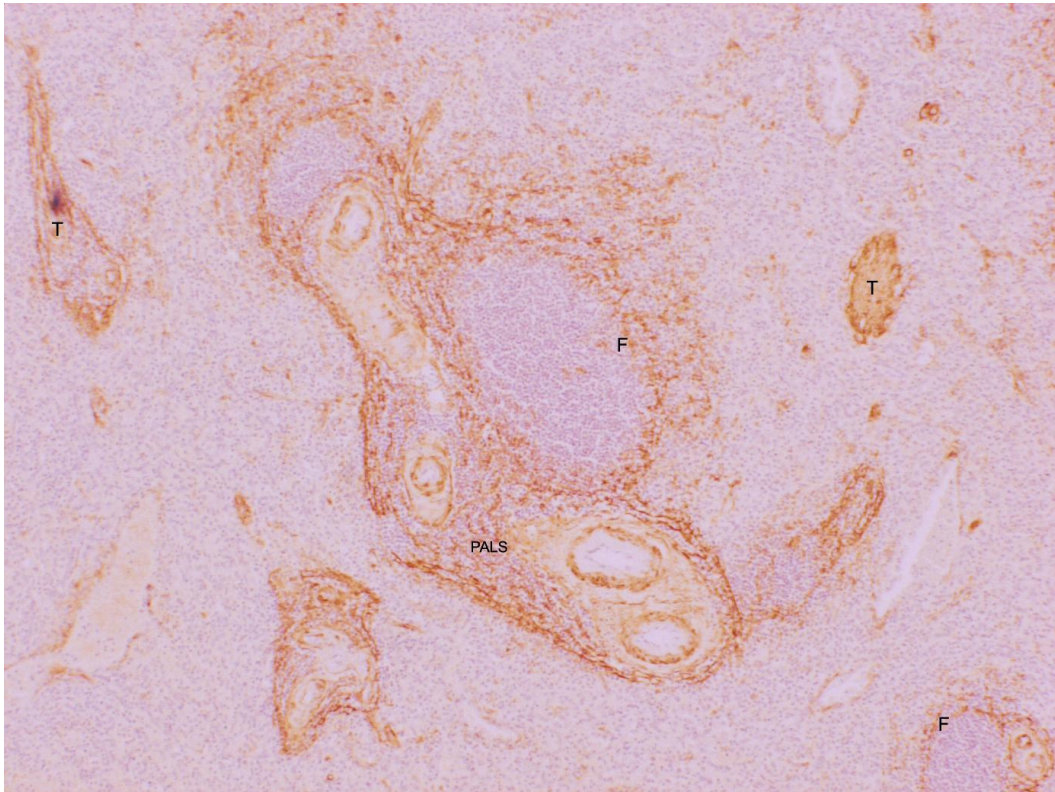


Abb. 51: Milz, erwachsener Mensch, Aktinnachweis in der Marginalzone der Follikel (F) in der PALS und im Trabekel (T), Vergr. 110-fach



Abb. 52: Milz, Kind, Aktinnachweis vor allem in der Marginalzone der Follikel (F) und in der PALS, Zentralarterie (ZA), Vergr. 5-fach

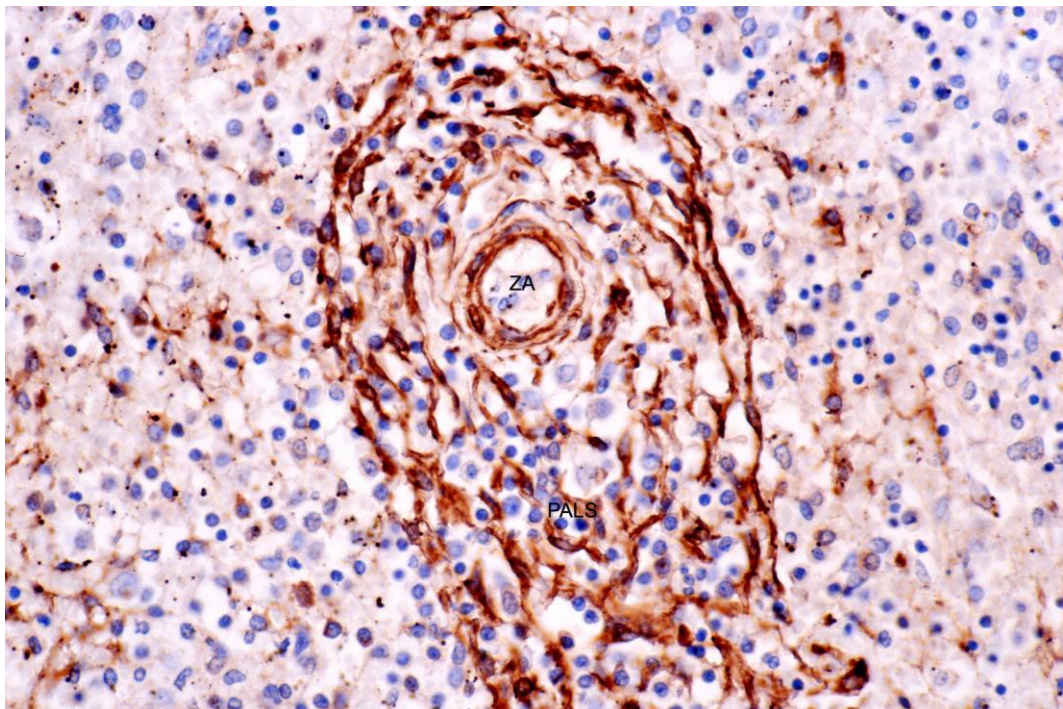


Abb. 53: Milz, Kind, PALS mit Zentralarterie (ZA), Aktinnachweis, Vergr. 450-fach

3.3.3.5 Rote Pulpa

In der roten Pulpa sind verschiedene Strukturen aktinpositiv. Klar zeichnen sich die Sinuswände ab. Aktin befindet sich hier vor allem basal in den Sinusendothelien (Abb. 54). Aber es färbt sich auch ein zartes Netzwerk in den Pulpasträngen an, das wahrscheinlich aus den Fortsätzen der fibroblastischen Retikulumzellen aufgebaut ist (Abb. 54).

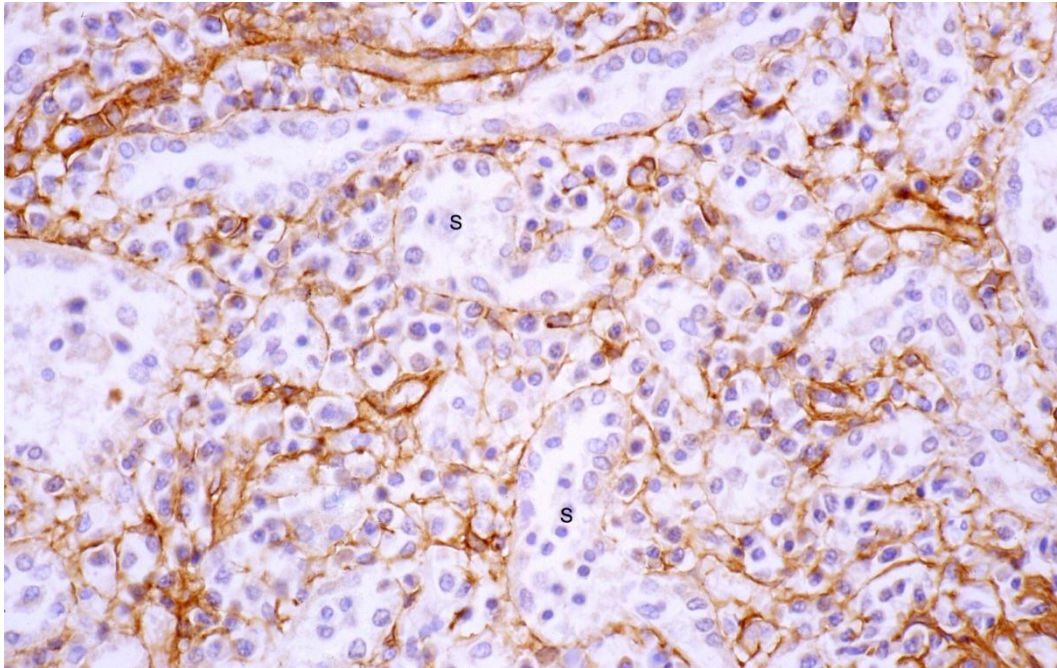


Abb. 54: Milz, erwachsener Mensch, rote Pulpa, Sinus (S), Aktinnachweis, Vergr. 450-fach

3.3.4 Alpha-Tubulin, Sinus, Makrophagen

Der Nachweis von Alpha-Tubulin fällt in den meisten Zellen schwach positiv aus.

Sinus, Makrophagen

Der Reaktionsausfall in den Endothelzellen der Sinuswände ist relativ kräftig. Stark gefärbt sind auch Makrophagen.

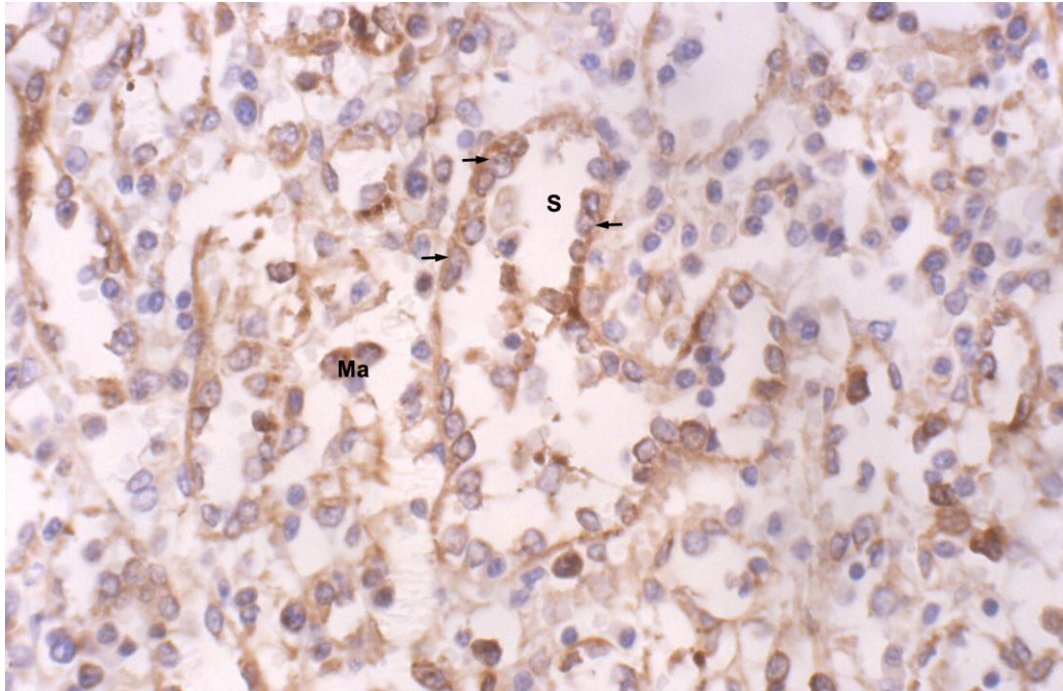


Abb. 55: Milz, erwachsener Mensch, rote Pulpa, Sinus (S), Nachweis von Alpha-Tubulin in Makrophagen (Ma) und im Sinusendothel (Pfeil), Vergr. 450-fach

3.3.5 Myosin II

Der Nachweis von Myosin II fiel in folgenden Zellen positiv aus:

- 1) Myofibroblasten in Kapsel und Trabekeln (schwankend zwischen deutlich positiv und schwach positiv; Menge der positiven Zellen schwankt, in der Kindermilz sind die meisten Zellen positiv, beim Erwachsenen sind oft nur wenige Zellen positiv).
- 2) Media der Arterien und Arteriolen (mittelstark positiv)
- 3) Endothel der Sinus (kräftig positiv)
- 4) Fibroblastische Retikulumzellen der weißen und der roten Pulpa (überwiegend mittelkräftig positiv)
- 5) Schwannsche Zellen von Nerven (kräftig positiv)
- 6) Makrophagen (kräftig positiv)

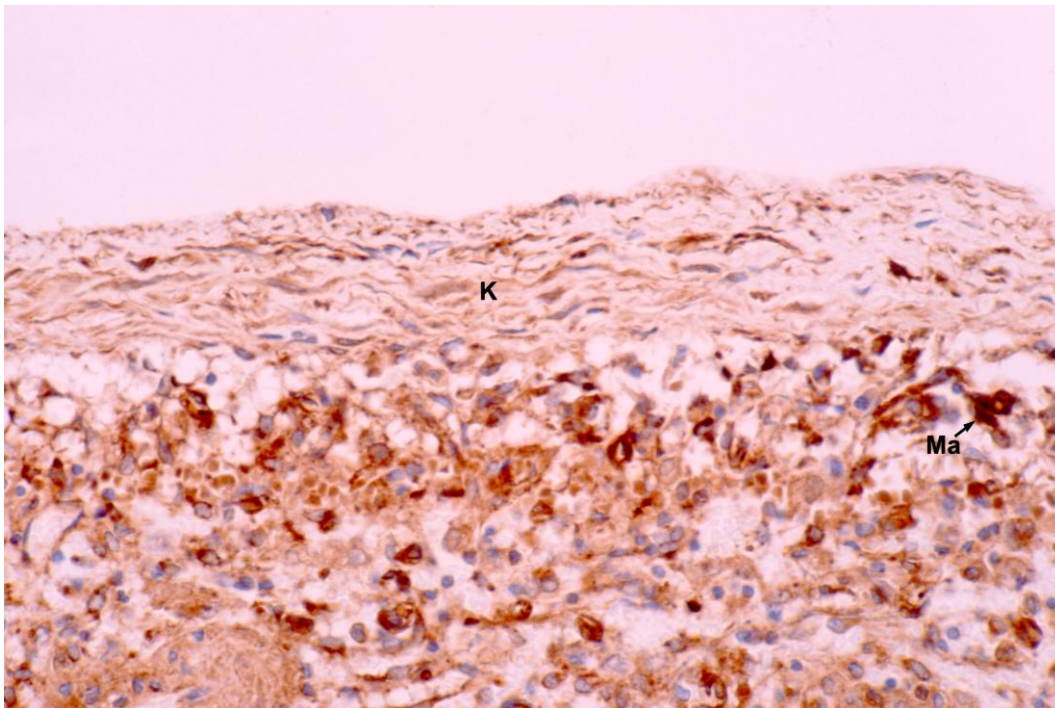


Abb. 56: Milz, Kind, Kapsel, Nachweis von Myosin II von Myofibroblasten in Kapsel (K), Retikulumzellen der roten Pulpa und Makrophagen (Ma), Vergr. 450-fach,

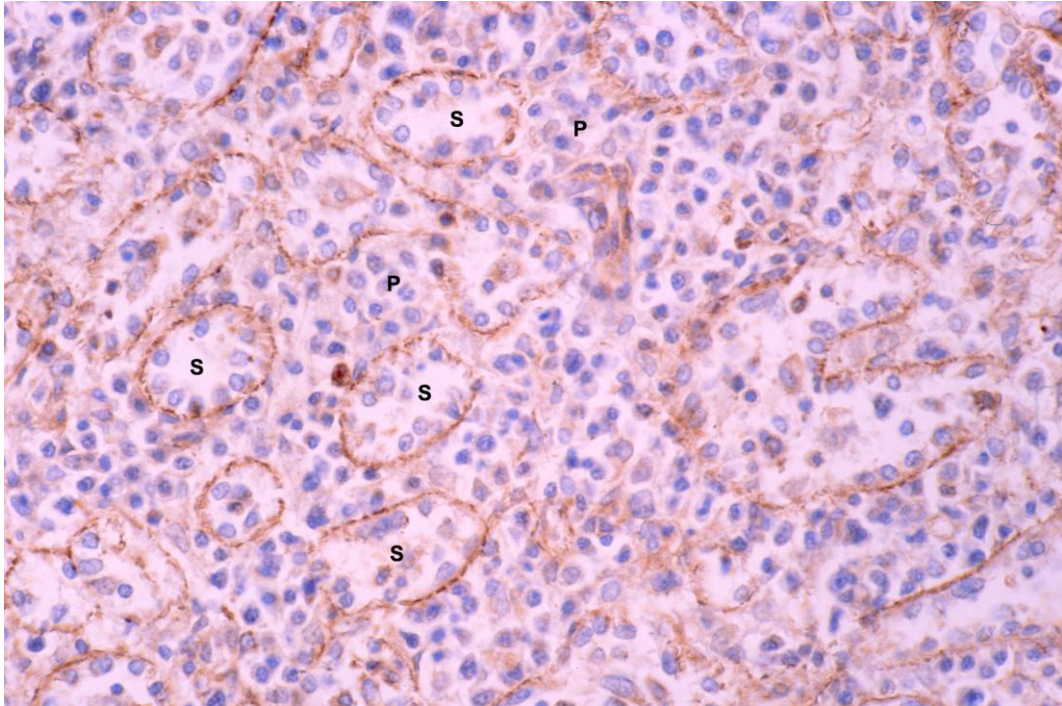


Abb. 57: Milz, erwachsener Mensch, rote Pulpa, Sinus (S) und Pulpastränge (P), Nachweis von Myosin II im Sinusendothel, schwache Reaktion in den Retikulumzellen, Vergr. 450-fach

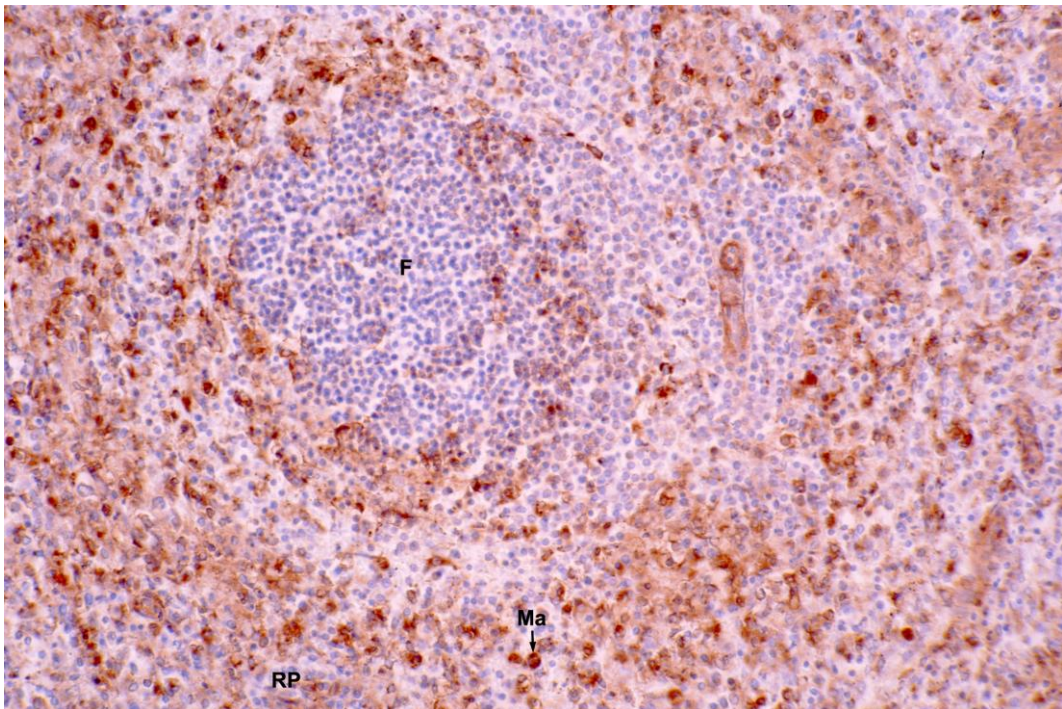


Abb. 58: Milz, erwachsener Mensch, Nachweis von Myosin II in weißer und roter Pulpa, kräftig positiv reagieren Makrophagen (Ma), schwach positiv reagieren die Retikulumzellen, Follikel (F), rote Pulpa (RP), Vergr. 250-fach

3.3.6 Vimentin, Sinus

Sinus

Vimentin lässt sich schwach in vielen Zellen der Milz nachweisen. Relativ stark wird Vimentin in den Sinuswandendothelien exprimiert (Abb. 59, 60).

Zum Teil fallen die kräftig markierten Makrophagen auf. Sie sind diffus verteilt und einzeln in der roten Pulpa sichtbar (Abb. 60).

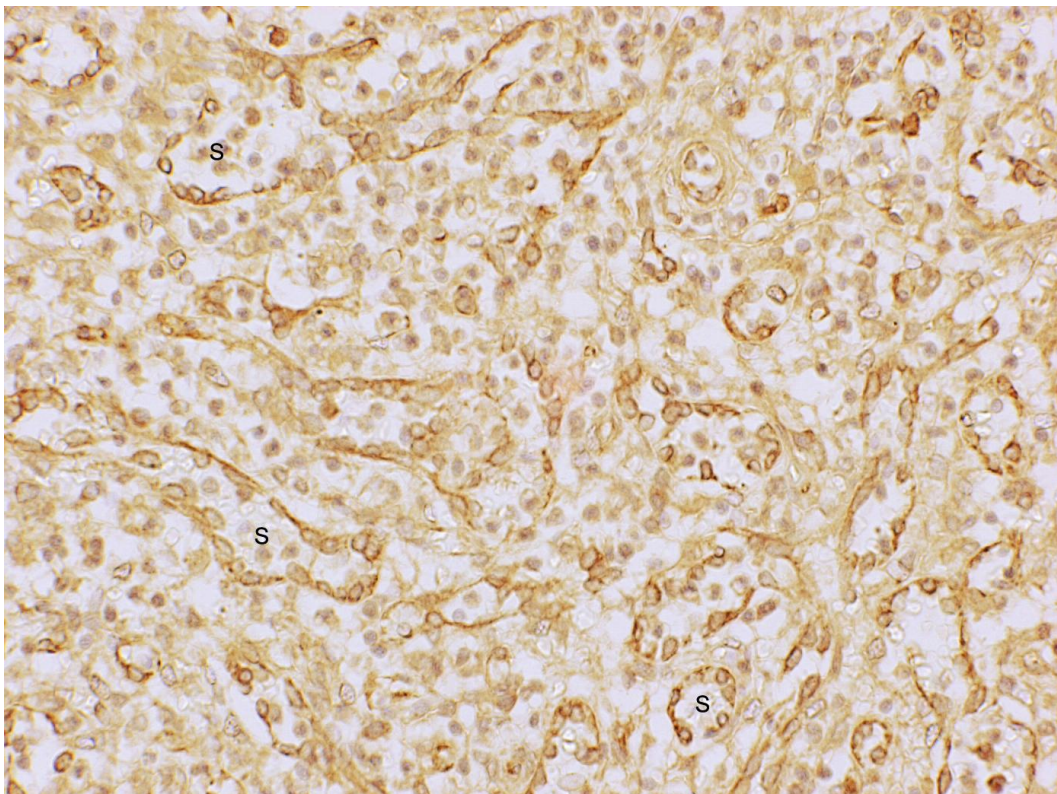


Abb. 59: Milz, erwachsener Mensch, rote Pulpa mit vielen Sinus (S), Vimentinnachweis im Sinusendothel, Vergr. 250-fach

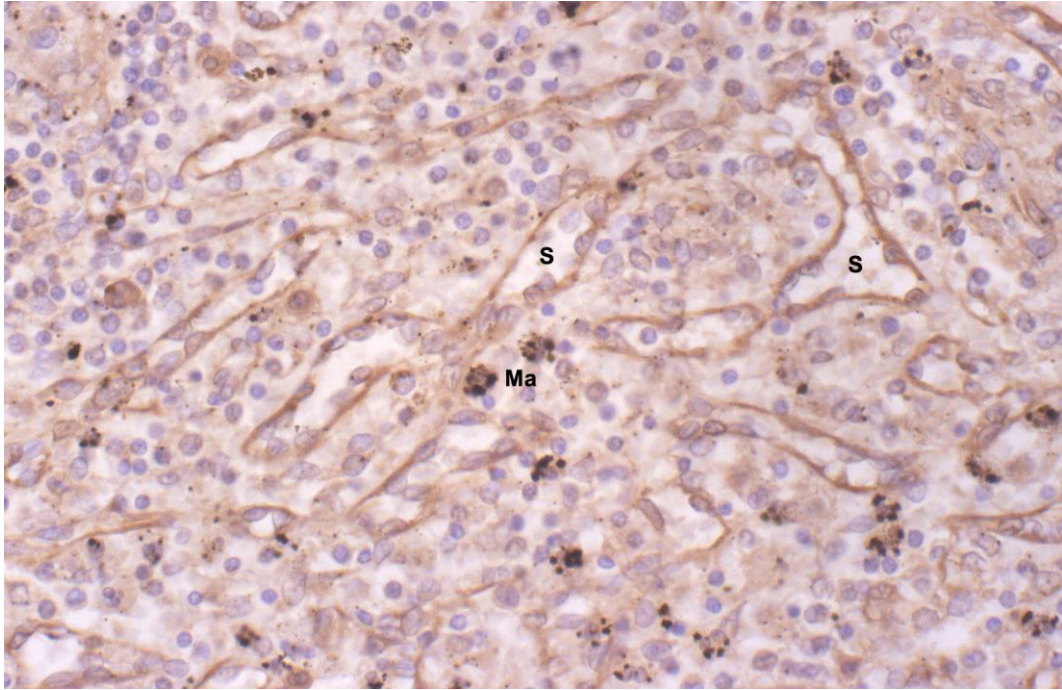


Abb. 60: Milz, Kind, rote Pulpa mit vielen Sinus (S), Vimentinnachweis im Sinusendothel, Makrophagen (Ma), Vergr. 450-fach

3.3.7 Connexin 43, Sinus

Sinus

Connexin 43 ließ sich im vorliegenden Material kräftig in den Sinusendothelien nachweisen (Abb. 61, 62). Positiv fällt auch der Connexin-43-Nachweis in der Marginalzone der Follikel (Abb. 61) und in der Wand der Zentralarterien (Abb. 62) aus.

