

## Zusammenfassung

Die durch Cholinergika hervorgerufene Kontraktion des Ziliarmuskels führt zu einer Bewegung des Skleralsporns und zu einer Entfaltung des Trabekelwerks. Der Wirkungsmechanismus des Adrenalins, das ebenfalls eine Steigerung der Fazilität des Kammerwasserabflusses bewirkt, ist ungeklärt. Es wird jedoch angenommen, daß dieser Effekt nicht durch den Ziliarmuskel vermittelt wird. Wir untersuchten den Skleralsporn von 37 menschlichen Augen (Alter 17–87 Jahre) an Tangentialschnittserien immunzytochemisch und elektronenmikroskopisch. Dabei zeigte sich, daß die Ziliarmuskelzellen nicht den Sporn durchdringen, sondern an seinem hinteren Bereich über elastische Sehnen befestigt sind. Innerhalb des Sporns findet sich eine Population von zirkulär verlaufenden Zellen. Diese Zellen formieren sich nicht zu Bündeln, sondern sind locker angeordnet. Sie bilden lange zytoplasmatische Fortsätze aus, die durch Maculae adhaerentes und Nexus verbunden sind. Diese Skleralspornzellen zeigen eine intensive Färbung für glattemuskel-spezifisches  $\alpha$ -Isoaktin und -myosin. Elektronenmikroskopisch enthalten die Zellen zahlreiche Aktinfilamente, unterscheiden sich aber sonst deutlich von den Zellen des Ziliarmuskels. So haben sie z. B. keine vollständige Basalmembran. Die Skleralspornzellen bilden sehnartigen Verbindungen mit den elastischen Fasern des Sporns, die mit den elastischen Fasern des Trabekelwerks verbunden sind. Auch im hohen Alter sind die Skleralspornzellen in unveränderter Dichte nachweisbar, zeigen aber ultrastrukturell vermehrt rauhes endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Systeme. In der Umgebung der Skleralspornzellen finden sich Nervenendigungen, die u. a. kleine (30–60 nm) granuläre Vesikel enthalten, wie sie für adrenerge Nerven

# Immunzytochemische und ultrastrukturelle Untersuchungen am menschlichen Skleralsporn

Charakterisierung einer kontraktiven Zellpopulation \*

E. Tamm<sup>1</sup>, C. Flügel<sup>1</sup>, F. H. Stefani<sup>2</sup> und J. W. Rohen<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Anatomisches Institut der Universität Erlangen-Nürnberg

<sup>2</sup> Universitäts-Augenklinik München

typisch sind. Somit handelt es sich bei den Skleralspornzellen vermutlich um teilweise adrenerg innervierte Myofibroblasten: Die Kontraktion dieser Zellen könnte zur Wirkung von Adrenalin auf den Kammerwasserabfluß beitragen.

## Schlüsselwörter

Skleralsporn – Myofibroblast – Immunzytochemie – Ultrastruktur – Glattemuskuläres  $\alpha$ -Aktin

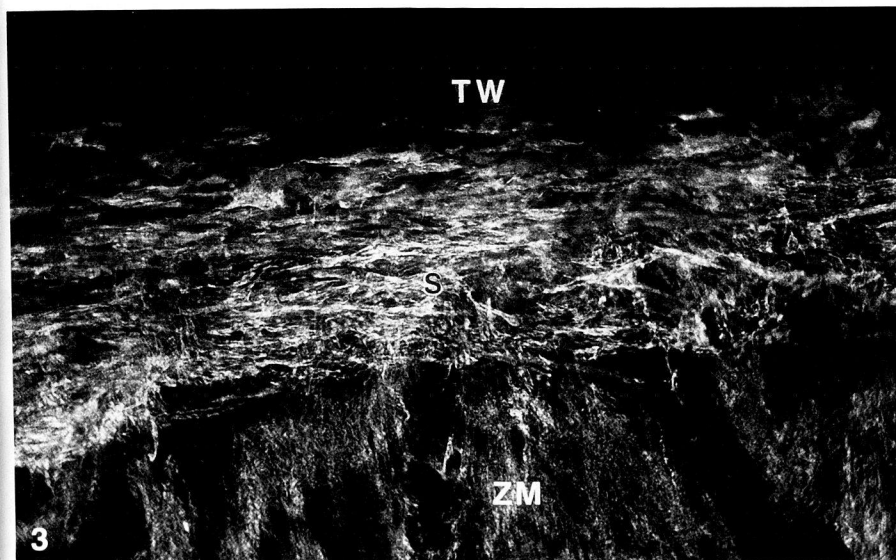