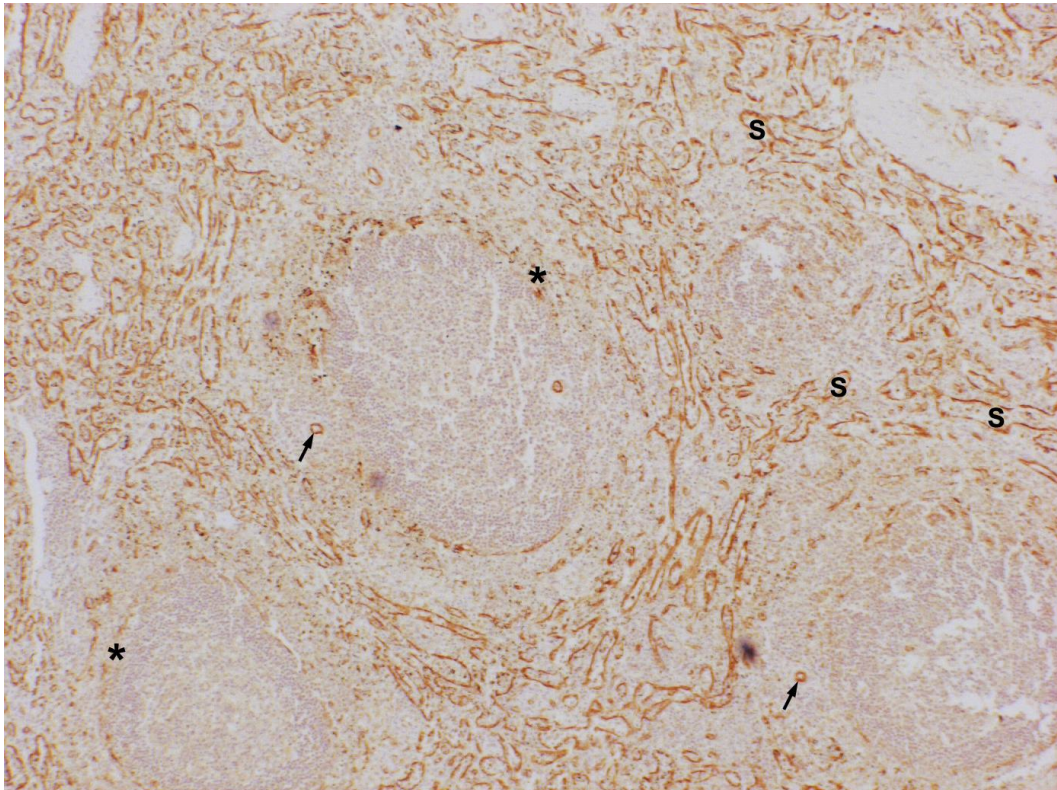


Abb. 61: Milz, Kind, Nachweis von Connexin 43, Vergr. 45-fach

Positiv reagieren vor allem die Sinusendothelien (S), aber auch die Zellen der Marginalzone der Follikel *(Sternchen) und die Media der Zentralarterien (Pfeile).

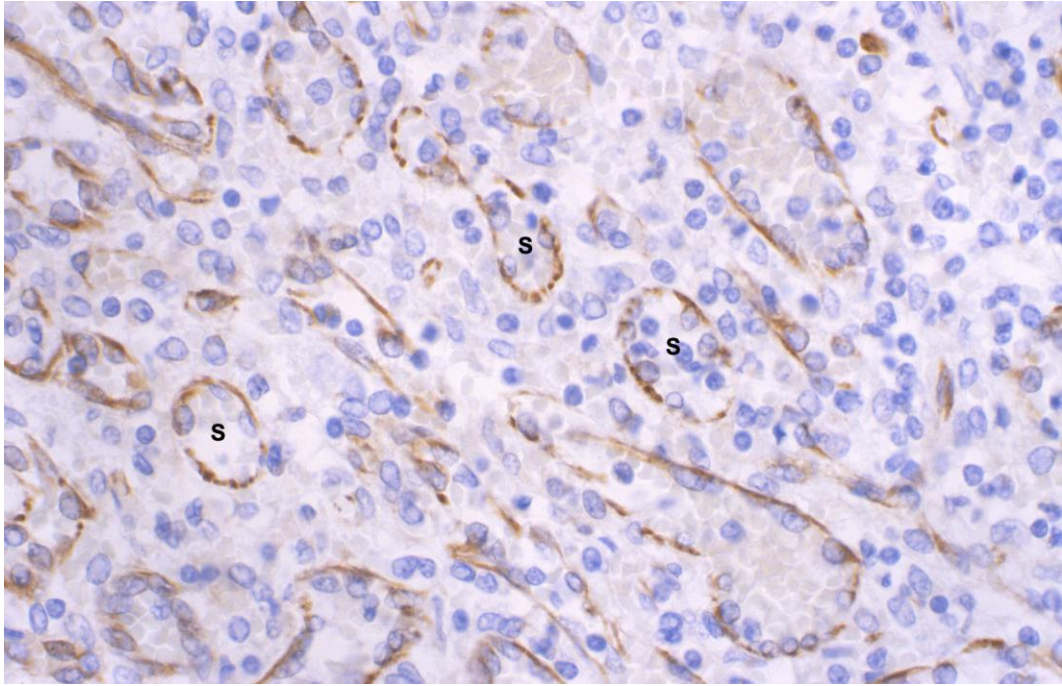


Abb. 62: Milz, erwachsener Mensch, rote Pulpa, Nachweis von Connexin 43 in den Endothelien der Sinus (S), Vergr. 450-fach

3.3.8 CD 3, PALS

PALS

Die Lymphozyten der PALS sind CD-3-positiv (Abb. 63). Außerdem finden sich CD-3-positive Lymphozyten in den Keimzentren der Follikel (im vorliegenden Material nur beim Kind) und als Einzelzellen überall in der roten Pulpa.

Wiewohl die Charakterisierung der Lymphozyten und Makrophagen nicht im Vordergrund der vorliegenden Untersuchung stand, so ist ihr Nachweis für die Identifizierung von Strukturen wie PALS oder den Follikeln hilfreich. CD 3 wird als genereller Marker für T-Lymphozyten eingesetzt.

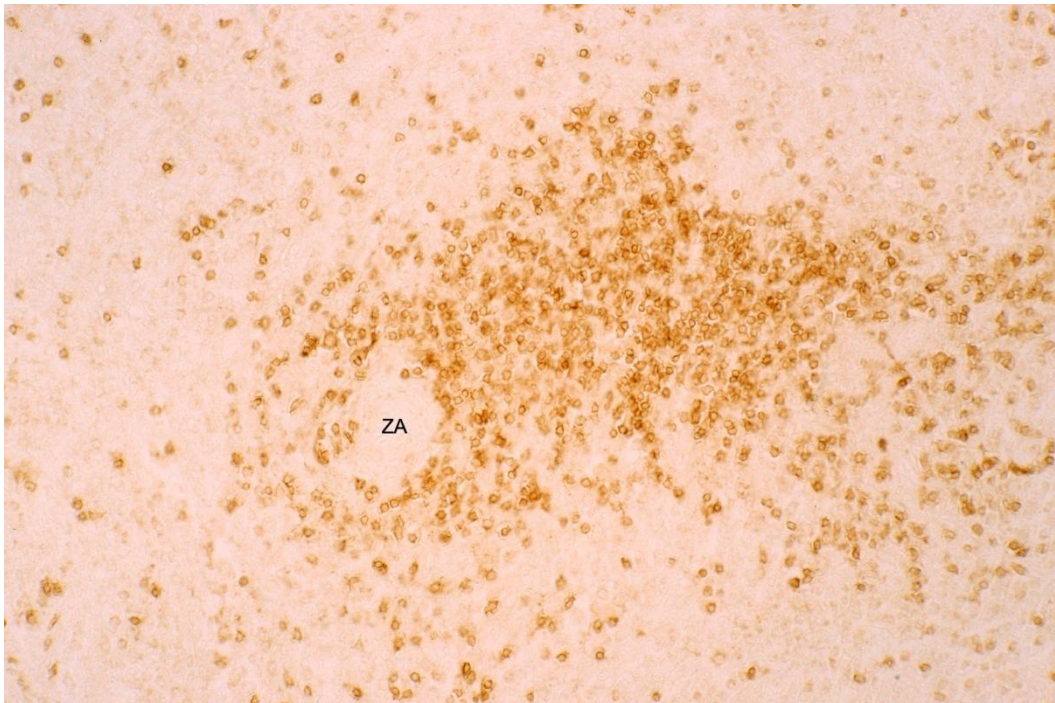


Abb. 63: Milz, erwachsener Mensch, Zentralarterie, PALS, CD-3-positive T-Lymphozyten in der PALS mit ihrer Zentralarterie (ZA), Vergr. 250-fach

3.3.9 CD 8, PALS

PALS

Die CD-8-positiven T-Lymphozyten wurden vor allem in der PALS (Abb. 64), aber vereinzelt auch locker verstreut in der roten Pulpa nachgewiesen.

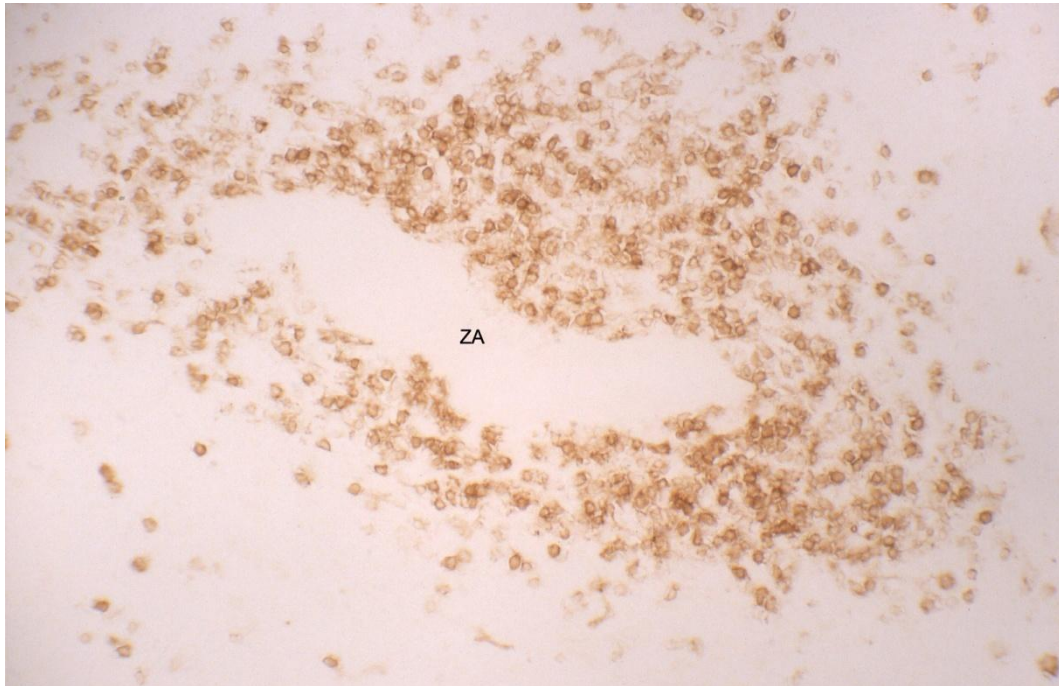


Abb. 64: Milz, erwachsener Mensch, Nachweis CD-8-positiver T-Lymphozyten in der PALS, in deren Zentrum die Zentralarterie (ZA) verläuft, Vergr. 250-fach

3.3.10 CD 20, Follikel

CD 20 wurde als Marker für B-Lymphozyten eingesetzt.

Follikel

Die Färbung mit dem Antikörper CD 20 markiert die Follikel in der Milz des Menschen deutlich. CD-20 tragende-B-Lymphozyten halten sich zahlreich und dicht angesiedelt in den Milzknötchen auf (Abb. 65, 66).

Rote Pulpa: Die Anwesenheit von locker verstreuten CD-20-tragenden B-Zellen ist auch in der roten Pulpa nachweisbar.

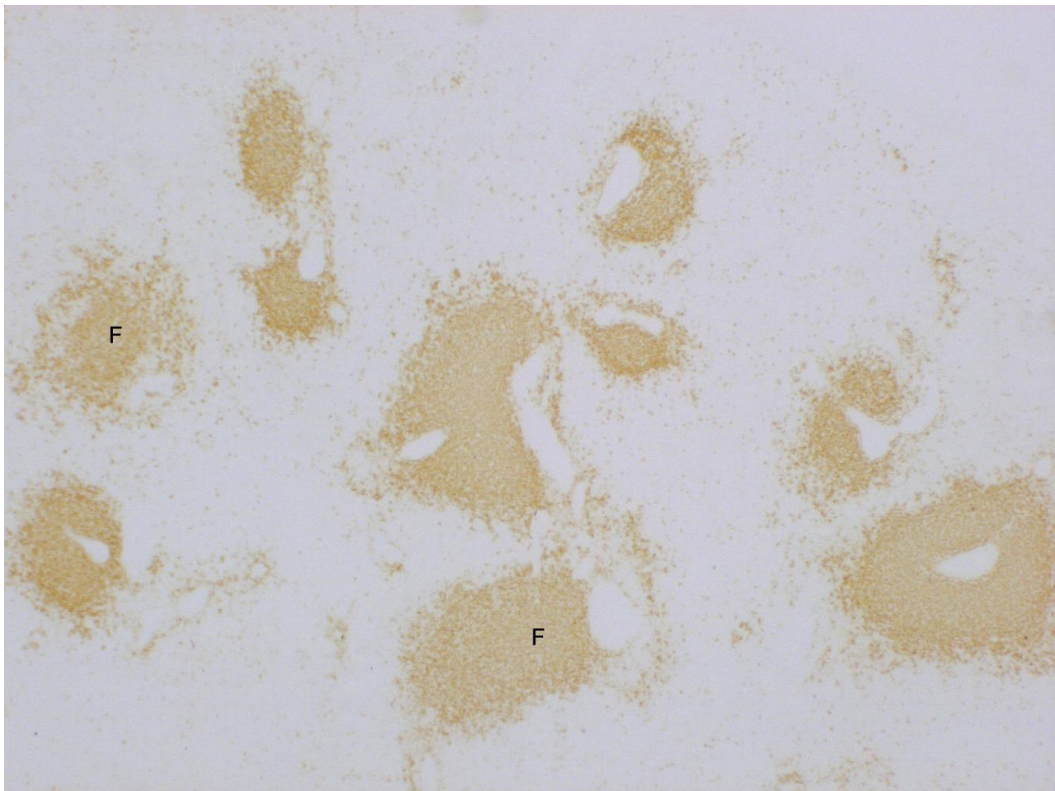


Abb. 65: Milz, erwachsener Mensch, Nachweis von CD 20, positiv reagieren vor allem die Lymphozyten der Follikel (F), Vergr. 25-fach

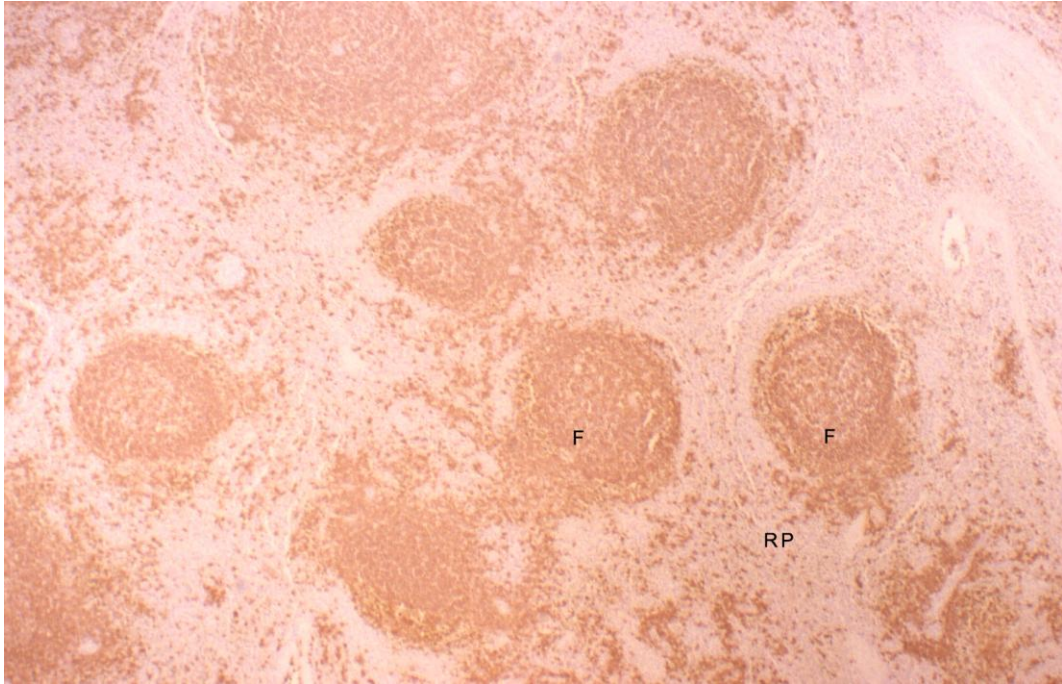


Abb. 66: Milz, Kind, Nachweis von CD-20-positiven Lymphozyten in den Follikeln (F), aber auch locker verstreut in der roten Pulpa (RP), Vergr. 45-fach

3.3.11 CD 68

3.3.11.1 Rote Pulpa

CD 68 wurde als Marker für Makrophagen eingesetzt. Er scheint in der roten Pulpa alle Makrophagen zu erfassen. CD-68-positive Makrophagen befinden sich diffus verteilt und zahlreich im retikulären Gewebe der roten Pulpa und auch in den Milzknötchen (Abb. 67, 68).

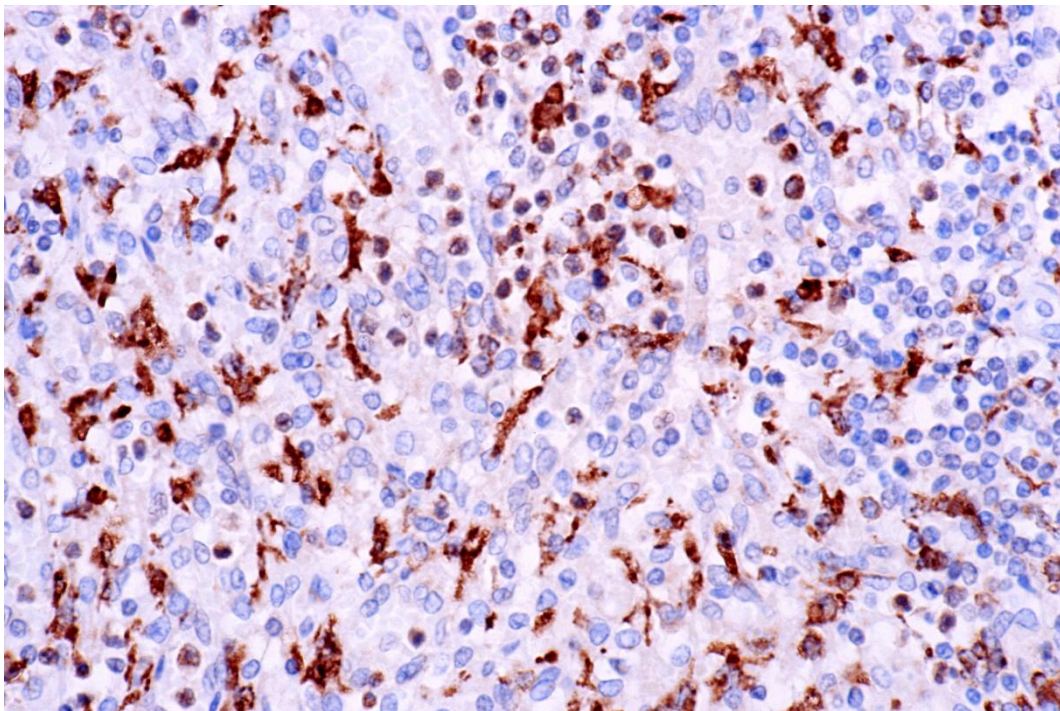


Abb. 67: Milz, erwachsener Mensch, rote Pulpa, positiver Nachweis von CD 68 in den Makrophagen, Vergr. 450-fach

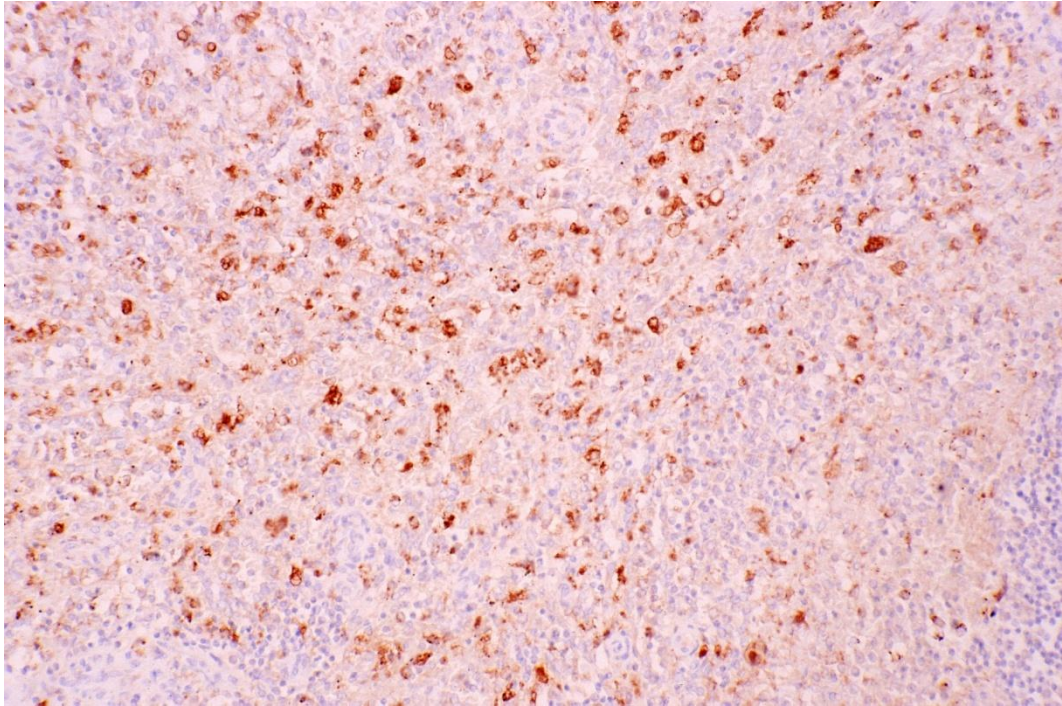


Abb. 68: Milz, Kind, rote Pulpa, Nachweis von CD 68 in den Makrophagen, Vergr. 250-fach

3.3.11.2 Follikel

In den Follikeln kommen CD-68-positive Makrophagen vor allem in den Keimzentren vor (Abb. 69).

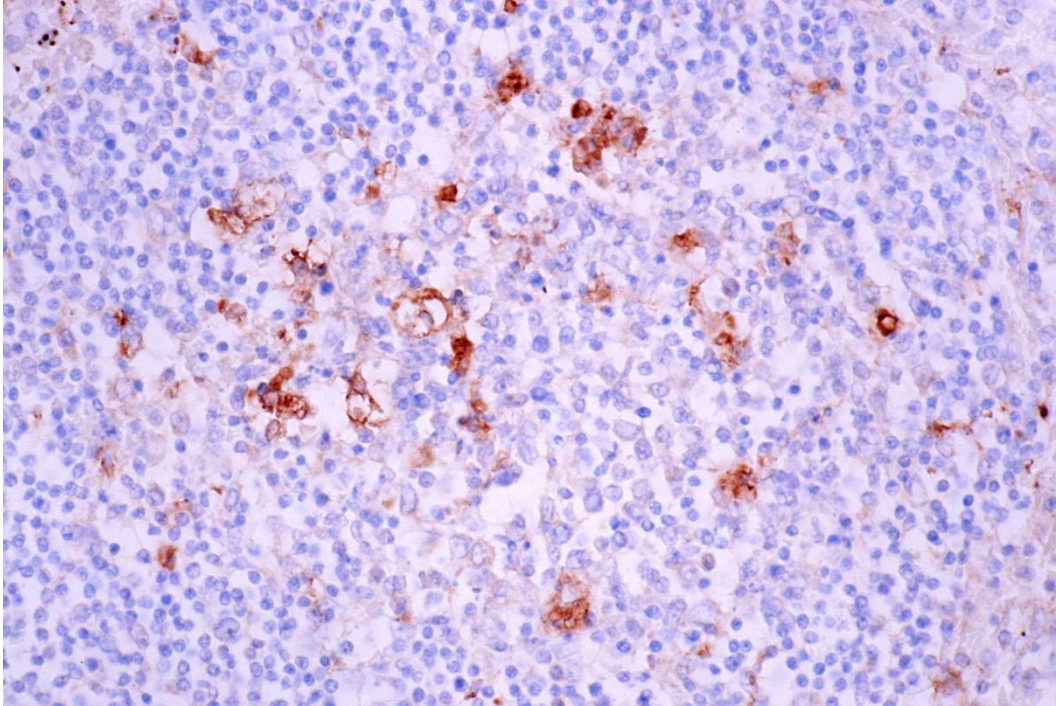


Abb. 69: Milz, Kind, Follikel, Nachweis von CD-68-positiven Makrophagen, die vor allem im Keimzentrum vorkommen, Vergr. 450-fach

3.3.12 CD 74

3.3.12.1 Follikel

CD 74 markiert Zellen, die das MHC-II-Klasse-Molekül exprimieren. CD 74 ist mit CD 44 assoziiert und markiert B- und T-Lymphozyten, natürliche Killerzellen, Monozyten und wohl auch interdigitierende Zellen. Im immunhistochemischen Schnitt, auf dem lediglich CD 74 nachgewiesen wurde, ist oft nicht mit Sicherheit festzulegen, welcher Zelltyp reagiert.

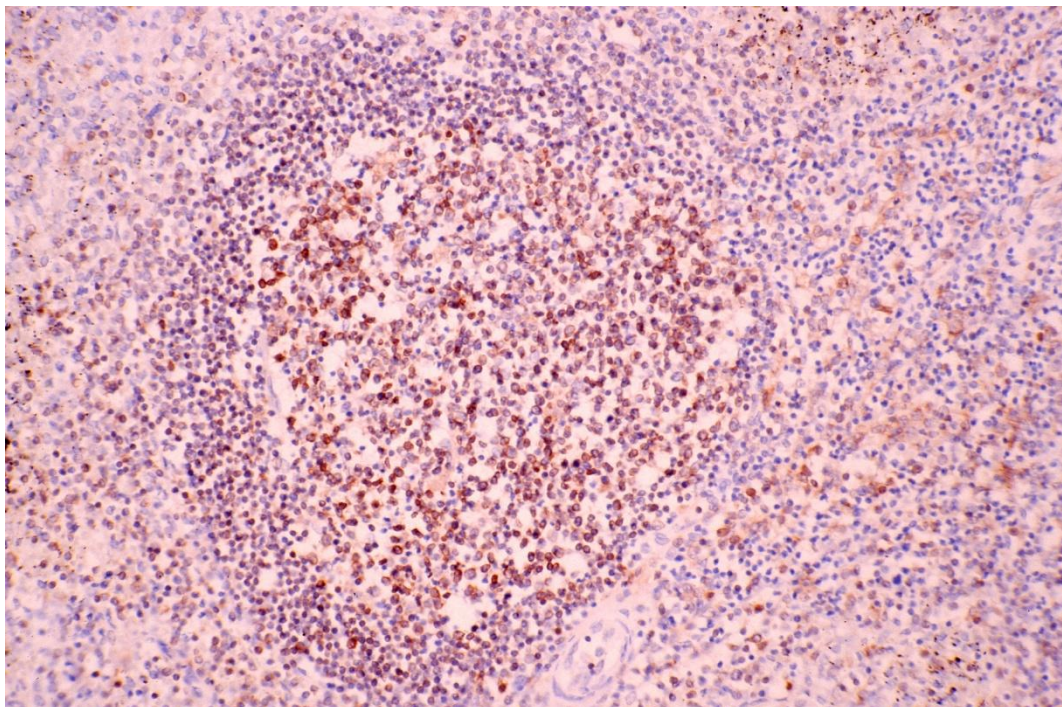


Abb. 70: Milz, Kind, Follikel mit zahlreichen kräftig CD-74-positiven Zellen, Vergr. 250-fach

3.3.12.2 PALS

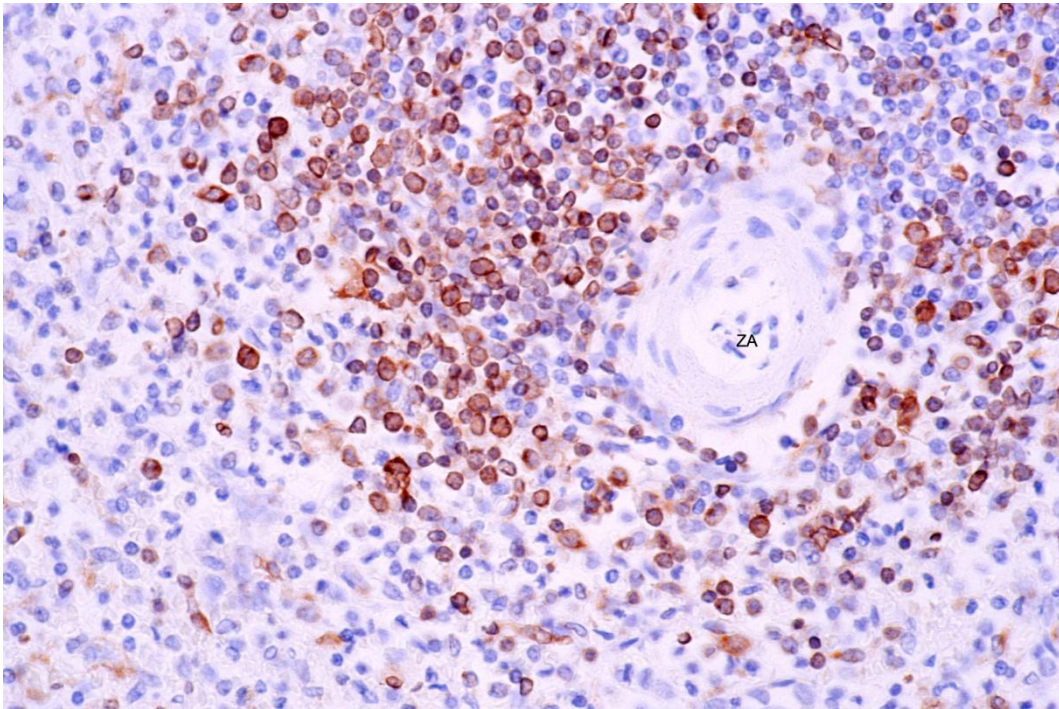


Abb. 71: Milz, erwachsener Mensch, CD-74-positive Zellen in der PALS mit Zentralarterie (ZA), Vergr. 450-fach

3.3.13 Neurofilamentprotein (NFPC), Nerv/Trabekel

Nerv/Trabekel

Der Nachweis des NFPC wurde zum Nachweis von Nervenfasern durchgeführt. NFPC-positive Nerven fanden sich nur in den Trabekeln und hier in Nachbarschaft der Trabekelarterien (Abb. 72).

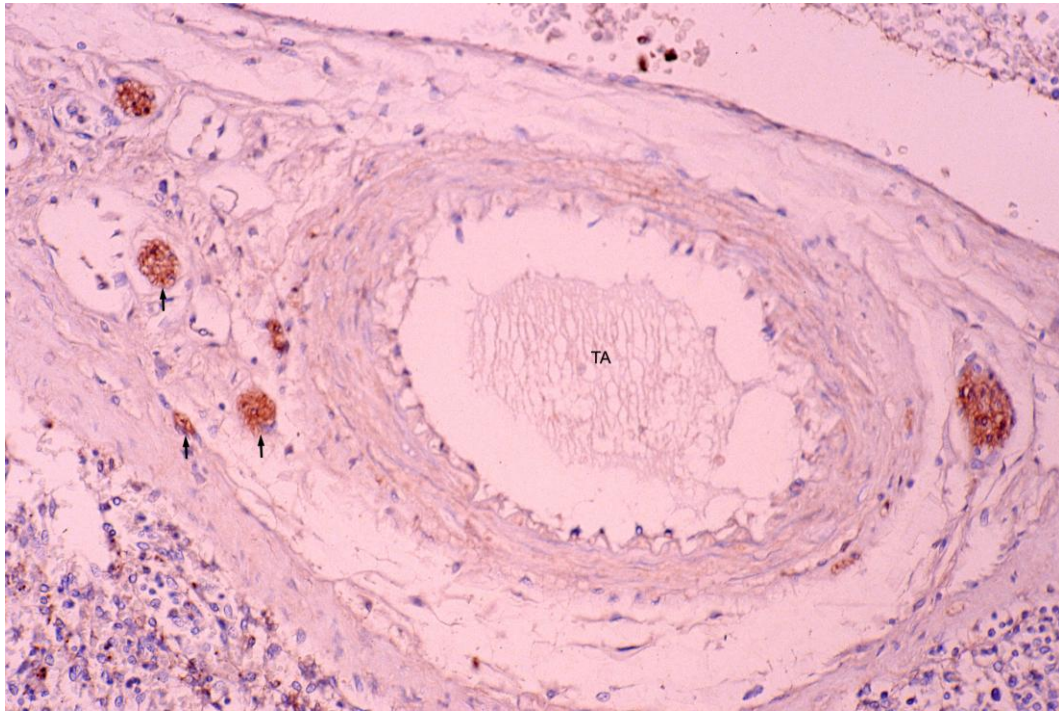


Abb. 72: Milz, Kind, Trabekel, NFPC-positive Nerven (Pfeile) in Nähe der Trabekulararterie (TA), Vergr. 250-fach

3.3.14 Beta-Tubulin, Nerv/Trabekel

Beta-Tubulin erwies sich als nützlicher Marker für kleine Nerven (Abb. 73), die auch mit diesem Marker nur in der Nähe der Trabekelarterien gefunden wurden.

Nerv, Trabekel

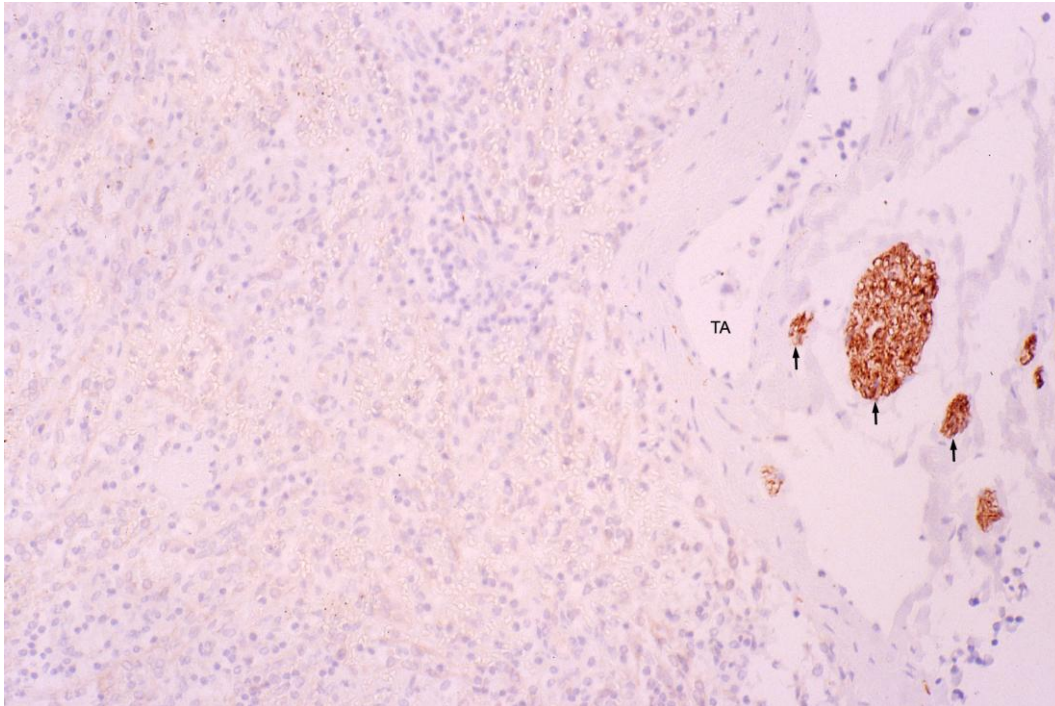


Abb. 73: Milz, Kind, Nachweis von Beta-Tubulin in einem Trabekel, positiv reagieren Nerven in Nähe der Trabekelarterie (TA), Vergr. 250-fach

3.3.15 S100, Nerv/PALS

Auch S100 wurde eingesetzt, um Nervenfasern nachzuweisen. Auch in diesem Falle wurden Nervenfasern nur in Nähe der Trabekelarterien nachgewiesen (Abb. 74). Möglicherweise schwach positiv reagierende Einzelzellen in roter und weißer Pulpa konnten nicht definitiv identifiziert werden.

Nerv/PALS

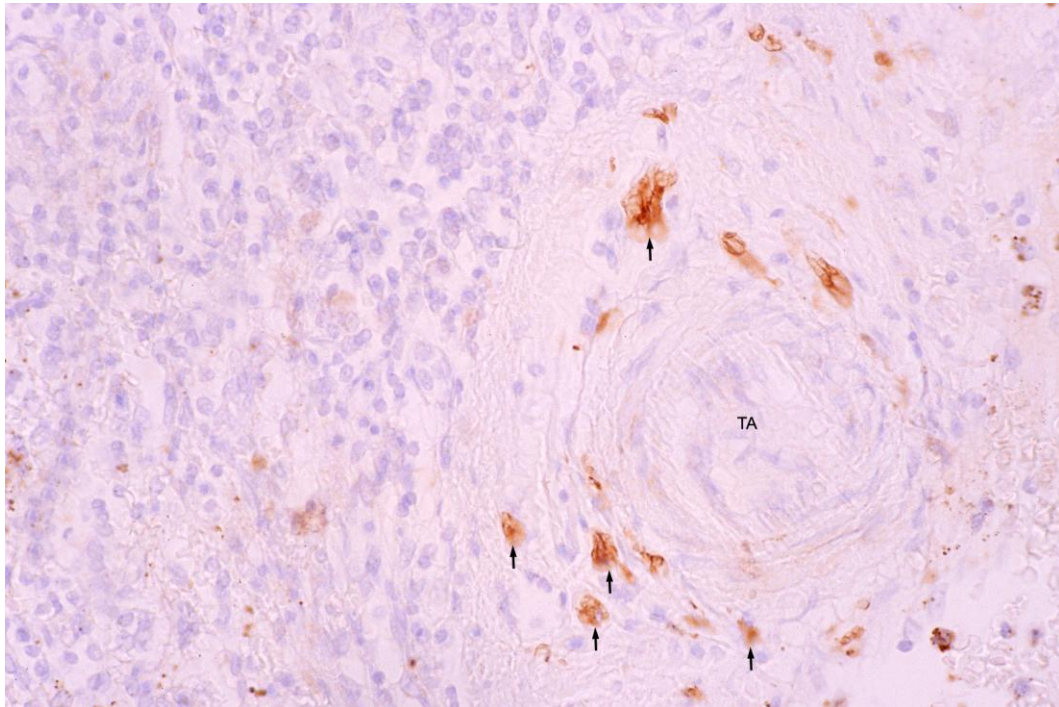


Abb. 74: Milz, Kind, Trabekelarterie (TA), Nachweis von S100 in kleinen Nerven (Pfeile), Vergr. 450-fach

3.4 Befunde der Transmissionselektronenmikroskopie

3.4.1 Kapsel und Trabekel

Näheren Aufschluss über den Aufbau der Kapsel und der Trabekel liefert die Transmissionselektronenmikroskopie. Kapsel und Trabekel sind gleichartig aufgebaut und enthalten zahlreiche Zellen und Bindegewebsmatrix. Die Zellen erweisen sich als längliche verzweigte Zellen, die in ihrem Zytoplasma reich entwickelte dünne Filamente enthalten (Abb. 75 bis 79), die Aktinfilamenten entspricht. Die Zellmembran bildet zahlreiche Caveolen (Abb. 76). Typisch sind auch Plaques aus dichtem Material innen an der Zellmembran (Abb. 77) und im Zytoplasma (Abb. 76). Die Ultrastruktur dieser Zellen deutet darauf hin, dass diese Zellen als Myofibroblasten bzw. glatte Muskelzellen anzusehen sind. In manchen Zellen sind die Organellen gut entwickelt, speziell das raue endoplasmatische Retikulum (RER). Die Matrix besteht im elektronenmikroskopischen Präparat aus dicht gepackten Kollagenfibrillen (Abb. 75 bis 79) und zahlreichen elastischen Fasern (Abb. 77), die aus amorphem Material und Mikrofibrillen aufgebaut sind, häufig sind auch Fibrillenbündel anzutreffen, die allein aus Mikrofibrillen bestehen (Abb. 75, 76).

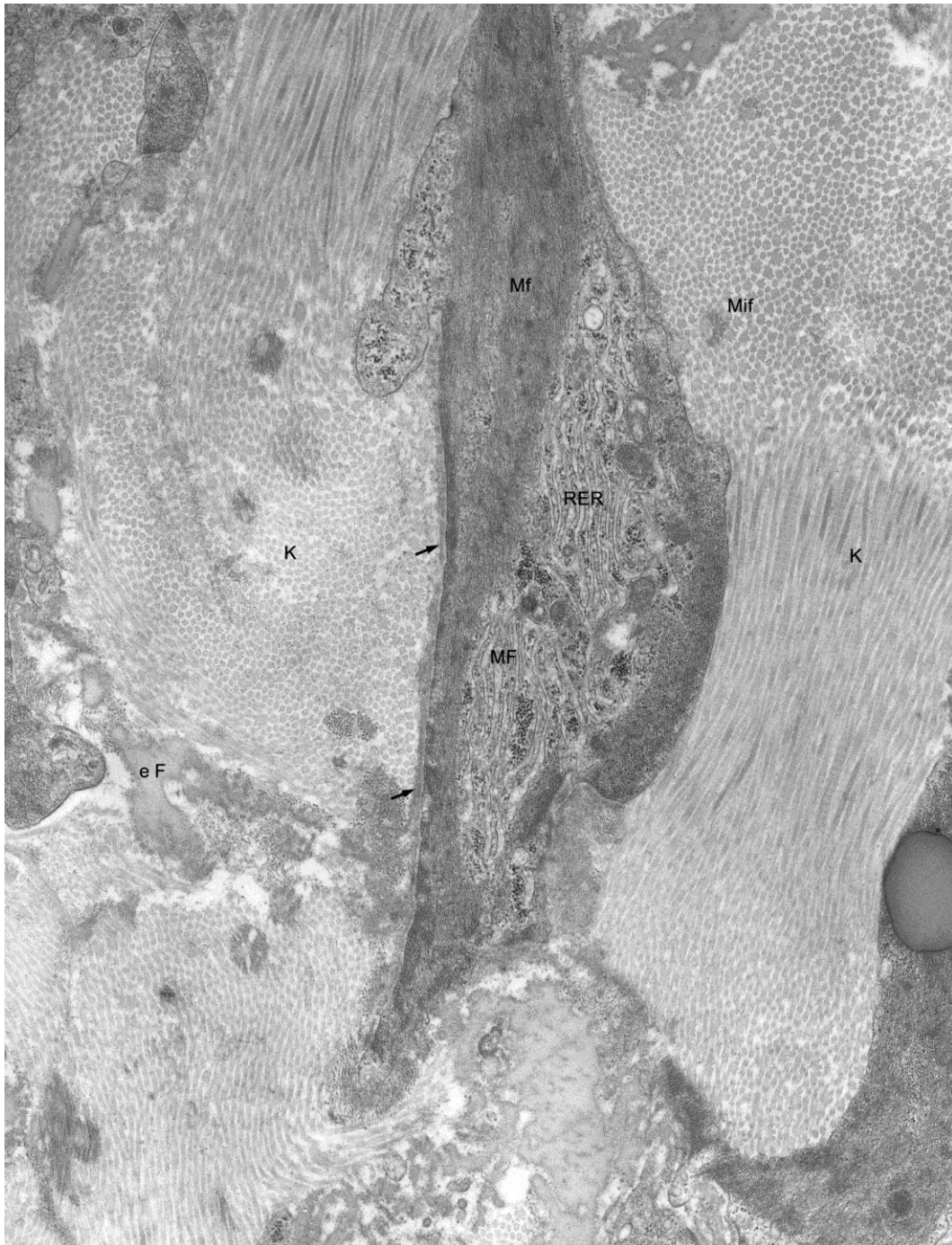


Abb. 75: Milzkapsel, TEM, Vergr. 15300-fach

Myofibroblast (MF) mit zahlreichen Myofilamenten (Mf), aber auch gut entwickeltem rauem endoplasmatischem Retikulum (RER). Membranverdichtungen = „Adhesion Plaques“ (Pfeile). Die Matrix enthält dichtgepackte Kollagenfibrillen (K) und elastische Fasern (eF). Oft finden sich auch Bündel von Mikrofibrillen (Mif). Beachte rechts oben den unterschiedlichen Umriss und den unterschiedlichen Durchmesser der Kollagenfibrillen.

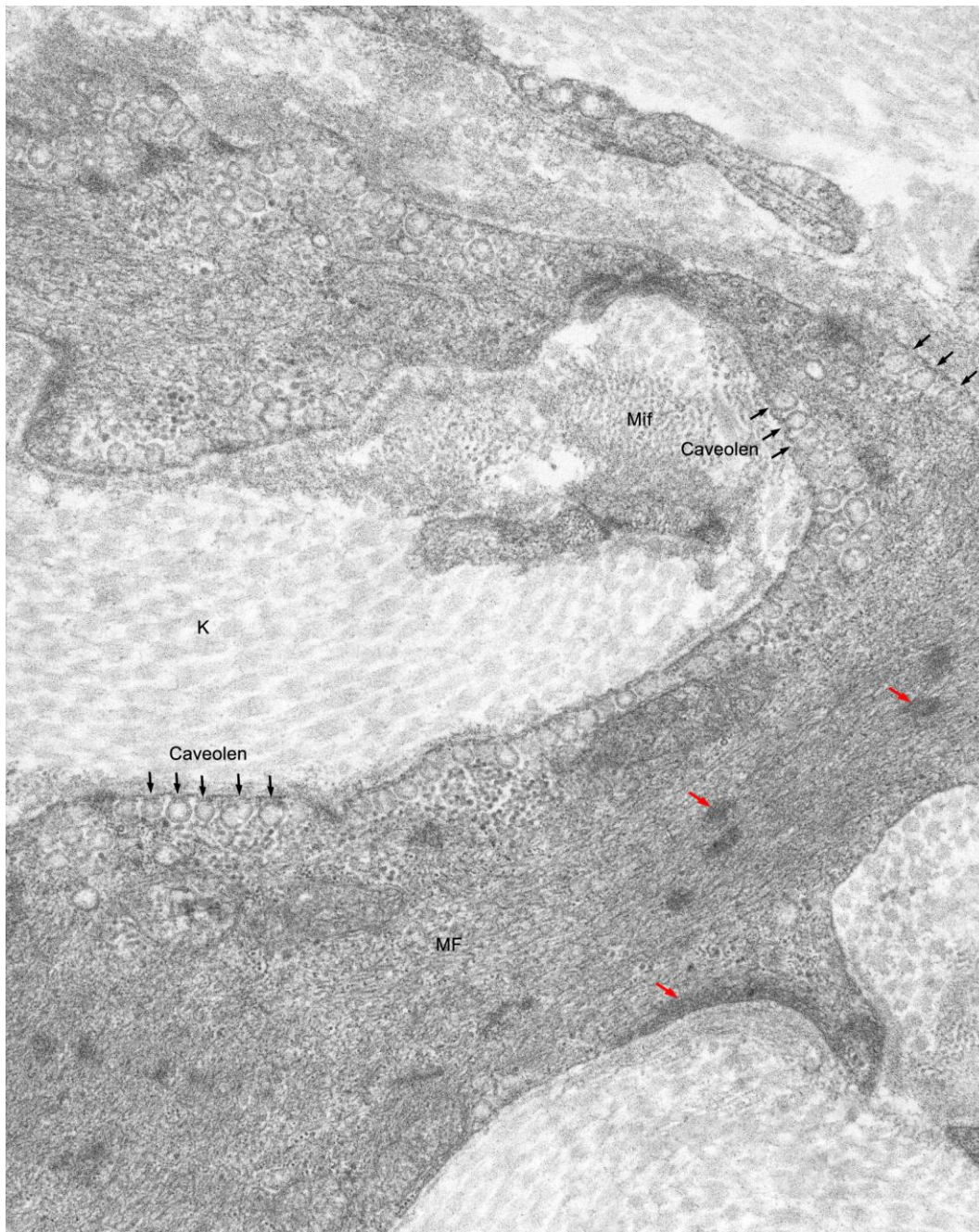


Abb. 76: Milztrabekel, TEM; Vergr. 21000-fach

Milztrabekel mit Myofibroblasten (MF), die hier glatten Muskelzellen gleichen. Im Zytoplasma dominieren Myofilamente, die Zellperipherie ist durch zahlreiche Caveolen gekennzeichnet. Membranverdichtungen (Pfeile); Mikrofibrillen (Mif); Kollagenfibrillen (K).

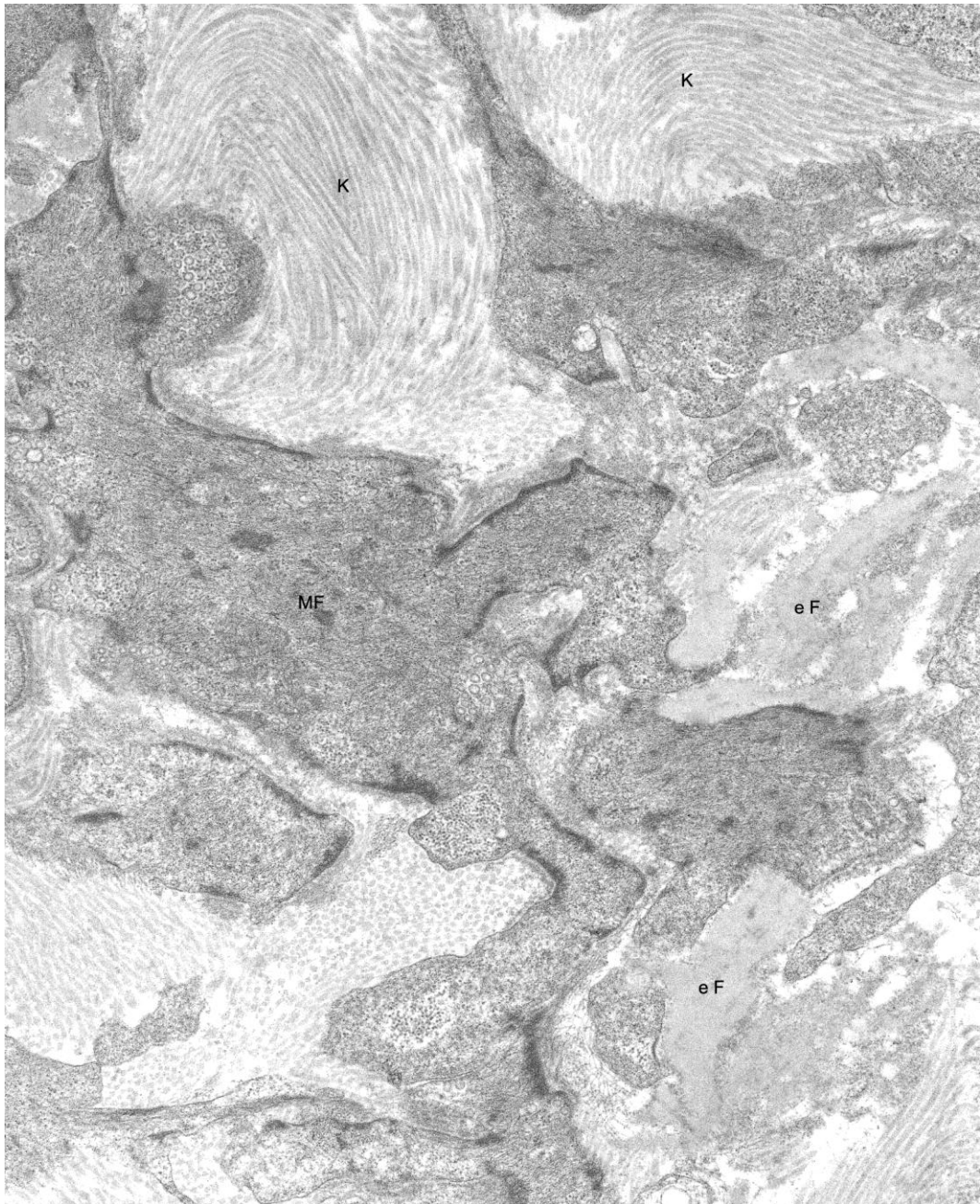


Abb. 77: Milztrabekel, TEM, Vergr. 8900-fach

Milztrabekel mit verzweigten Myofibroblasten (MF), die hier glatten Muskelzellen gleichen (viele Membranverdichtungen, sehr reich entwickelte Myofilamente und Caveolen). Die Zellen stehen in unmittelbarem Kontakt mit elastischen Fasern (eF) und Kollagenfibrillen (K).

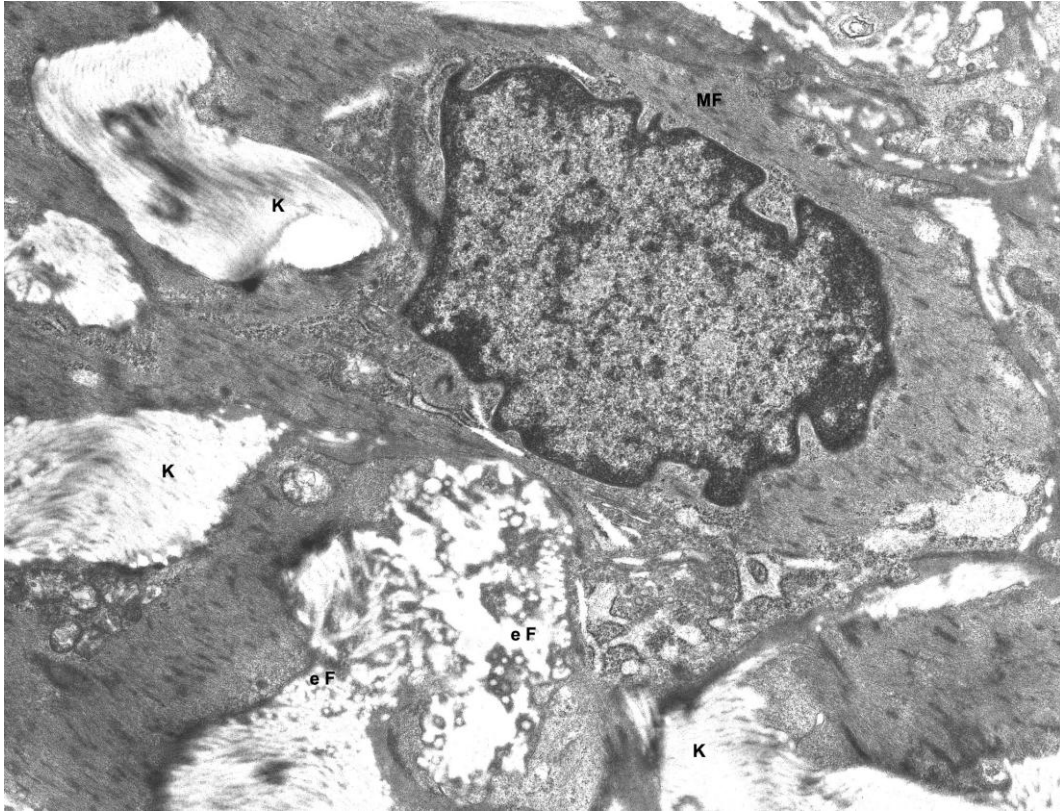


Abb. 78: Milztrabekel, TEM, Vergr. 8900-fach

Dichtes Geflecht aus verzweigten Myofibroblasten (MF), die meistens glatten Muskelzellen gleichen und Matrix aus Kollagen (K) und elastischen Fasern (eF).

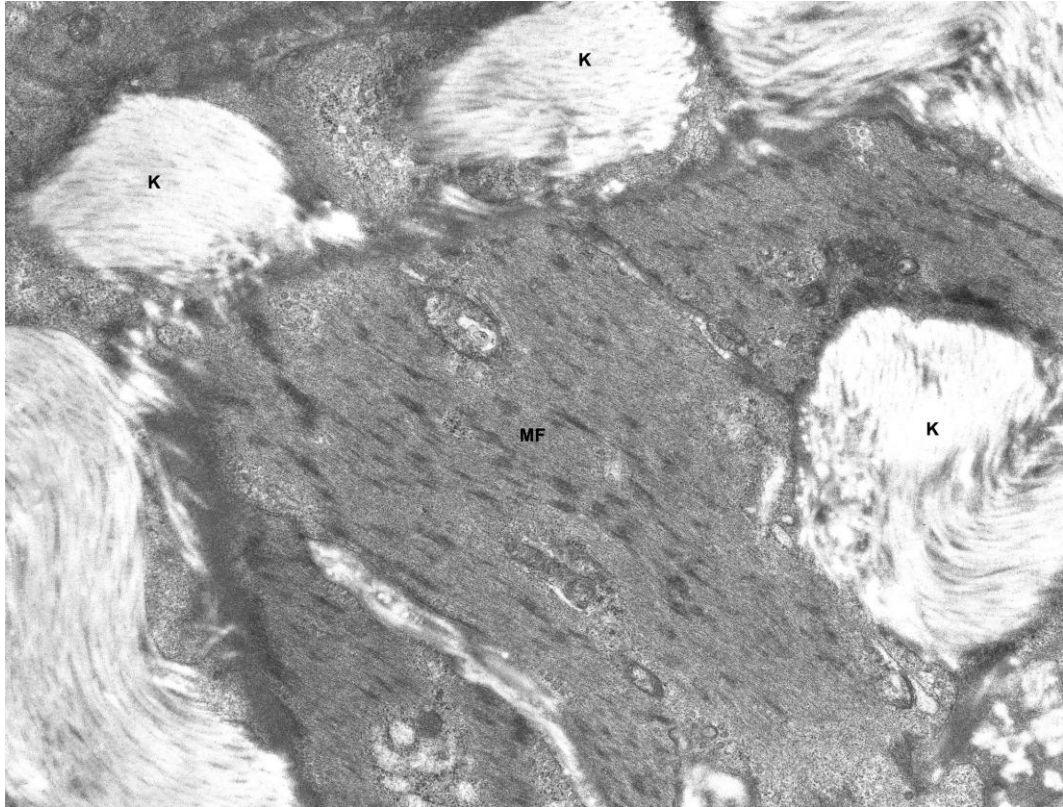


Abb. 79: Milztrabekel, TEM, Vergr. 8900-fach

Kompaktes Geflecht aus Myofibroblasten (MF), die hier wieder glatten Muskelzellen gleichen, und Kollagenfibrillen (K).

3.4.2 Sinus

Die Wand der Milzsinus besteht aus einer Schicht schlanker, langgestreckter Endothelzellen und einer lückenhaften Basallamina. Seitlich grenzen die Endothelzellen unmittelbar aneinander und sind nur durch einen schmalen Interzellularraum von ca. 20 nm getrennt. Größere Lücken wurden in keinem Fall gefunden.

Die Endothelzellen enthalten gut entwickeltes RER, viele Mitochondrien, einen mittelgroßen Golgi-Apparat, Lysosomen, Granula und viele Vesikel. Sie besitzen außerdem Mikrofilamentbündel, die längs im basalen Zytoplasma verlaufen. Intermediärfilamente sind in reichem Maße überall im Zytoplasma verteilt. Erythrozyten treten offensichtlich durch die Sinuswände der Endothelzellen hindurch (Abb. 80, 81). Die apikale und die laterale Membran der Endothelzellen sind auffallend reich an Endozytosefiguren.

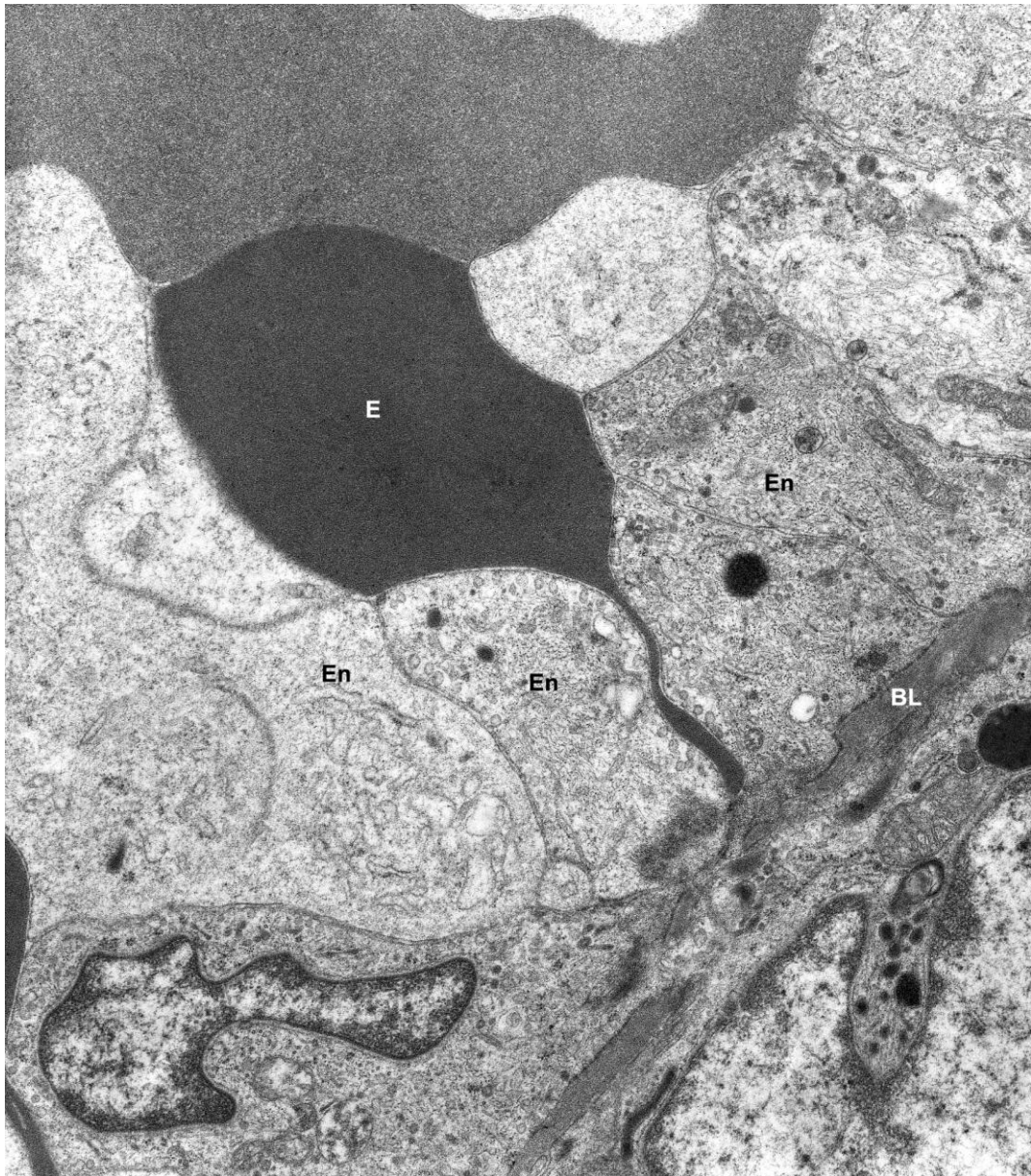


Abb. 80: Sinuswand, TEM, Vergr. 3900-fach

Die Sinuswand besteht aus dicht aneinander grenzenden Endothelzellen (En). Ein Erythrozyt (E) tritt offensichtlich durch das Endothel hindurch und verformt sich dabei stark, Basallaminastreifen (BL).

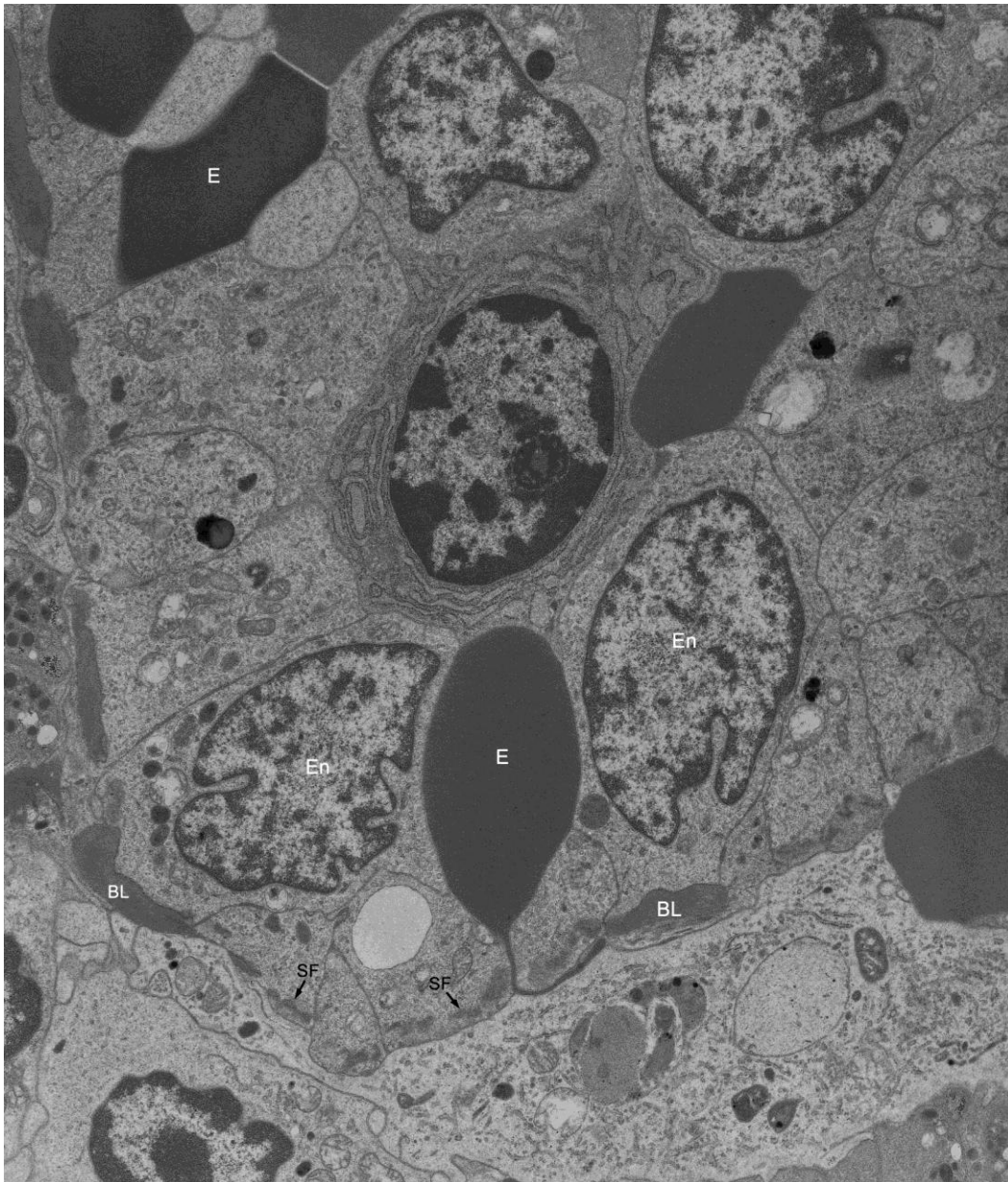


Abb. 81: Sinusendothel, TEM, Vergr. 8900-fach

Sinusendothel (En) mit offensichtlichen durchtretenden Erythrozyten (E); basale Stressfasern (SF); Basallaminastreifen (BL).

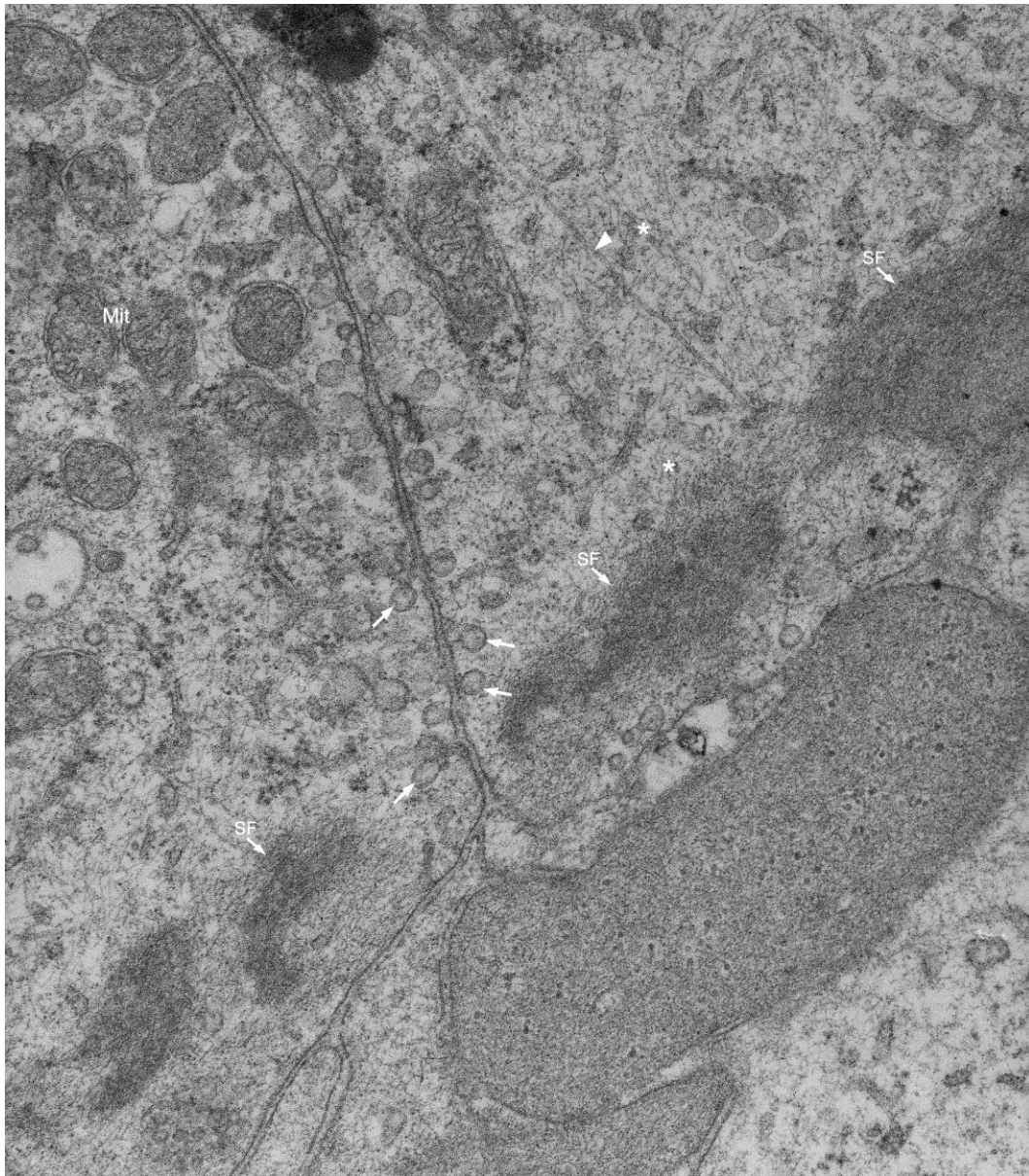


Abb. 82: Sinusendothel, TEM, Vergr. 21000-fach

Sinusendothel basal mit kräftigen Stressfasern (SF). Beachte auch die vielen Mitochondrien (Mit) und Endozytosevesikel (Pfeile) sowie Mikrotubuli (Pfeilkopf) und reich entwickelte Intermediärfilamente (*(Sternchen)).

3.4.3 Pulpavene

Die Pulpavene ist zu ihrem Lumen hin durch eine geschlossene Endothelschicht begrenzt (Abb. 83 bis 86). Zusätzlich können vereinzelt in der Wand schlanke glatte Muskelzellen auftreten (Abb. 83, 84).

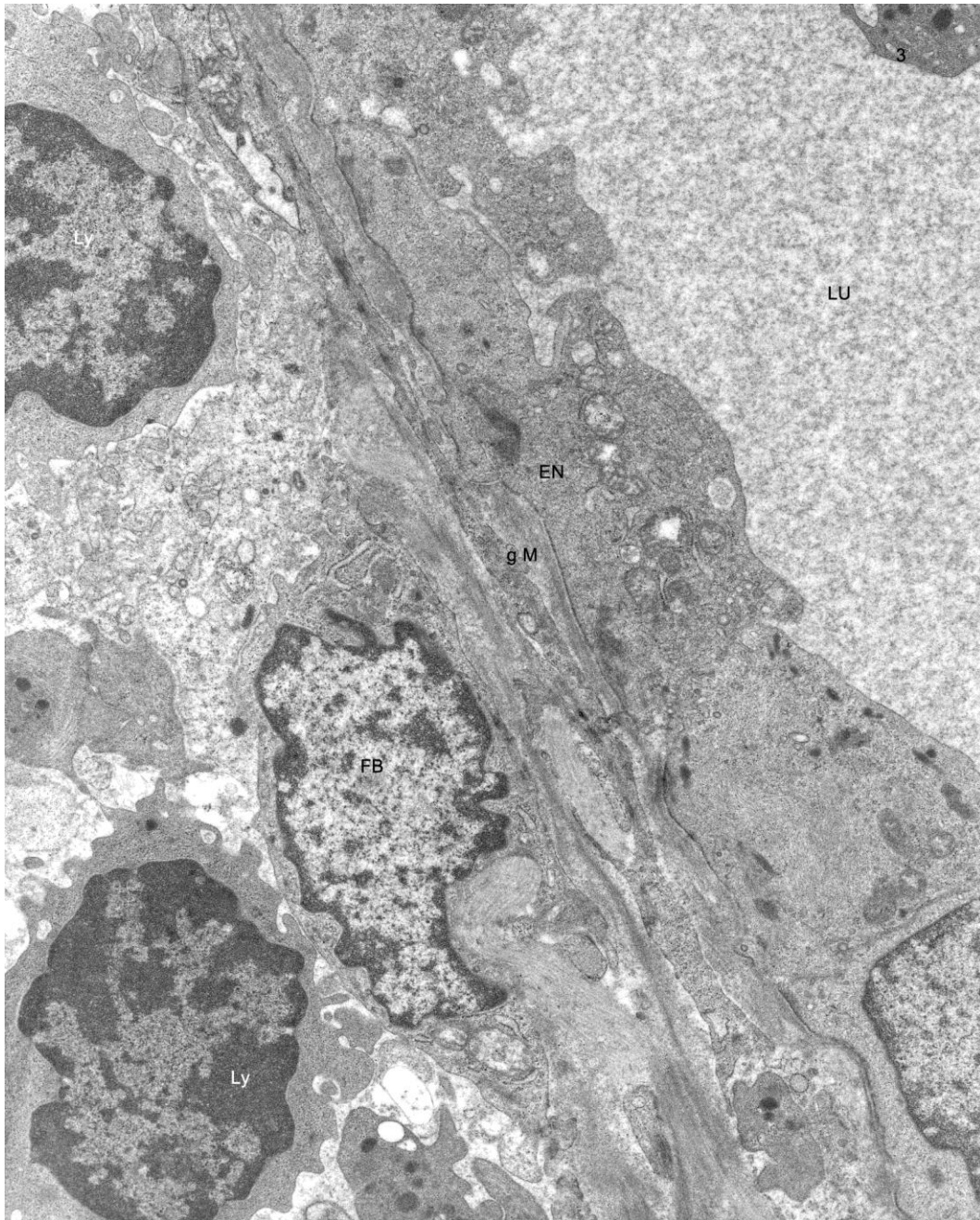


Abb. 83: Wand einer Pulpavene, TEM, Vergr. 5200-fach

Wand einer Pulpavene mit Endothel (EN) und einer einzelnen sehr schlanken glatten Muskelzelle (gM). Lumen der Pulpavene (LU); fibroblastische Retikulumzelle (FB), Lymphozyt (Ly).

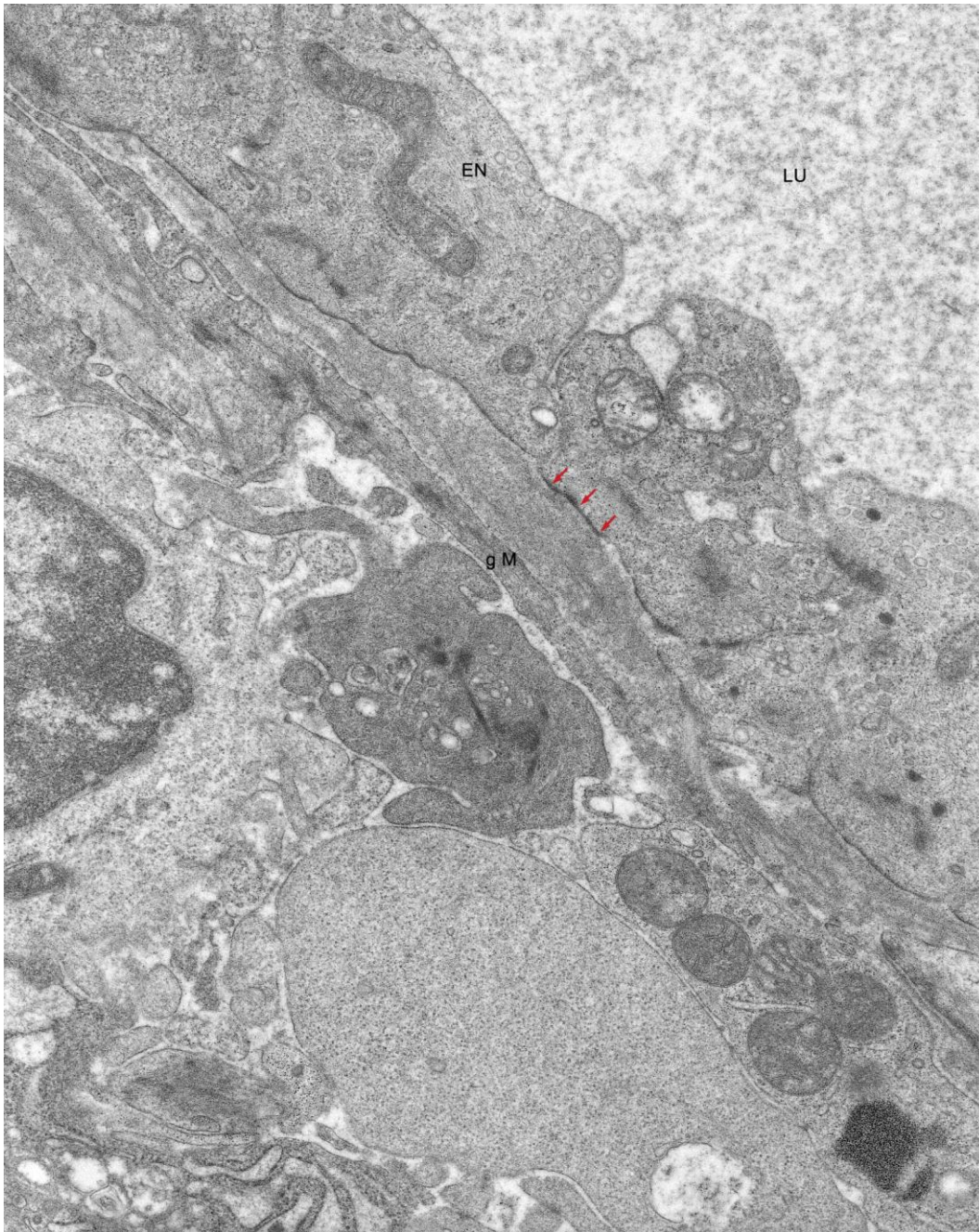


Abb. 84: Wand einer Pulpavene, TEM, Vergr. 8900-fach

Wand einer Pulpavene mit relativ hohem Endothel (EN), das generell gut entwickelte Organellen und ein gut entwickeltes Zytoskelett besitzt; Fokalkontakte zur Basallamina (Pfeile); einzelne glatte Muskelzelle (gM); Lumen der Pulpavene (LU).

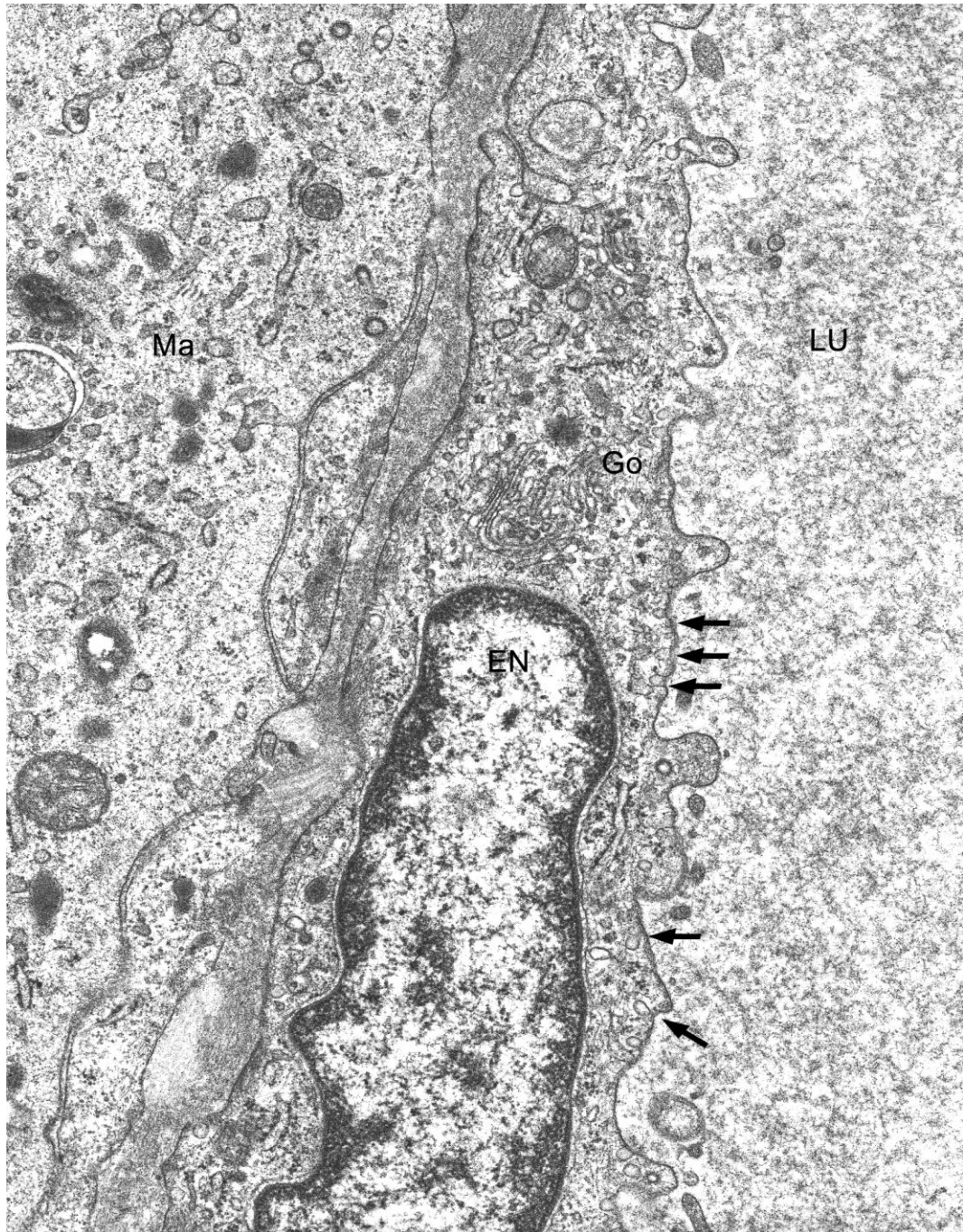


Abb. 85: Pulpavene, TEM, Vergr. 11500-fach

Endothelzelle (EN) einer Pulpavene mit relativ großem Golgi-Apparat (Go) und vielen Endozytosevesikeln (Pfeile); Lumen der Pulpavene (LU), Makrophage (Ma).

Die Venenwände bilden die dünne Barriere zwischen Blut und roter Pulpa.

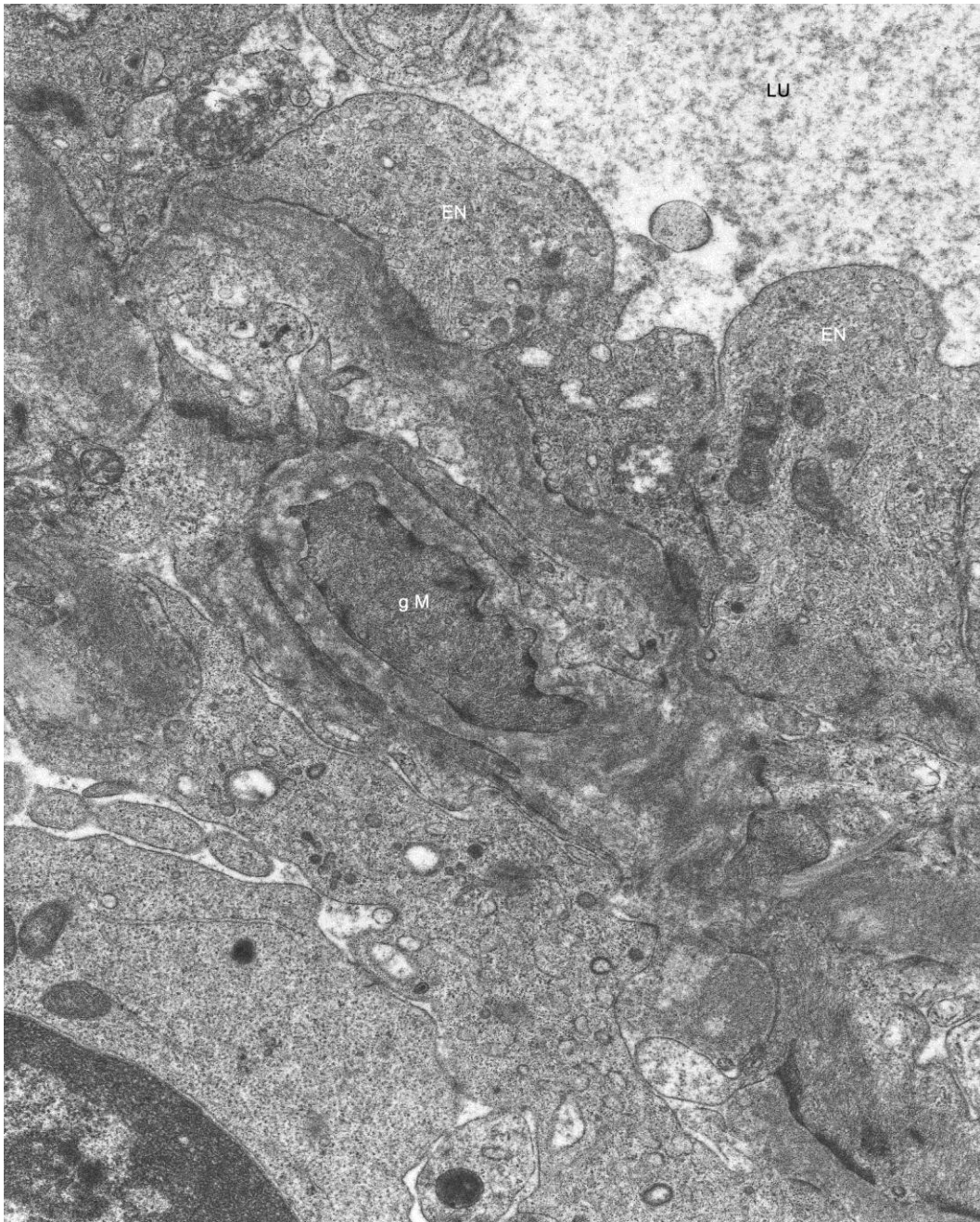


Abb. 86: Pulpavene, TEM, Vergr. 8900-fach

Wand einer Pulpavene mit Endothel (EN) und vereinzelt glatten Muskelzellen (gM); Lumen der Pulpavene (LU).

Ergebnisse

Färbemethoden		Übersicht		Kapsel		Trabekel		Gefäße										weiße Milzpulpa				rote Pulpa		Welche anatom. Strukturen werden angefärbt?					
		Erw.	Kind	Erw.	Kind	Erw.	Kind	Trabekelarterie		T.-Vene		Zentralarterie		Pinselfart.		Hülsenart.		Pulpavene		Follikel		Pals			retik. BG-Zellen		Sinus		
								Erw.	Kind	Erw.	Kind	Erw.	Kind	Erw.	Kind	Erw.	Kind	Erw.	Kind	Erw.	Kind	Erw.	Kind		Erw.	Kind	Erw.	Kind	Erw.
histologisch	H.E.	1	2	1	2	1						1						1		1,3	2, 4	5	4	1	2			rot: Kollagenfasern blau: Zellkerne	
	Azan	6	7	6	7	8	11,12	9,1	11	19	20	13	14	15,16	18	17	18	19	20					19	20	21		blau: Kollagenfasern, retikuläre Fasern rot: Zytoplasma, Zellkerne	
	Gomori		22	23	24	25	26	29,31	30		31					32	33				22			27	28	32		schwarz: Retikulinfasern (Typ III)	
histochemisch				34,35		35		36,37				38						39										blau-violett: Elastika, elastische Fasern	
Aldehydfuchsin																													
immunhistochemisch	Kollagen I			40																								braun: Kollagen I	
	Kollagen III			41	42	41																43						braun: Kollagen III	
	Aktin	44	45	44,46	45,47	44,46,51	45,48					44,49	45,50,52,53							44,49,51	45,50,52	44,49,51	45,50,52,53	44,54	46,47,48	54		braun: Aktin	
	alpha-Tubulin																									55		braun: Tubulin (Untereinheiten von Mikrotubuli, typisch in	
	Myosin II				56																			58		57	braun: Myosin II (u.a. in Kapsel und Trabekel, Endothel der Sinus, Makrophagen)		
	Vimentin																							59	60	59	60	braun: Vimentin (im Cytoskelett, glatte Muskulatur)	
	Connexin 43												61													62	61	braun: Transmembranproteine	
	CD 3												63																braun: T-Lymphozyten
	CD 8												64																braun: cytotoxische T-Lymphozyten
	CD20																				65	66			65	66			braun: B-Lymphozyten, Milzknötchen
	CD68																								67	68			braun: Makrophagen
	CD74												71												70	71			braun: B-Lymphozyten, Marginalzone, Keimzentrum
	NFPC																												braun: Nervenzellen
beta-Tubulin						73						73																braun: u.a. in Nervenzellen	
S100																												braun: a und b Untereinheiten u.a. in Nervenzellen	
TEM				75		76-79												83-86									80-82		

Tabelle 3: Übersicht der Abbildungen und jeweiligen anatomischen Strukturen der Milz

4 Diskussion

Mit dieser Studie konnte ein Beitrag zur Erweiterung histologischer, histochemischer und ultrastruktureller Kenntnisse der Milz des Menschen, und zwar von Kleinkind und Erwachsenen geleistet werden. Die erhobenen histochemischen und histologischen Befunde bestätigen, ergänzen und erweitern insbesondere die ausführlichen Befunde zur Milz von Ratte und Mensch von Steiniger und Barth (2000). Angesichts der individuellen Variabilität der mikroskopischen Milzstruktur des Menschen (von Herrath 1958; Bargmann 1977; Steiniger und Barth 2000) sind neue Befunde an gut fixiertem Material in jedem Fall wertvoll, um typische Verhältnisse charakterisieren zu können. Zwar gibt es aus den letzten zwei bis drei Jahrzehnten eine Reihe histologischer (van Krieken und te Velde 1988; Steiniger, Rüttinger et al. 2003) und elektronenmikroskopischer Untersuchungen (Fujita, Kashimura et al. 1982; Sasou, Satodate et al. 1986; Schmidt, MacDonald et al. 1988) über die Milz des Menschen, diese sind aber, wie schon in der Einleitung erwähnt, relativ wenig und schließen zumeist die Kindermilz in ihre Untersuchungen nicht mit ein. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen in der Literatur sind vor allem mit dem Rasterelektronenmikroskop durchgeführt, wohingegen in dieser Arbeit gut fixiertes Material mit dem aussagekräftigen Transmissionselektronenmikroskop untersucht wurde. In der Literatur und auch in Lehrbüchern der Medizin tritt immer mehr die Milz von Maus und Ratte in den Vordergrund, die, und das betonen auch Steiniger und Barth (2000), eine Reihe von morphologischen Unterschieden zur Milz des Menschen aufweist. Histologische Studien der Milz müssen auf kritisch ausgewählten und schonend operativ entfernten normalen Milzen basiert sein. Sie müssen für die Histologie, da sie zu den gut durchbluteten Organen gehören und die Autolyse sehr rasch einsetzt (Brinkmann und Madea 2004), nach Splenektomie unverzüglich weiterverarbeitet werden, um ein gut konserviertes histologisches Präparat zu erhalten. Eine Splenektomie ist lediglich unter bestimmten Umständen wie einer benignen oder malignen hämatologischen Erkrankung, Milzneoplasmen, Trauma, Entzündung etc. indiziert (Weh und Arps 1993). Solche Milzen zeigen aber meist Veränderungen im makro- und mikroskopischen Erscheinungsbild auf.

Wertvoll ist, dass für die vorliegende Untersuchung auch gut fixiertes Milzgewebe von drei Kindern (ein bis vier Jahre alt) zur Verfügung stand. All diesen Milzen war gemeinsam, dass die weiße Pulpa (PALS und Follikel) im Vergleich zu den Erwachsenenmilzen besonders gut entwickelt war. Bei einem Kind hat eine

Hepatitis C vorgelegen. Das mikroskopische Bild dieser Milz fiel aber nicht aus dem Rahmen, jedoch war die Struktur der Sekundärfollikel in diesem Fall besonders klar ausgeprägt. (Abb. 4, 7) und wahrscheinlich war auch die Zahl der Sekundärfollikel etwas größer als in den anderen untersuchten Kindermilzen.

Ein übergreifendes Ziel dieser Arbeit war es speziell mit immunhistochemischen Methoden möglichst viele Strukturen in der Milz mit kontraktile Eigenschaften zu erfassen, um u.U. Hinweise dafür zu erhalten, welche Zellen für den offenen Blutfluss durch die Pulpastränge und durch das Sinusendothel verantwortlich sein könnten. Diese Frage ist bisher nicht allseits befriedigend beantwortet, insbesondere bleibt der „Motor“ für den Durchtritt der Erythrozyten (und der Thrombozyten) durch die Sinuswand noch rätselhaft. Einen neuen Gesichtspunkt haben Steiniger und Barth (2000) in die Diskussion eingebracht, indem sie teilweise Fibroblasten (fibroblastischen Retikulumzellen) der weißen Pulpa kontraktile Eigenschaften zuwiesen. Die Kontraktilität der menschlichen Milz insgesamt wird als gering eingestuft (Bargmann 1977; Weiss 1983; Pabst 2004).

4.1 Kapsel und Trabekel

4.1.1 Myofibroblasten, glatte Muskelzellen

In der Azanfärbung nach Heidenhain können in Kapsel und Trabekeln etliche glatte Muskelzellen bzw. Myofibroblasten (rot) sowohl beim Erwachsenen als auch beim Kind nachgewiesen werden. Dieser Befund konnte anhand eigener Beobachtungen mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie bestätigt werden. Die Aussagen über die Anwesenheit typischer glatter Muskelzellen sind in der Literatur unterschiedlich. Übereinstimmend wird aber meistens beschrieben, dass ihr Vorkommen in Milzkapsel und Milzbalken eher spärlich ist (Bargmann 1977; Pabst 2004; Welsch 2010). So berichteten Glaser (1928) sowie Hartmann (1930) über wenige Muskelfaserzüge in der Milzkapsel des Menschen und Canna (1938) schreibt, dass die Muskelfasern beim Affen und Menschen in Kapsel und Trabekeln nicht gebündelt sind, sondern einzeln spärlich im Gewebe liegen. Abweichend hierzu sagte Grassi (1935), dass glatte Muskulatur reichlicher vorkommt, als sonst beschrieben wird. Unsere histologischen Befunde korrespondieren mit den Aussagen von Hofmann (1949). Dieser beschrieb u.a., dass die Befunde innerhalb der gleichen Milz wechselnd sind. Lubarsch (1927);

Hueck (1928) und Hofmann (1949) stimmen darin überein, dass glatte Muskulatur in den Trabekeln häufiger vorkommt als in der Kapsel. Lubarsch (1927) beobachtete Muskelfasern der Kapsel und in den Trabekeln in jeder Milz, sowohl beim Neugeborenen wie in jedem anderen Lebensalter. Die Mehrzahl der Zellen in Kapsel und Trabekeln wurde in der Vergangenheit als Fibrozyten angesehen.

Eine Lösung des Problems, welche Zellen in Kapsel und Trabekeln der Milz vorkommen, wurde durch folgende Fortschritte im Bereich von Histologie und Zellbiologie erleichtert, z.T. aber auch kompliziert: es wurde 1) bekannt, dass neben normalen matrixbildenden Fibrozyten an verschiedenen Stellen des Körpers auch Myofibroblasten vorkommen, die z.T. auch bei der Wundheilung aus Fibrozyten hervorgehen können. Die Myofibroblasten sind u.a. reich an Myofilamenten und können daher Kontraktionen ausführen. 2) wurde bekannt, dass auch glatte Muskelzellen in reichem Maße Matrix mit allen Komponenten bilden können; wenn dies im Vordergrund steht, bilden sich die Myofilamente zurück, an ihre Stelle treten dann die synthetisch aktiven Zellorganellen, z.B. das RER.

Die klaren Grenzen zwischen glatten Muskelzellen und Fibrozyten sind damit verwischt. Rein morphologisch und funktionell kann im Einzelfall nicht klar entschieden werden, ob ein Myofibroblast oder eine glatte Muskelzelle vorliegt, jedoch ist es plausibel, in einer Organkapsel und den von ihr ausgehenden Septen davon auszugehen, dass hier primär ein Bindegewebe vorliegt, so dass die Bezeichnung der myofilamentreichen Zellen als Myofibroblasten adäquat ist. Leonhardt (1990) schreibt dementsprechend, dass neben Fibrozyten Myofibroblasten in Kapsel und Trabekeln der Milz vorkommen. Den Begriff „glatte Muskelzellen“ erwähnt er nicht mehr.

Die Immunhistochemie brachte weitere Erkenntnisfortschritte, in dem sie kontraktile Proteine wie Aktin und Myosin II nachweisen konnte.

Die vorliegende Untersuchung hat ultrastrukturell und immunhistochemisch gezeigt, dass die meisten Zellen in Kapsel und Trabekeln der Milz des Menschen sehr reich an Myofilamenten sind; dazu kommen die eigentlich für glatte Muskelzellen typischen zahlreichen Caveolen, Fokalkontakte (oder Adhäsionsplaques) und zytoplasmatische Verdichtungen. Die Zellen gleichen also ultrastrukturell und somit auch funktionell glatten Muskelzellen, sollen aber auch hier Myofibroblasten genannt werden. Ein Teil der Zellen besitzt klar durch

Myofilamente begrenzte Felder mit Organellen, vor allem RER, wie es für Myofibroblasten typisch ist. Überraschend ist, wie zahlreich all diese Zellen in Kapsel und Trabekel vorkommen. Daher ist im Gegensatz zu der Mehrzahl der früher geäußerten Vermutungen anzunehmen, dass Kapsel und Trabekeln auch beim Menschen kontraktile sind. Die reich entwickelte straffe Bindegewebsmatrix mit zahllosen dichtgepackten Kollagenfibrillen dürfte jedoch das Ausmaß der Kontraktilität und auch der Dehnbarkeit der Kapsel einschränken. Die Zahl der elastischen Fasern ist geringer als die der Kollagenfibrillen, sie treten aber in einen unmittelbaren funktionellen Bezug zu den Myofibroblasten und werden zu deren Gegenspielern, so dass ein offensichtlich myoelastisches System vorliegt, das auch Dehnung der Milzkapsel und -trabekel zulässt. Überdehnung wird durch die reich entwickelten Kollagenfibrillen verhindert.

Typische Fibrozyten wurden in dieser Untersuchung gar nicht gefunden. Ihr Vorkommen ist aber nicht ausgeschlossen, da in keinem Fall ganze Milzen zur Verfügung standen, sondern im Allgemeinen „nur“ halbe, und die Gewebeproben nicht in Serie geschnitten wurden.

Ergänzend konnte mit dem immunhistochemischen Nachweis mit Antiaktin reichhaltig Aktin in Kapsel und Balken festgestellt werden. Aktin erfüllt verschiedene Aufgaben, u.a. bildet es in der Zelle dynamische Filamente, die sog. Aktinfilamente. Stabilisierend wirken sie als Bestandteil des Zytoskeletts auf die äußere Form, helfen mit bei der Verankerung von Transmembranproteinen oder sind bei der Zellmigration beteiligt. Sie können aber auch in der Zelle relativ konstante Strukturen bilden, wie den kontraktilen Apparat in Muskelzellen. Der Kontraktionsapparat aller Muskelzellen beruht auf einer Aktin-Myosin-II-Wechselwirkung. Ungeachtet dessen kann Aktin mit Myosin II auch in nichtmuskulären Zellen ein kontraktiles System bilden (Leonhardt 1990; Pollard und Earnshaw 2007; Alberts, Bray et al. 2010). Der überraschend stark positive Nachweis in unserer Studie von Aktin und Myosin II in Kapsel und Trabekeln sowohl in der Erwachsenen- als auch in der Kindermilz unterstützt die Annahme, dass Kapsel und Trabekel kontraktile Zellen (Myofibroblasten) enthalten.

4.1.2 Kollagenfasern

In Kapsel und Milzbalken konnte in der vorliegenden Untersuchung der Nachweis für Kollagenfasern in der Erwachsenen- und der Kindermilz erbracht werden. Die Beweise liefern hierbei mehrere Befunde (Azanfärbung nach Heidenhain, Versilberung nach Gomori, immunhistochemischer Nachweis von Typ I und III und die TEM). Im Lichtmikroskop sieht man die Kollagenfasern zum einen in groben Bündeln, teilweise parallel in Schichten und in Wellenform vorliegen, zum anderen weisen sie auch, dies ist bei stärkerer Vergrößerung sichtbar, zwischen jeweils benachbarten Fasern Torsionen auf. Im Milzbalken zeigen die inneren Schichten ein abweichendes Verhalten vom geordneten Faserverlauf und die Trabekel sind oft dicker als die Kapsel (Hofmann 1949; eigene Beobachtung). Kollagentyp I und III wird insbesondere von Fibroblasten, aber auch von Myofibroblasten und in Gefäßwänden auch von glatten Muskelzellen gebildet. Viele Kollagentypen bilden zylindrische Fibrillen (Durchmesser 20 bis 500 nm) mit einem typischen, sich alle 64 bis 67 nm wiederholenden Bandenmuster (Koolman und Röhm 2009). Die dichtgepackten Kollagenfibrillen, die der Kollagentypen I und III, können wir in den Bildern der Transmissionselektronenmikroskopie sehr deutlich und in reichlichem Maße in Kapsel und Milzbalken sehen. Charakteristisch für kollagene Fasern ist eine hohe Zugfestigkeit, und sie verleihen Kapsel- und Trabekelsystem der Erwachsenen- und Kindermilz die Eigenschaft, Zugbelastungen aus verschiedenen Richtungen entgegenwirken zu können.

Interessant ist, dass die jetzt erhobenen Befunde sowohl Kollagen vom Typ I als auch vom Typ III in Kapsel und Trabekeln nachgewiesen haben. Da der immunhistochemische Nachweis von Kollagen Typ I und III ähnlich ausfällt und im TEM überwiegend einheitliche Kollagenfibrillen erkennbar sind, könnte es sein, dass hier zumindest z.T. Fibrillen aus Typ-I und Typ-III-Kollagen vorliegen.

Interessant und neuartig ist, dass es in Kapsel und Trabekeln immer wieder Regionen gibt, in denen Kollagenfibrillen unterschiedlichen Kalibers und auch unterschiedlichen Umrisses zu beobachten sind (Abb. 72). Besonders der unregelmäßige Umriss deutet auf Umbauvorgänge der Kollagenfibrillen hin, wobei u.U. Protofibrillen umgelagert werden, wie von Erlinger et al. (1993) beschrieben wurde.

Augenfällig ist, dass beim Vergleich der Erwachsenenmilz mit der Kindermilz (Azan, Gomori) in Kapsel und Trabekel mehr Kollagenfasern beim Erwachsenen als beim Kind vorhanden sind. Die Kapsel der Erwachsenenmilz ist dichter und breiter als die der Kindermilz. Die Kapselverdickung mit fortschreitendem Alter von der Neugeborenen- über die Erwachsenen- zur Greisenmilz wurde schon von Hellman (1926) und Ghigi (1932) festgestellt. Die vorliegenden Befunde bestätigen die älteren Befunde.

4.1.3 Elastische Fasern

Die vorliegende Untersuchung konnte elastische Fasern in Kapsel und Trabekeln der Milz Erwachsener und Kinder nachweisen. Das Netzwerk ist engmaschig und die Fasern relativ fein. Elastische Fasern tragen zur Dehnbarkeit und Anpassungsfähigkeit bei Volumenschwankungen des Organs bei. Mitunter helfen sie den Kollagenfasern, wieder in ihre ursprüngliche Lage zurückzukehren (Ayad, Boot-Hanford et al. 1998). Die Produzenten für die Komponenten des Elastins sind Myofibroblasten. Außer typischen elastischen Fasern kommen auch Mikrofibrillenbündel vor, deren spezifische Funktion nicht ersichtlich ist.

4.2 Weiße Pulpa

4.2.1 Follikel

Beim Vergleich der Übersichtsbilder (H.E. Färbung, Azanfärbung und Silberimprägnation nach Gomori) der Milz von Erwachsenen und Kind fällt auf, dass quantitativ stets mehr Follikel in der Kindermilz auftreten als in der Erwachsenenmilz. Interessanterweise nimmt man bei der Mehrzahl der Follikel in der Kindermilz in erster Linie Follikel mit aktiven Zentren wahr. Beim Erwachsenen beobachten wir hier eher ruhende Primärfollikel und relativ selten auch Sekundärfollikel. Als Begründung steht vor allem der Aufbau des Immunsystems im Kindesalter im Vordergrund. Die Milz ist in ihrer funktionellen Bedeutung u.a. auch ein Immunorgan und so findet nach Antigenkontakt charakteristischerweise in den Sekundärfollikeln eine massenhafte Vermehrung von aktivierten B-Lymphozyten statt. Sie verwandeln sich in Plasma- und Gedächtniszellen (Murphy, Travers et al. 2009). Beim Erwachsenen ist hingegen das Immunsystem

bereits entwickelt, und es liegen quantitativ gesehen weniger Sekundärfollikel, aber vermehrt ruhende Primärfollikel vor. Beim Erwachsenen können „Überreste“ von Keimzentren überwiegen, weil Reaktionen von aktiven Keimzentren ohne zusätzlichen Antigennachschub nicht weiter am Laufen gehalten werden (Steiniger und Barth 2000). Die Follikel können auch ganz ohne Keimzentrum sein (Lüllmann-Rauch 2009, eigene Beobachtung).

In der vorliegenden Untersuchung konnte die Anwesenheit von CD-20-tragenden B-Lymphozyten mit Hilfe des immunhistochemischen Nachweises festgestellt werden. Auf allen Präparaten ist ein hoher Anteil an B-Lymphozyten in den rundlichen Follikeln zu erkennen. Im Grundsatz steht unsere Beobachtung in Übereinstimmung mit der einschlägigen Literatur, der zufolge die Follikel die hauptsächlich von B-Lymphozyten besiedelten Regionen sind (Leonhardt 1990; Steiniger und Barth 2000; Pabst 2004; Murphy, Travers et al. 2009; Lippert 2010).

CD-68-positive Zellen lassen sich im Keimzentrum, in der Korona und der marginalen Zone des Lymphfollikels eines Kindes auffinden. Ebenso lassen sich CD-74-tragende Zellen im Follikel nachweisen, insbesondere im Keimzentrum des Kindes. Hierbei handelt es sich zum größten Anteil um Makrophagen. Neben vorherrschenden B-Lymphozyten, 10 bis 30%-T-Helferlymphozyten, NK-Zellen und FDC-Zellen sind Makrophagen wesentliche Bestandteile im Keimzentrum eines Follikels. Im Keimzentrum phagozytieren sie bevorzugt die Zellkernreste gestorbener Lymphozyten (Pabst 2004).

Beim immunhistochemischen Nachweis mit Aktin fällt auf, dass sich in der Marginalzone des Lymphfollikels von Erwachsenen und Kind Zellen braun angefärbt haben. Das Netzwerk dieser aktinhaltigen Zellen teilt die Marginalzone in eine innere und eine äußere Zone ein. Gleichzeitig umschließen die aktinegefärbten Zellen auch die PALS von außen mit ein. Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelt es sich bei den aktinhaltigen Zellen um kontraktile Myofibroblasten. Steiniger und Barth (2000); Steiniger, Barth et al. (2001) konnten diese Myofibroblasten ebenfalls in ihren immunhistochemischen Studien in der perifollikulären Zone, in der äußeren Marginalzone und in der T-Zell-Zone beobachten. Die Anwesenheit kontraktiler Myofibroblasten führt zu der Frage, ob sie womöglich den Transit der immunkompetenten Zellen beeinflussen, insbesondere verlangsamen, um eine verbesserte Koordination der Immunzellgruppen zu erreichen und um eine effizientere Immunantwort generieren zu können.

4.2.2 Periarterielle Lymphozytenscheide (PALS)

Größere Akkumulationen von T-Lymphozyten wurden an den großen arteriellen Milzgefäßen sowohl beim Erwachsenen als auch beim Kind beobachtet. Die T-Zellen waren oft ungleichmäßig um die arteriellen Gefäße herum verteilt und bilden hier die PALS, die also unterschiedlich dick sein kann. Hin und wieder erschien die PALS völlig von einem Milzfollikel ersetzt zu sein. Die Studie von Steiniger, Rüttinger et al. (2003) konnte diese Beobachtung erstmalig mit Hilfe einer Analyse von Einzelschnitten und einer anschließenden rekonstruierten dreidimensionalen Darstellung ebenfalls machen. Die Autoren konnten zeigen, dass ein in der Entwicklung befindlicher Lymphfollikel eine solide Gefäßscheide aus T-Lymphozyten bis auf wenige Reste vollständig verdrängen kann, und sich T-Zell-Reste in der Marginalzone des Lymphfollikels befinden.

Im Bereich der periarteriellen Lymphozytenscheide (PALS) konnte der immunhistochemische Nachweis für Kollagen III erbracht werden. Das Kollagen III ist meist in retikulären Fasern enthalten und wird in der Humanmilz bei Erwachsenen und bei Kindern von fibroblastischen Retikulumzellen gebildet. Prinzipiell wird auch die weiße Pulpa von Retikulumzellen und aus retikulären Fasern zu einem dreidimensionalen Netzwerk aufgebaut, wie das auch in anderen lymphatischen Organen der Fall ist (Leonhardt 1990; Junqueira und Carneiro 2005).

Wie im Follikel lassen sich auch in den periarteriellen Lymphozytenscheiden aktinpositive Zellen markieren, die also vermutlich kontraktile sind. Desweiteren können auch CD-74-tragende B-Zellen und Monozyten wie beim Follikel in der PALS nachgewiesen werden. Van Krieken und te Velde (1988) sind der Auffassung, dass sich um die T-Zell-Zonen ebenfalls eine der „perifollikulären Zone“ vergleichbare Zone befindet und sich um die Arteriolen nicht nur T-Lymphozyten ansiedeln. Nach ihren Beobachtungen lassen sich dort anstatt des T-Zellareals auch Follikel und sogar Keimzentren auffinden. Die Follikel grenzen manchmal an T-Zellareale an, mit denen sie eine gemeinsame perifollikuläre Zone teilen. Die Vermutung liegt nahe, dass in der PALS in Analogie zu der Hypothese der aktinpositiven Anfärbung beim Milzfollikel (s.o. bei Follikel) der Transit immunologischer Zellen im T-Zellenareal durch die kontraktile Eigenschaften von Myofibroblasten verlangsamt werden soll, um einen intensiven gegenseitigen Signalaustausch der immunologischen Zellen, wie der T-Zellen, B-Zellen, Monozyten etc., zu ermöglichen.

4.3 Rote Pulpa/ Pulpastränge

Wie allgemein bekannt ist, besteht das Grundgerüst der roten Pulpa aus einem Maschenwerk aus retikulären Fibrozyten (fibroblastischen Retikulumzellen) und retikulären Fasern. Ebenso sind elastische Fasern im Bindegewebsgerüst vorhanden. In den Maschen der Pulpastränge wird Blut in die rote Pulpa abgegeben und daher halten sich hier eine Menge Blutzellen wie Erythrozyten und Thrombozyten auf. Außerdem ist hier auch der Aufenthaltsort für zahlreiche Makrophagen. Sie sollen die gealterten und defekten Erythrozyten und Thrombozyten erkennen und abbauen (Raviola 1997).

Bis heute gibt es kein allgemein anerkanntes Konzept für alle funktionellen Komponenten des offenen Kreislaufs der Mikrozirkulation innerhalb der roten Pulpa (Welsch, mündliche Mitteilung). Die Milz ist das einzige Organ des Menschen, in dem das Blut am Ende der arteriellen Gefäßstrecke extravasal verläuft. In den Pulpasträngen haben diese blutgefüllten Räume der roten Pulpa keine glatten endothelialen Wände ähnlich der von Blutgefäßen, sondern sie werden von Fibroblasten und ihren Ausläufern, die Kollagenfibrillen umscheiden, in ein unregelmäßiges Labyrinth eingeteilt. Diese Fibroblasten stehen also in unmittelbarem Kontakt mit dem Blut und unterscheiden sich so von anderen Fibroblasten des Körpers (Steiniger und Barth 2000). Es drängt sich daher die berechtigte Frage auf, mit welcher Antriebskraft die Erythrozyten durch das System der Pulpastränge und schließlich durch die Schlitze der Milzsinus geschleust werden. Es wurden zwar kinetische Untersuchungen bezüglich der Transitzeit von Erythrozyten durch die Milz des Menschen durchgeführt, z.B. von Jandl und Aster (1967), jedoch ist bis heute wenig bekannt über Transitzeiten der Blutkörperchen und den genauen Ablauf im offenen Kreislauf (Steiniger und Barth 2000). Das Wissen über die Mikrozirkulation in der Milz des Menschen ist noch unzureichend verstanden. Daher stellt sich auch die Frage nach der Existenz eines speziellen Blutflussantriebs. Auch in diesem Zusammenhang könnte die Anwesenheit von kontraktile Zellen eine wichtige Rolle spielen. Müller-Hermelink, von Gaudecker et al. (1981); Pinkus, Warhol et al. (1986) haben zu diesem Punkt Myofibroblasten in ihren histochemischen und ultrastrukturellen Untersuchungen der roten Pulpa beschrieben. In vorliegender Untersuchung konnten wir einen Aktinnachweis in den fibroblastischen Retikulumzellen der roten Pulpa führen und können somit die letztgenannten Autoren unterstützen. Weiterhin wird diese Annahme durch den Nachweis von Myosin II unterstützt.

4.4 Blutgefäße

4.4.1 Arterien: Trabekel-, Zentralarterien, Pinselarteriolen

Die vorliegende Untersuchung hat gezeigt, dass in den großen und mittelgroßen arteriellen Gefäßen der Milz von Erwachsenen und Kindern eine gut entwickelte glattmuskuläre Media vorliegt. Die Arterien zeigen den typischen dreischichtigen Wandaufbau von Blutgefäßen mit 1. Intima mit einer einfachen Lage von flachen Endothelzellen, wenig subendotheliales Bindegewebe und einer deutlichen *Elastica interna*, 2. Media mit dichtgepackten glatten Muskelzellen, Kollagenfasern des Typs III, einzelnen elastischen Fasern und der 3. Adventitia mit Kollagenfasern des Typs I in elastischen Fasernetzen (*Elastica interna*). Besonders bei den Trabekelarterien fallen die vielen glatten Muskelzellen in der relativ breiten Media ins Auge. Oft sind in der inneren Media die glatten Muskelzellen sogar längs ausgerichtet. Die Trabekelarterien führen das sauerstoffreiche Blut entlang der Trabekel ins Innere der Milz. Sie dringen dann in die rote Pulpa vor, wo sie seit altersher Zentralarterien genannt werden (Bargmann 1977).

Steiniger und Barth haben (2000) geäußert, dass es bei der Humanmilz fraglich erscheint, den Begriff „Zentralarterie“ bzw. „Zentralarteriole“ verwenden zu sollen. Der Begriff „Zentralarteriole“ bezieht sich eigentlich auf die zentrale Position der Arteriole innerhalb der periarteriellen Lymphozytenscheide, was in unseren Befunden eher eine Ausnahmeerscheinung und nicht den Regelfall darstellt. Oft ist der Gefäßverlauf nicht in der Mitte, sondern viel mehr exzentrisch in einer PALS lokalisiert. Wir können daher der Kritik der letztgenannten Autoren zustimmen, denken aber - wie Bargmann (1977), dass man es beim eingeführten Begriff belassen sollte.

Terminal verästeln sich die Zentralarteriolen in Pinselarteriolen (Bargmann 1977), die in unserem Material gleichermaßen glatte Muskelzellen aufweisen, aber keine PALS besitzen. Mit Hilfe von kontraktilen Zellen in Trabekel-, Zentralarterien und Pinselarteriolen wird eine regulierte Durchblutung der roten Pulpa ermöglicht.

In der vorliegenden Studie wurden regelmäßig Pinselarteriolen mit bis zu ca. 15 Ästen angetroffen (Abb. 15, 16). Lüllmann-Rauch (2009) nennt ihr Vorkommen „gelegentlich“.

4.4.2 Hülsenkapillaren

Die sich in kapillare Gefäße aufspaltenden Pinselarteriolen werden teilweise von einer sog. Hülse umgeben. Sie kommen in der Milz des Menschen relativ seltener vor und sind zudem deutlich kleiner als bei Hunden und Katzen. Nur gelegentlich und vereinzelt wurden in dieser Untersuchung Hülsen in der Milz des Menschen aufgefunden. Interessanterweise wurden in den Kindermilzen sowohl recht große als auch mehrschichtige Hülsen entdeckt. Darüber hinaus wurden sie bei den Kindern häufiger angetroffen als bei den Erwachsenen. Außerdem werden in unseren Präparaten der roten Pulpa der Kindermilz quantitativ mehr kleine Arteriolen und Metarteriolen als bei den Erwachsenen beobachtet. Diese Beobachtungen lassen die Vermutung zu, dass die Milz im Kindesalter generell eine lebhaftere Durchblutung als im Erwachsenenalter besitzt. Allerdings unterliegt der feinmikroskopische Aufbau der Humanmilz auch individuellen Schwankungen (van Krieken und te Velde 1988; Steiniger und Barth 2000) und so kann der vorliegende Befund auch einfach nur Ausdruck der Variabilität im anatomischen Aufbau der Milz des Menschen sein.

Wie in der Literatur angegeben, besteht eine Hülse (Ellipsoid) aus retikulären Fasern, was die vorliegende Untersuchung bestätigt. Ob sich auch Myofibroblasten und Makrophagen explizit im Areal der Hülsen befinden, ist unklar. Letztgenannte Zellen findet man jedoch zahlreich innerhalb der roten Pulpa.

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, sind die genauen topographischen und strukturellen Verhältnisse um die Hülsenkapillaren in der Milz des Menschen noch weitgehend ungeklärt, und sie bedürfen zukünftiger weiterer Untersuchungen.

4.4.3 Pulpa- und Trabekelvenen

Eine Eigentümlichkeit der Pulpa- und Trabekelvenen in der Milz des Erwachsenen und Kindes besteht laut Literatur darin, dass sie keine Muskulatur besitzen (Leonhardt 1990). Jedoch können wir in vorliegender Studie eindeutig kontraktile Strukturelemente in Form von feinen glatten Muskelzellen in den mittelgroßen und weitleumigen Pulpa- und Trabekelvenen der Milz des Menschen anhand von TEM-Aufnahmen nachweisen. Dennoch bleibt die Tatsache, dass diese Gefäße ungewöhnlich dünnwandig sind, was in Azanpräparaten besonders klar erkenn-

bar ist. Daraus folgt, dass in den Sinus-, den Pulpa- und den Trabekelvenen der Blutstrom nur unwesentlich durch die eigene Wandmuskulatur angetrieben wird (Weiss 1983).

Weiss (1983) geht davon aus, dass vielleicht aus diesem Grund das Milzvenenblut mit Makrophagen angereichert ist und diese schließlich in der Leber bzw. in den Lungen abgebaut werden.

Mit Hilfe der Aldehydfuchsinfärbung konnten zudem die elastischen Fasern in der Wand der Pulpavenen und Trabekelvenen sichtbar gemacht werden. Unsere Beobachtungen stehen mit denen von Klemperer (1938) in Einklang, der die Aussage machte, dass die Pulpavenen beim Menschen insbesondere durch ein dichtes Netzwerk retikulärer und elastischer Fasern von der umgebenden Pulpa getrennt seien.

4.4.4 Milzsinus

Ein weiterer wichtiger funktioneller Abschnitt ist der Übergang von roter Pulpa zu den Milzsinus. Hier findet vor allem die Blutfilterung innerhalb der Milz statt. Die schlanken über 100 µm langen Endothelzellen (Bargmann 1977) des Milzsinus liegen nebeneinander und bilden ein Endothel, das für Blutzellen, auch für Erythrozyten, durchgängig ist. Erythrozyten, die das Endothel nicht überwinden können und nicht zurück in den Blutkreislauf gelangen, werden von Makrophagen eliminiert (Pabst 2004). Ob zwischen den Endothelzellen physiologischerweise konstant Schlitze oder Poren vorkommen (Bargmann 1977), bleibt unsicher (Steiniger und Barth 2000). Im gut fixierten EM-Material dieser Studie ließen sie sich in keinem Fall beobachten, was dafür spricht, dass diese nur temporär gebildet werden.

Vermutlich Bündel aus Aktinfilamenten, sog. kontraktile Stressfasern, können wie diese Studie gezeigt hat, basal und lateral in den Endothelzellen beobachtet werden. Diese Fasern enthalten Aktin und Myosin II (Drenckhahn und Wagner 1986; Pabst 2004, diese Arbeit) mit denen sie möglicherweise die Breite der Schlitze verändern und Einfluss auf die Filterfunktion der Milz und die Blutflussregulation nehmen können. Als erste haben vermutlich De Bruyn und Cho (1974) auf die Existenz kontraktiler Filamente in den Sinusendothelzellen hingewiesen.

In unserem Material ist der Ausfall des Aktin- und Myosin II Nachweises im Sinusendothel kräftig, was auf eine wichtige funktionelle Rolle hinweist: u.U. auf die aktive Rolle bei der Bildung von Poren oder Schlitzen. Da die Sinusendothelzellen schlanke stabförmige Zellen sind, könnte es sein, dass sie sich vor allem parallel zur Längsachse kontrahieren. Dabei könnten an Stellen, an denen die basale Zellmembran nicht stabilisiert ist, z.B. zwischen den Reifenfasern, Schlitze entstehen.

Der Nachweis von Connexin 43 im Sinusendothel weist auf eine funktionelle Kopplung der Endothelzellen hin, was u.U. mit der Bildung von Schlitzen zwischen den Endothelzellen korrelierbar ist.

Das Sinusendothel weist weitere Besonderheiten auf, es besitzt z.B. ein ungewöhnlich reich entwickeltes System aus Intermediärfilamenten, die, wie die Immunhistochemie zeigt, aus Vimentin aufgebaut sind. Dieses System verfestigt die Endothelzellen und deutet auf starke mechanische Belastungen, die u.U. bei der Wanderung von Zellen durch das Endothel auftreten können. Die auffallend zahlreichen Endozytosefiguren an der apikalen und lateralen Membran der Endothelzellen sind u.U. Ausdruck eines intensiven Membranrecyclings, was auf die Möglichkeit der Vergrößerung oder Verkleinerung der Endothelzellen hindeuten könnte. Die ungewöhnlichen und typischen Reifenfasern des Sinusendothels können plausibel als Anpassung an durchtretende Erythrozyten und andere Blutzellen gedeutet werden; es fällt eine Komponente der endothelialen Barriere weg, was die Migration gerade der nichtmotilen Erythrozyten erleichtern würde. Die Angabe (Bargmann 1977), dass sich die Reifenfasern mit Elastikafarbstoffen, und nicht mit Silberimprägnationsmethoden anfärben lassen, kann in dieser Untersuchung nicht bestätigt werden.

4.5 Nerven

Die immunhistochemischen Färbungen mit NFPC, Beta-Tubulin und S100 haben gezeigt, dass Nervenfasern periarteriell der Trabekeln verlaufen. Die die Humanmilz innervierenden, nicht-myelinisierten Nervenfasern gelangen vom Hilus in die Milz und begleiten das arterielle Gefäßsystem zur roten Pulpa. Den Nachweis kleinerer vegetativer Nervenfasern lassen die genannten Methoden nicht zu. Etwas enttäuschend ist, dass keine Nervenfasern in Kapsel und

Trabekel zu beobachten waren, auch nicht im TEM. Heusermann und Stutte (1977) fanden in der Milz Nervenfasern bei den glatten Muskelzellen innerhalb der Blutgefäßwände, wie es für das autonome Nervensystem typisch ist. Mit aller Wahrscheinlichkeit enthalten solche Terminalaxone der Nervenfasern Noradrenalin, es wurden aber neben adrenergen auch cholinerge Nervenfasern in der Nähe von Trabekelarterien beobachtet (Kudoh, Hoshi et al. 1979). Wiederum andere Autoren berichten (Nance und Sanders 2007), dass B- und T-Lymphozyten Beta-2-adrenerge Rezeptoren exprimieren können. Wir vermuten, dass die Bedeutung der Innervation in der Nähe der Blutgefäße in der Durchblutungsregulation liegen könnte. Die in der Literatur beschriebene Nähe von Terminalaxonen und Lymphozyten in der Milz weist darauf hin, dass Immunreaktionen vom Nervensystem beeinflusst werden könnten (Pabst 2004). Darüber hinaus ist ebenfalls bekannt, dass durch Adrenalininjektionen Milzkontraktionen ausgelöst werden (Schaffner, Augustiny et al. 1985) und wir nehmen an, dass diese wiederum Einfluss auf die Passage der Erythrozyten in der Milz nehmen können.

4.6 Ausblick

Trotz ihrer vielfältigen Aufgaben z.B. bei immunbiologischen Abwehrvorgängen, Erythrozytenabbau, Blutbildung in der Embryonal- und Fetalzeit sowie als Thrombozyten- und in geringem Maße als Blutspeicher wird die Milz zu den eher nicht lebensnotwendigen Organen gezählt. Ihre Funktionen können von anderen Organen übernommen werden siehe Lippert (2010).

Jedoch wurde in jüngeren Studien festgestellt, dass die Milz eine außergewöhnliche Rolle spielt bei der primären Antikörperantwort gegen Bakterien mit Polysaccharidkapseln (Hosea 1983; Kraal 1992; Steiniger und Barth 2000; Breukels, Zandvoort et al. 2001). Es wird vermutet, dass insbesondere die Marginalzone der Lymphfollikel daran beteiligt ist (Timens, Boes et al. 1989; Timens 1991; Peset Llopis, Harms et al. 1996).

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, befinden sich in der Marginalzone hauptsächlich spezielle IgM-positive und IgD-negative oder schwach IgD-positive B-Gedächtniszellen (Spencer, Perry et al. 1998; Steiniger, Barth et al. 2001), die sehr rasch IgM-Antikörper gegen Polysaccharide aus Bakterienzellwänden bilden können. Durch sie werden Makrophagen und andere Zellen zur Sekretion bestimmter Zytokine angeregt (z.B. TNF), welche lokal zwar hilfreich für die Abwehr

sind, bei hoher Konzentration und systemischer Verteilung jedoch verheerende Wirkung haben. Für Menschen ohne Milz besteht ein erhöhtes Risiko, einem septischen Schock zu erliegen (OPSI, overwhelming post-splenectomy infection) (Lüllmann-Rauch 2009).

Natürlicherweise ist vor allem bei Kindern die Marginalzone ungenügend ausgereift (Timens, Boes et al. 1989) und sie können bei einer Sepsis, beispielsweise durch Pneumokken oder Meningokokken ausgelöst, schnell versterben (Murphy, Travers et al. 2009). Daher wird heutzutage auch der Standpunkt vertreten, dass die Milz nicht mehr zu den entbehrlichen Organen gehört, dass aber ihr Fehlen meist kompensiert werden kann (Pabst 2004). Jüngere Untersuchungen an der Milz beschäftigen sich aus diesem Grund häufig mit immunhistochemischen Fragen (Steiniger, Timphus et al. 2006).

Aber auch andere Funktionssysteme der Milz des Menschen bieten noch offene Fragen, so ist z.B. die Funktionsweise der Mikrozirkulation innerhalb der roten Pulpa noch nicht vollständig aufgeklärt worden. Es liegen viele Hinweise dafür vor, dass der Blutkreislauf in den Pulpasträngen z.T. offen ist, es bleibt aber nicht exakt geklärt, in welchem Ausmaß. Es fehlen dazu auch klare dreidimensionale moderne Rekonstruktionen; es bleibt auch unklar, in welchem Ausmaß Arteriolen und Metarteriolen die Durchblutung regulieren. In manchen Präparaten findet man relativ viele Arteriolen, von denen die Mehrzahl geschlossen zu sein scheint. Auch in gut fixiertem EM-Material findet man solche verschlossenen kleinen Arteriolen, wobei natürlich der Einfluss des Fixierungsmittels zu bedenken ist.

Es geht bei solchen Fragen vor allem darum, wie die gesunden Erythrozyten über die Endothelbarriere der Milzsinus kommen, was also der Motor für den Durchtritt durch das Sinusendothel ist.

Wir vermuten, dass neben dem hydrostatischen Blutdruck die Kontraktionsfähigkeit des Parenchyms eine entscheidende Rolle bei der Weiterbewegung der Erythrozyten spielt. Wir vermuten, dass die Kontraktion 1) der Myofibroblasten mit glattmuskulären Eigenschaften in Trabekeln und Kapsel und 2) der fibroblastischen Retikulumzellen eine Druckerhöhung innerhalb des Parenchyms auslöst, wodurch Blutzellen in die Sinus gepresst werden könnten.

Hinsichtlich all unserer nachgewiesenen kontraktilen Elemente in der Kapsel, in den Trabekeln, in der PALS, in der marginalen Zone, in der perifollikulären Zone, in der roten Pulpa und in den Blutgefäßen wäre es gedanklich durchaus möglich,

dass sich das ganze Milzparenchym zusammenziehen kann. Zwar sind in der roten Pulpa kontraktile Elemente nicht so prominent vertreten wie z.B. in Kapsel- und Trabekelwerk, dennoch ist es wahrscheinlich, dass auch sie einen Beitrag zum Antrieb des Blutflusses und der Blutfilterung leisten.

Unsere Befunde sprechen dagegen, dass der Durchtritt durch das Sinusendothel ein einfacher Prozess ist, bei dem die Erythrozyten durch vorbestehende offene Löcher strömen. In zahlreichen gut fixierten Sinusausschnitten haben wir nie eine offene Pore gesehen. Dies lässt die Vermutung entstehen, dass das Sinusendothel eine aktive Rolle beim Durchtritt spielt und bei „Bedarf“ Öffnungen schafft. Welche Mechanismen zur Bildung einer Öffnung führen könnten (Aktin und Myosin II sind vermutlich beteiligt), bleibt unklar; die Öffnung scheint aber im Bereich des Interzellularspalts zu liegen, der vermutlich erweitert wird. Erstaunlich ist das Ausmaß der Verformung der Erythrozyten bei der Passage durch die Sinuswand.

Welche Rolle die Myofibroblasten der weißen Pulpa dabei spielen und inwiefern sie in unsere Darstellung hineinpassen, ist ebenfalls nicht geklärt. In der marginalen Zone halten sich Myofibroblasten oft assoziiert mit CD-4-positiven T-Lymphozyten auf (Steiniger, Barth et al. 2001). Diese Autoren stellten die Hypothese auf, dass die rezirkulierenden CD-4-positiven T-Lymphozyten auf dem Weg des „offenen“ Kreislaufs, und zwar aus der perifollikulären Zone kommend, in die weiße Pulpa eintreten, ohne eine Endothelbarriere überwinden zu müssen. Die spezialisierten Fibroblasten könnten die Aufgabe besitzen, diese T-Zellen an sich heranzuziehen und ihnen den Weg zur T-Zell-Zone zu weisen.

Zum besseren Verständnis der Mikrozirkulation in Bezug auf den „offenen“ und „geschlossenen“ Kreislauf könnten weitere morphologische Studien, vor allem dreidimensionale Rekonstruktionen in der roten Pulpa und in der perifollikulären Zone beitragen. Solche Rekonstruktionen sind auch schon in Angriff genommen worden (Heinzeller, Aschauer, mündliche Mitteilung), haben aber noch keine schlüssigen Ergebnisse gebracht.

5 Zusammenfassung

In vorliegender Arbeit konnte mit histologischen, histochemischen, immunhistochemischen und elektronenmikroskopischen Methoden die Milz des Menschen anhand gut fixierten Materials untersucht werden, wobei der Nachweis kontraktiler Strukturen in Kapsel, Trabekelsystem und Pulpa im Vordergrund des Interesses stand. Wegen der guten Qualität des Erhaltungszustandes des Milzgewebes wurden auch andere erhobene Befunde dokumentiert, zumal gerade in diesem Organ alle Funktionsbereiche ineinander greifen. Es stand Milzgewebe von Kleinkindern und Erwachsenen zur Verfügung.

Die Suche nach kontraktilen Zellen hat das Ziel, Antworten auf die Frage nach dem „Motor“ der Bewegung roter Blutzellen im abschnittsweise offenen Kreislauf in der roten Pulpa zu finden.

Besonders wertvolles Material sind die Kleinkindermilzen. Im Kindesalter ist die Milz intensiv am Aufbau des Immunsystems beteiligt, und es ist - auch nach Hinweisen in der Literatur - zu erwarten, dass sich die Milzen von Kindern und Erwachsenen unterscheiden.

Interessanterweise konnten auch im vorliegenden Material im direkten Vergleich der Erwachsenen- und Kleinkindermilzen einige Unterschiede der Mikroanatomie festgestellt werden. So wurden in der Kleinkindermilz deutlich mehr Sekundärfollikel nachgewiesen als beim Erwachsenen. Dies deutet auf eine erhöhte Immunaktivität der Kleinkindermilz. Umgekehrt wurden beim Erwachsenen vermehrt ruhende Primärfollikel vorgefunden.

Weitere Merkmale erhöhter Immunaktivität der Kleinkindermilz zeigten sich in den Nachweisen von CD-68- und CD-74-haltigen Makrophagen. In Gegenüberstellung der Erwachsenenmilz und der Kleinkindermilz wiesen die Kleinkindermilzen quantitativ mehr CD-68- und CD-74-tragende Zellen auf als die Erwachsenenmilzen.

Weitere Unterscheidungsmerkmale konnten bei der Beobachtung der kleinen Blutgefäße in der Humanmilz gemacht werden. Vor allem Pinselarteriolen und Hülsenkapillaren wurden mengenmäßig beim Kleinkind häufiger angetroffen als beim Erwachsenen. Diese Feststellung lässt ebenfalls die Annahme zu, dass die Kleinkindermilz wesentlich aktiver als die Erwachsenenmilz ist.

Auch der Ausprägungsgrad der Bindegewebsstrukturen unterscheidet sich bei Erwachsenen und Kleinkindern. So waren die Milzkapsel und die Trabekeln des Erwachsenen im Gegensatz zum Kleinkind dichter und breiter als diejenigen des Kindes.

Schwerpunktmäßig widmete sich vorliegende Studie speziell den kontraktiven Elementen der Humanmilz. Kontraktile Zellen mit glattmuskulären Eigenschaften und mit Aktin- wie Myosinfilamenten konnten reichhaltig im Kapsel- und insbesondere im Trabekelwerk nachgewiesen werden. Sie werden hier als Myofibroblasten bezeichnet. Eindrucksvoll repräsentierten sie sich in großer Zahl in den Aktin-, Myosin II-, Azan- und TEM-Präparaten. Mit hoher Wahrscheinlichkeit sind die kontraktiven Myofibroblasten in Kapsel- und Trabekelwerk Teil eines komplexen Kontraktionsmechanismus in der Milz und spielen eine Rolle im Zusammenhang mit dem Weitertransport der Erythrozyten und wohl auch bei der Blutfilterung im Milzparenchym. Unter Blutfilterung werden hier Aussortieren und Abbau alter Erythrozyten in den Pulpasträngen der roten Pulpa verstanden.

Myofibroblastenähnliche Zellen zeigten sich auch im Bereich der Follikel. Hier dürften sie speziell differenzierte fibroblastische Retikulumzellen sein. Sie gliedern die Marginalzone in eine innere und äußere Zone. Darüber hinaus umschließen sie in der Nachbarschaft einer Zentralarteriole die PALS mit ein. Vermutlich dient die Anwesenheit von kontraktiven Zellen in diesem Bereich der Regulation des Flüssigkeitsstromes im Stroma, um eine länger andauernde Kontaktmöglichkeit der einzelnen Immunezellgruppen zu erreichen.

Auch die fibroblastischen Retikulumzellen der roten Pulpa sind vermutlich kontraktiv, was neben dem Blutdruck der offenen Arterien und Arteriolen zum Weitertransport der Erythrozyten beitragen könnte.

In den Milzsinus konnten basal in den Endothelzellen kontraktive Filamentbündel beobachtet werden, die Aktin und Myosin enthalten. Möglicherweise wird mit ihnen die Breite der Schlitze verändert. Daraus folgt, dass somit Einfluss auf die Filterfunktion der Humanmilz und die Blutflussregulation genommen werden kann.

Zahlreiche glatte Muskelzellen konnten in der Wand der Trabekel-, Zentralarterien und Pinselarteriolen nachgewiesen werden. Diese Gefäße entsprechen in ihrem Wandaufbau den Arterien vom muskulären Typ. Aufgabe der glatten Muskelzellen der Arterienwände ist die Blutflussregulation in der Milz.

Die ungewöhnlich dünnwandigen Wände der Trabekel- und Pulpavenen besitzen eine durchgehende Basallamina unter den Endothelzellen. Diese Zellen waren nicht fenestriert, so wie es für bestimmte Venolen typisch ist. In dieser Studie konnten in den Wänden der genannten Venen vereinzelte glatte Muskelzellen nachgewiesen werden, was in der Literatur im Allgemeinen bestritten wird.

Bis heute konnte die physiologische Bedeutung der kontraktilen Zellen innerhalb der Humanmilz nicht vollständig geklärt werden. Unsere Studie konnte mit morphologischen Methoden zahlreiche kontraktile Elemente in diversen mikroanatomischen Abschnitten der Milz nachweisen. Diese Zellen erhalten trotz im Wesentlichen gleicher Funktion und gleicher oder z.T. ähnlicher Ultrastruktur verschiedene Namen: Myofibroblasten, glatte Muskellzellen und myofibroblastische Retikulumzellen. Man kann davon ausgehen, dass alle diese Zellen in den Räumen, die sie umschließen, den Druck erhöhen können. Zusammen mit dem Druck, den der Blutfluss der offenen Arteriolen in den Pulpasträngen erzeugt, könnte der Druck, den die myofibroblastischen Zellen erzeugen, ausreichen, die Erythrozyten durch die Endothelwand der Sinus zu treiben. Die Passage durch die Sinuswand wird vermutlich dadurch erleichtert, dass sich zwischen den Endothelzellen aktiv Schlitze bilden können.

Weitere morphologische und physiologische Forschungen hinsichtlich des offenen und geschlossenen Kreislaufs der Milz könnten versuchen, diese Hypothese zu veri- oder zu falsifizieren.

6 Verzeichnisse

6.1 Literaturverzeichnis

Alberts, B., D. Bray, et al. (2010):

Molecular Biology of the Cell.
New York, 5. Auflage, Garland Science.

Ayad, S., R. P. Boot-Hanford, et al. (1998):

The Extracellular Matrix Factsbook.
San Diego, California, 2. Auflage, Academic Press Inc.

Bargmann, W. (1977):

Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen.
Stuttgart, 7. Auflage, Georg Thieme Verlag.

Breukels, M. A., A. Zandvoort, et al. (2001):

Pneumococcal conjugate vaccines overcome splenic dependency of antibody response to pneumococcal polysaccharides.
Infect Immun 69 (12): 7583-7587.

Brinkmann, B. und B. Madea (2004):

Handbuch gerichtliche Medizin.
Berlin, 1. Auflage, Springer.

Canna, S. (1938):

Ricerche sulle fibre muscolari della milza in condizioni normali e patologiche col metodo di Carere-Comes.
Boll. Soc. Biol. sper. 13: 1088.

De Bruyn, P. P. H. und Y. Cho (1974):

Contractile structures in endothelial cells of splenic sinusoids.
J. Ultrastruct. Res. 49: 24-33.

Drenckhahn, D. und J. Wagner (1986):

Stressfibers in the splenic sinus endothelium in situ: molecular structure, relationship to the extracellular matrix and contractility.
J. Cell Biol. 109: 1738-1747.

Erlinger, R, U. Welsch, et al. (1993):

Ultrastructural and biochemical observations on proteoglycans and collagen in the mutable connective tissue of the feather star *Antedon bifida* (Echinodermata, Crinoida).
J Anat 183 (Pt1): 1-11

Fujita, T. (1974):

A scanning electron microscope study of the human spleen.
Arch Histol Jpn 37 (3): 187-216.

Fujita, T., M. Kashimura, et al. (1982):

Scanning electron microscopy (SEM) studies of the spleen - normal and pathological.
Scan Electron Microsc : 1: 435-444.

Ghigi, C. (1932):

Il connettivo collageneo.
Boll. Soc. ital. Biol. sper. 7: 209.

Glaser, W. (1928):

Über die vasomotorische Innervierung der Blutgefäße der Milz nebst Bemerkungen zu intramuralen Nervenversorgung der Blutgefäße im Knochenmark.
Zschr. Anat. Entwicklungsgeschichte 87: 741.

Grassi, A. (1935):

Sulla struttura contrattile della milza e sui processi ipertrofici ed iperplastici del tessuto muscolare liscio in quest'organo.
Pathologica. 27: 553.

Groom, A. C., E. E. Schmidt, et al. (1991):

Microcirculatory pathways and blood flow in spleen: new insights from washout kinetics, corrosion casts, and quantitative intravital videomicroscopy.
Scanning Microsc 5 (1): 159-173; discussion 173-154.

Hartmann, A. (1930):

Die Milz.
Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen.
Berlin, 6: 397-563.

Heinzeller, Th., Aschauer, B. (2009):

mündliche Mitteilung

Hellman, T. (1926):

Die Altersanatomie der menschlichen Milz.
Zschr. Konstit. lehre 12: 270.

Herrlinger, R. (1949):

Neue funktionell-histologische Untersuchungen an der menschlichen Milz.
Zschr. Anat. Entwicklungsgeschichte. 114: 340.

Heusermann, U. und H. J. Stutte (1977):

Electron microscopic studies of the innervation of the human spleen.
Cell Tissue Res 184 (2): 225-236.

Hofmann, H. (1949):

Die Struktur der Milzkapsel und ihre funktionelle Bedeutung.
Gegenbaurs Morphologisches Jahrbuch.H. Stieve and A. Benninghoff.
Leipzig, Akademische Verlagsgesellschaft. 90: 1-32.

Hosea, S. W. (1983):

Role of the spleen in pneumococcal infection.
Lymphology 16 (2): 115-120.

Hsu, S. M., J. Cossman, et al. (1983):

Lymphocyte subsets in normal human lymphoid tissues.
Am J Clin Pathol 80 (1): 21-30.

Hueck, W. (1928):

Die normale menschliche Milz als Blutbehälter.
Verh. Dtsch. Ges. inn. Med. A. Geronne.
München, J.F. Bergmann 40 : 472.

Jäger, E. (1929):

Die Gefäßversorgung der Malphigischen Körperchen in der Milz.
Zschr. Zellforsch. Mikr. Anat. 8: 578-601.

Jandi, J. H. und R. H. Aster (1967):

Increased splenic pooling and the pathogenesis of hypersplenism.
Am J Med Sci 253 (4): 383-398.

Junqueira, L. C. und J. Carneiro (2005):

Lehrbuch der Histologie.
Heidelberg, 6. Auflage, Springer Verlag.

Kashimura, M. und T. Fujita (1987):

A scanning electron microscopy study of human spleen: relationship between the microcirculation and functions
Scanning Microsc 1 (2): 841-851.

Klemperer, P. (1938):

The spleen.
Downey's Handbook of Hematol.
New York, P.B. Hoeber. 3: 1591.

Koolman, J. und K.-H. Röhm (2009):

Taschenatlas Biochemie des Menschen.
Stuttgart, 4. Auflage, Thieme-Verlag.

Kraal, G. (1992):

Cells in the marginal zone of the spleen.
Int Rev Cytol 132: 31-74.

Kroese, F. G., W. Timens, et al. (1990):

Germinal center reaction and B lymphocytes: morphology and function.
Curr Top Pathol 84 (Pt1): 103-148.

Kudoh, G., K. Hoshi, et al. (1979):

Fluorescence microscopic and enzyme histochemical studies of the innervation of the human spleen.
Arch Histol Jpn 42 (2): 169-180.

Leonhardt, H. (1990):

Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen.
Stuttgart, 8. Auflage, Thieme-Verlag.

Lippert, H. (2010):

Lehrbuch Anatomie.
München, 9. Auflage, Urban und Fischer/Elsevier.

Lubarsch, O. (1927):

Pathologische Anatomie der Milz.
Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie. F. Henke und O. Lubarsch.
Berlin, Springer. 1/2: 373.

Lüllmann-Rauch, R. (2009):

Taschenbuch Histologie.
Stuttgart, 3. Auflage, Thieme-Verlag.

MacLennan, I. C. und Y. J. Liu (1991):

Marginal zone B cells respond both to polysaccharide antigens and protein antigens.
Res Immunol 142 (4): 346-351.

Müller-Hermelink, H. K., B. von Gaudecker, et al. (1981):

Fibroblastic and dendritic reticulum cells of lymphoid tissue.
Ultrastructural, histochemical, and ³H-thymidine labeling studies.
J Cancer Res Clin Oncol 101 (1): 149-164.

Murphy, K. M., P. Travers, et al. (2009):

Janeway Immunologie.
Heidelberg, 7. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag.

Nance, D. M. und V. M. Sanders (2007):

Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007).
Brain Behav Immun 21 (6): 736-745.

Pabst, R. (2004):

Milz.
Anatomie. A. Benninghoff and D. Drenckhahn.
München, Urban und Fischer/Elsevier. 2: 159-163.

Pabst, R. und J. Westermann (1993):

Die funktionelle Anatomie der Milz.
Chirurgische Gastroenterologie 9 (Suppl. 2): 86-90.

Peset Llopis, M. J., G. Harms, et al. (1996):

Human immune response to pneumococcal polysaccharides: complement-mediated localization preferentially on CD21-positive splenic marginal zone B cells and follicular dendritic cells.

J Allergy Clin Immunol 97 (4): 1015-1024.

Pinkus, G. S., M. J. Warhol, et al. (1986):

Immunohistochemical localization of smooth muscle myosin in human spleen, lymph node, and other lymphoid tissues. Unique staining patterns in splenic white pulp and sinuses, lymphoid follicles, and certain vasculature, with ultrastructural correlations.

Am J Pathol 123 (3): 440-453.

Pollard, T. D. und W. C. Earnshaw (2007):

Cell Biology.

New York, 2. Auflage, Saunders.

Raviola, E. (1997):

Spleen.

A Textbook of Histology. D. W. Fawcett and W. Bloom.

New York/London, 12. Auflage, Chapman Hall 16: 460-471.

Saitoh, K., R. Kamiyama, et al. (1982):

A scanning electron microscopic study of the boundary zone of the human spleen.

Cell Tissue Res 222 (3): 655-665.

Sasou, S., R. Satodate, et al. (1986):

Scanning electron microscopic features of spleen in the rat and human: a comparative study.

Scan Electron Microsc 3: 1063-1069.

Schaffner, A., N. Augustiny, et al. (1985):

The hypersplenic spleen. A contractile reservoir of granulocytes and platelets.

Arch Intern Med 145 (4): 651-654.

Schmidt, E. E., I. C. MacDonald, et al. (1988):

Microcirculatory pathways in normal human spleen, demonstrated by scanning electron microscopy of corrosion casts.

Am J Anat 181 (3): 253-266.

Schweigger-Seidel, F. (1863):

Untersuchungen über die Milz.

Virchows Arch Pathol Anat 27: 460-504.

Spencer, J., M. E. Perry, et al. (1998):

Human marginal-zone B cells.

Immunol Today 19 (9): 421-426.

Steiniger, B. und P. Barth (2000):

Microanatomy and function of the spleen.
Adv Anat Embryol Cell Biol 151: III-IX, 1-101.

Steiniger, B., P. Barth, et al. (2001):

The perifollicular and marginal zones of the human splenic white pulp: do fibroblasts guide lymphocyte immigration?
Am J Pathol 159 (2): 501-512.

Steiniger, B., P. Barth, et al. (1997):

The species-specific structure of microanatomical compartments in the human spleen: strongly sialoadhesin-positive macrophages occur in the perifollicular zone, but not in the marginal zone.
Immunology 92 (2): 307-316.

Steiniger, B., L. Rüttinger, et al. (2003):

The three-dimensional structure of human splenic white pulp compartments.
J Histochem Cytochem 51 (5): 655-664.

Steiniger, B., V. Stachniss, et al. (2007):

Phenotypic differences between red pulp capillary and sinusoidal endothelia help localizing the open splenic circulation in humans.
Histochem Cell Biol 128 (5): 391-398.

Steiniger, B., E. M. Timphus, et al. (2006):

The splenic marginal zone in humans and rodents: an enigmatic compartment and its inhabitants.
Histochem Cell Biol 126 (6): 641-648.

Timens, W. (1991):

The human spleen and the immune system: not just another lymphoid organ.
Res Immunol 142 (4): 316-320.

Timens, W., A. Boes, et al. (1989):

Human marginal zone B cells are not an activated B cell subset: strong expression of CD21 as a putative mediator for rapid B cell activation.
Eur J Immunol 19 (11): 2163-2166.

Timens, W., A. Boes, et al. (1989):

Immaturity of the human splenic marginal zone in infancy. Possible contribution to the deficient infant immune response.
J Immunol 143 (10): 3200-3206.

Timens, W. and S. Poppema (1985):

Lymphocyte compartments in human spleen. An immunohistologic study in normal spleens and uninvolved spleens in Hodgkin's disease.
Am J Pathol 120 (3): 443-454.

van Krieken, J. H. und J. te Velde (1986):

Immunohistology of the human spleen: an inventory of the localization of lymphocyte subpopulations.
Histopathology 10 (3): 285-294.

van Krieken, J. H. und J. te Velde (1988):

Normal histology of the human spleen.
Am J Surg Pathol 12 (10): 777-785.

van Krieken, J. H., J. Te Velde, et al. (1985):

The splenic red pulp; a histomorphometrical study in splenectomy specimens embedded in methylnmethacrylate.
Histopathology 9 (4): 401-416.

van Krieken, J. H., J. Te Velde, et al. (1985):

The human spleen; a histological study in splenectomy specimens embedded in methylnmethacrylate.
Histopathology 9 (6): 571-585.

van Krieken, J. H., J. M. und J. te Velde (1988):

Normal histology of the human spleen.
The American Journal of Surgical Pathology 12 (10): 777-785.

von Herrath, E. (1958):

Bau und Funktion der normalen Milz.
Berlin, 1. Auflage, Walter de Gruyter & Co.

Weh, H.-J. und H. Arps (1993):

Beteiligung der Milz und Indikationen zur Splenektomie bei malignen und benignen hämatologischen Erkrankungen.
Chirurgische Gastroenterologie 9 (Suppl.2): 98-102.

Weidenreich, F. (1901):

Das Gefäßsystem der menschlichen Milz.
Arch Mikrosk Anat 58: 247-376.

Weiss, L. (1983):

Histology, Cell and Tissue Biology.
New York, 5. Auflage, Elsevier Science.

Welsch, U. (2010):

Lehrbuch Histologie.
München, 3.Auflage, Urban und Fischer/Elsevier.

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Milz, erwachsener Mensch, 25 Jahre, H.E.-Übersicht, Vergr. 10-fach	18
Abb. 2: Milz, Kind, 14 Monate, Kapsel (K), Rote Pulpa (RP), Follikel (F), H.E.-Übersicht, Vergr. 20-fach	19
Abb. 3: Milz, erwachsener Mensch, 25 Jahre, PALS-Follikel, H.E.-Färbung, Vergr. 10-fach	20
Abb. 4: Milz, Kind (mit Hepatitis C), Follikel, H.E.-Färbung, Vergr.120-fach.....	21
Abb. 5: Milz, erwachsener Mensch, 25 Jahre, PALS, H.E.-Färbung, Vergr. 120-fach.....	22
Abb. 6: Milz, erwachsener Mensch, Übersicht Azanfärbung, Vergr. 10-fach	24
Abb. 7: Milz, Kind, 14 Monate, Hepatitis C, Azanfärbung, Vergr. 10-fach.....	25
Abb. 8: Milz, erwachsener Mensch, Trabekel (T) mit zahlreichen rotgefärbten glatten Muskelzellen, Azanfärbung, Vergr. 250-fach	26
Abb. 9: Milz, erwachsener Mensch, Trabekelarterie, leicht schräg angeschnitten; Trabekel (T), Arterienlumen (L), 1 Intima 2 Media 3 Adventitia; Azanfärbung, Vergr. 250-fach	27
Abb. 10: Milz, erwachsener Mensch, Trabekel, Azanfärbung, Vergr. 250-fach	27
Abb. 11: Milz, Kind, Trabekelarterien, Azanfärbung, Vergr. 110-fach.....	28
Abb. 12: Milz, Kind, Trabekel mit rotgefärbten glatten Muskelzellen, Azanfärbung, Vergr. 110-fach.....	29
Abb. 13: Milz, erwachsener Mensch, Zentralarterie (ZA), Azanfärbung, Vergr. 250-fach.	30
Abb. 14: Milz, Kind, Zentralarterie (ZA), Azanfärbung, Vergr. 250-fach.....	31
Abb. 15: Milz, erwachsener Mensch, Pinselarteriolen (Pfeile), quer angeschnitten, rote Pulpa (RP), Azanfärbung, Vergr. 110-fach	32
Abb. 16: Milz, erwachsener Mensch, Pinselarteriolen (Pfeile) längs angeschnitten, rote Pulpa (RP), Azanfärbung, Vergr. 110-fach	33
Abb. 17: Milz, erwachsener Mensch, Hülsenkapillaren (Pfeile) , rote Pulpa (RP), Azanfärbung, Vergr. 250-fach.....	34
Abb. 18: Milz, Kind, Pinselarteriolen (Pfeile), Azanfärbung, Vergr. 110-fach	35
Abb. 19: Milz, erwachsener Mensch, Trabekel mit Pulpavene (PV), Trabekelarterie (TA), Trabekel (T), Trabekelvene (TV), Pulpavene (PV), rote Pulpa (RP); Azanfärbung, Vergr. 110-fach.....	36
Abb. 20: Milz, Kind, Trabekel (T) mit Pulpavene (PV), Trabekelvene (TV), rote Pulpa (RP); Azanfärbung, Vergr. 110-fach	37
Abb. 21: Milz, erwachsener Mensch, Sinus (S) in der roten Pulpa, Pulpastränge (P), H.E.-Färbung, Vergr. 450-fach.....	38
Abb. 22: Milz, Kind (mit Hepatits C), Follikel (F), Silberimprägnation nach Gomori, Vergr. 20-fach	39
Abb. 23: Milz, erwachsener Mensch, Kapsel (K), rote Pulpa (RP), Silberimprägnation nach Gomori, Vergr. 250-fach.....	40
Abb. 24: Milz, Kind, Kapsel (K), rote Pulpa (RP), Silberimprägnation nach Gomori, Vergr. 450-fach.....	41
Abb. 25: Milz, erwachsener Mensch, Trabekel (T), Silberimprägnation nach Gomori, Vergr. 450-fach	42
Abb. 26: Milz, Kind, Trabekel (T), Arteriolen (Pfeile), Silberimprägnation nach Gomori, Vergr. 220-fach	43

Abb. 27: Milz, erwachsener Mensch, rote Pulpa, Reifenfasern (Pfeile), Silberimprägnation nach Gomori, Vergr. 450-fach	44
Abb. 28: Milz, Kind, rote Pulpa, Sinus mit Reifenfasern (Pfeile), Silberimprägnation nach Gomori, Vergr. 450-fach	45
Abb. 29: Milz, erwachsener Mensch, Trabekelarterie (TA), Silberimprägnation nach Gomori, Vergr. 450-fach	46
Abb. 30: Milz, Kind, Trabekelarterie (TA), Silberimprägnation nach Gomori, Vergr. 220-fach	47
Abb. 31: Milz, Kind, Trabekel, Silberimprägnation nach Gomori, Vergr. 110-fach	48
Abb. 32: Milz, erwachsener Mensch, Pfeil zeigt auf vermutliche Hülsenkapillare, Sinus (S), Silberimprägnation nach Gomori, Vergr. 450-fach	49
Abb. 33: Milz, Kind, Pfeil zeigt auf Arteriole mit Hülse, Silberimprägnation nach Gomori, Vergr. 450-fach	49
Abb. 34: Milz, erwachsener Mensch, Kapsel (K) mit elastischen Fasern (lila), Aldehydfuchsin, Vergr. 450-fach	50
Abb. 35: Milz, erwachsener Mensch, Kapsel (K) und Trabekel (T) mit zahlreichen elastischen Fasern, Aldehydfuchsin, Vergr. 20-fach	51
Abb. 36: Milz, erwachsener Mensch, Trabekelarterie (TA), Aldehydfuchsin, Vergr. 450-fach	52
Abb. 37: Milz, erwachsener Mensch, Trabekelarterie (TA), Aldehydfuchsin, Vergr. 450-fach	53
Abb. 38: Milz, erwachsener Mensch, Zentralarterie (ZA), Aldehydfuchsin, 450-fach	54
Abb. 39: Milz, erwachsener Mensch, Pulpavene (PV), Trabekel (T), Vergr. 250-fach	55
Abb. 40: Milz, erwachsener Mensch, Kollagen Typ I, Vergr. 20-fach	56
Abb. 41: Milz, erwachsener Mensch, Nachweis von Kollagen Typ III in Kapsel (K) und Trabekel (T), Vergr. 250-fach	58
Abb. 42: Milz, Kind, Nachweis von Kapsel (K) und Kollagen Typ III, Vergr. 450-fach	59
Abb. 43: Milz, erwachsener Mensch, PALS, Nachweis von Kollagen III mit Zentralarterie (ZA), Vergr. 250-fach	60
Abb. 44: Milz, erwachsener, Nachweis von Aktin in der Übersicht, Vergr. 45-fach	62
Abb. 45: Milz, Kind, Nachweis von Aktin, Vergr. 45-fach	63
Abb. 46: Milz, Erwachsener, Aktinnachweis in der Milz Kapsel (K), und Trabekel (T), Vergr. 120-fach	64
Abb. 47: Milz, Kind, Kapsel (K), Aktinnachweis, Vergr. 450-fach	65
Abb. 48: Milz, Kind, Trabekel (T), Aktinnachweis, Vergr. 250-fach	65
Abb. 49: Milz, erwachsener Mensch, Follikel mit kräftigem Aktinnachweis in der Marginalzone *(Sternchen)), PALS und die Zentralarterie (ZA) reagieren auch kräftig positiv, Vergr. 110-fach	66
Abb. 50: Milz, Kind, Aktinnachweis in der Marginalzone *(Sternchen)) des Follikels (F), in der PALS und in der Zentralarterie (ZA), Vergr. 220-fach	67
Abb. 51: Milz, erwachsener Mensch, Aktinnachweis in der Marginalzone der Follikel (F) in der PALS und im Trabekel (T), Vergr. 110-fach	68
Abb. 52: Milz, Kind, Aktinnachweis vor allem in der Marginalzone der Follikel (F) und in der PALS, Zentralarterie (ZA), Vergr. 5-fach	69
Abb. 53: Milz, Kind, PALS mit Zentralarterie (ZA), Aktinnachweis, Vergr. 450-fach	69

Abb. 54: Milz, erwachsener Mensch, rote Pulpa, Sinus (S), Aktinnachweis, Vergr. 450-fach	70
Abb. 55: Milz, erwachsener Mensch, rote Pulpa, Sinus (S), Nachweis von Alpha-Tubulin in Makrophagen (Ma) und im Sinusendothel (Pfeil), Vergr. 450-fach.....	71
Abb. 56: Milz, Kind, Kapsel, Nachweis von Myosin II von Myofibroblasten in Kapsel (K), Retikulumzellen der roten Pulpa und Makrophagen (Ma), Vergr. 450-fach	72
Abb. 57: Milz, erwachsener Mensch, rote Pulpa, Sinus (S) und Pulpastränge (P), Nachweis von Myosin II im Sinusendothel, schwache Reaktion in den Retikulumzellen, Vergr. 450-fach.....	73
Abb. 58: Milz, erwachsener Mensch, Nachweis von Myosin II in weißer und roter Pulpa, kräftig positiv reagieren Makrophagen (Ma), schwach positiv reagieren die Retikulumzellen, Follikel (F), rote Pulpa (RP), Vergr. 250-fach.....	73
Abb. 59: Milz, erwachsener Mensch, rote Pulpa mit vielen Sinus (S), Vimentinnachweis im Sinusendothel, Vergr. 250-fach	74
Abb. 60: Milz, Kind, rote Pulpa mit vielen Sinus (S), Vimentinnachweis im Sinusendothel, Makrophagen (Ma), Vergr. 450-fach.....	75
Abb. 61: Milz, Kind, Nachweis von Connexin 43, Vergr. 45-fach	76
Abb. 62: Milz, erwachsener Mensch, rote Pulpa, Nachweis von Connexin 43 in den Endothelien der Sinus (S), Vergr. 450-fach	77
Abb. 63: Milz, erwachsener Mensch, Zentralarterie, PALS, CD-3-positive T-Lymphozyten in der PALS mit ihrer Zentralarterie (ZA), Vergr. 250-fach.....	78
Abb. 64: Milz, erwachsener Mensch, Nachweis CD-8-positiver T-Lymphozyten in der PALS, in deren Zentrum die Zentralarterie (ZA) verläuft, Vergr. 250-fach	79
Abb. 65: Milz, erwachsener Mensch, Nachweis von CD 20, positiv reagieren vor allem die Lymphozyten der Follikel (F), Vergr. 25-fach.....	80
Abb. 66: Milz, Kind, Nachweis von CD-20-positiven Lymphozyten in den Follikeln (F), aber auch locker verstreut in der roten Pulpa (RP), Vergr. 45-fach	81
Abb. 67: Milz, erwachsener Mensch, rote Pulpa, positiver Nachweis von CD 68 in den Makrophagen, Vergr. 450-fach	82
Abb. 68: Milz, Kind, rote Pulpa, Nachweis von CD 68 in den Makrophagen, Vergr. 250-fach	83
Abb. 69: Milz, Kind, Follikel, Nachweis von CD-68-positiven Makrophagen, die vor allem im Keimzentrum vorkommen, Vergr. 450-fach	84
Abb. 70: Milz, Kind, Follikel mit zahlreichen kräftig CD-74-positiven Zellen, Vergr. 250-fach	85
Abb. 71: Milz, erwachsener Mensch, CD-74-positive Zellen in der PALS mit Zentralarterie (ZA), Vergr. 450-fach	86
Abb. 72: Milz, Kind, Trabekel, NFPC-positive Nerven (Pfeile) in Nähe der Trabekelarterie (TA), Vergr. 250-fach.....	87
Abb. 73: Milz, Kind, Nachweis von Beta-Tubulin in einem Trabekel, positiv reagieren Nerven in Nähe der Trabekelarterie (TA), Vergr. 250-fach.....	88
Abb. 74: Milz, Kind, Trabekelarterie (TA), Nachweis von S100 in kleinen Nerven (Pfeile), Vergr. 450-fach	89
Abb. 75: Milzkapsel, TEM, Vergr. 15300-fach	91
Abb. 76: Milztrabekel, TEM; Vergr. 21000-fach.....	92
Abb. 77: Milztrabekel, TEM, Vergr. 8900-fach.....	93
Abb. 78: Milztrabekel, TEM, Vergr. 8900-fach.....	94

Abb. 79: Milztrabekel, TEM, Vergr. 8900-fach	95
Abb. 80: Sinuswand, TEM, Vergr. 3900-fach	97
Abb. 81: Sinusendothel, TEM, Vergr. 8900-fach.....	98
Abb. 82: Sinusendothel, TEM, Vergr. 21000-fach.....	99
Abb. 83: Wand einer Pulpavene, TEM, Vergr. 5200-fach	101
Abb. 84: Wand einer Pulpavene, TEM, Vergr. 8900-fach	102
Abb. 85: Pulpavene, TEM, Vergr. 11500-fach.....	103
Abb. 86: Pulpavene, TEM, Vergr. 8900-fach.....	104

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einbettung.....	9
Tabelle 2: Primärantikörper	14
Tabelle 3: Übersicht der Abbildungen und jeweiligen anatomischen Strukturen der Milz	105

6.4 Abkürzungsverzeichnis

6.4.1 Histologische, histochemische und immunhistochemische Befunde

K:	Kapsel
T:	Trabekel
F:	Follikel
PF:	Primärfollikel
SF:	Sekundärfollikel
RP:	rote Pulpa
PALS:	periarterielle Lymphozytenscheide
TA:	Trabekelarterie
ZA:	Zentralarterie
PV:	Pulpavene
TV:	Trabekelvene
L:	Arterienlumen
P:	Pulpastränge
S:	Sinus
Ma:	Makrophage

6.4.2 Transmissionselektronenmikroskopische Befunde

K:	Kollagenfibrillen
gM:	glatte Muskulatur
EN:	Endothel
LU:	Lumen der Pulpavene
eF:	elastische Fasern
Mif:	Mikrofibrillen
Mf:	Myofilament
RER:	raues endoplasmatisches Retikulum
Go:	Golgi-Apparat
Ma:	Makrophage
Ly:	Lymphozyt
FB:	Fibroblastische Retikulumzelle
SF:	Stressfasern
Mit:	Mitochondrien
BL:	Basallaminastreifen
E:	Erythrozyt
MF:	Myofibroblast
A:	Membranverdichtungen/adhesion plaques

7 Danksagung

Mein erster Dank richtet sich an meinen Doktorvater Hr. Prof. Dr. Dr. Ulrich Welsch für die Überlassung des Themas, sein großes Interesse an dieser Arbeit, die zahlreichen konstruktiven Diskussionen, die Korrekturen sämtlicher Manuskripte und natürlich seine warmherzige Betreuung. Seine Unterstützung auf Grund seiner langjährigen Erfahrung und seines Wissens waren eine unverzichtbare Hilfe für mich. Vielen herzlichen Dank.

Ebenso möchte ich auch den Mitarbeitern der Anatomischen Anstalt des Lehrstuhls II Fr. A. Sulz, Fr. S. Tost, Fr. C. Köhler und Fr. U. Fazekas für ihre vielfältige Hilfe und stets gewährte Unterstützung danken. Darüber hinaus verdanke ich ihnen die Einführung in zahlreiche Arbeitstechniken der Histologie.

Dank gilt Hrn. Prof. Dr. Graw und Hrn. Dr. Peschel (Institut für Rechtsmedizin LMU) sowie Hrn. Prof. M. Anthuber (Klinikum Augsburg) für die freundliche Bereitstellung der Humanmilzpräparate und gleichermaßen auch den Patienten, die ihr Einverständnis hierzu gaben.

Ich möchte mich auch bei Fr. K. Helldobler-Marcisz und Fr. Bettina Küster für die graphisch-technische Hilfe bedanken.

Besonderer Dank gilt meiner Familie und Thomas für die stetige Motivation, Geduld und Unterstützung.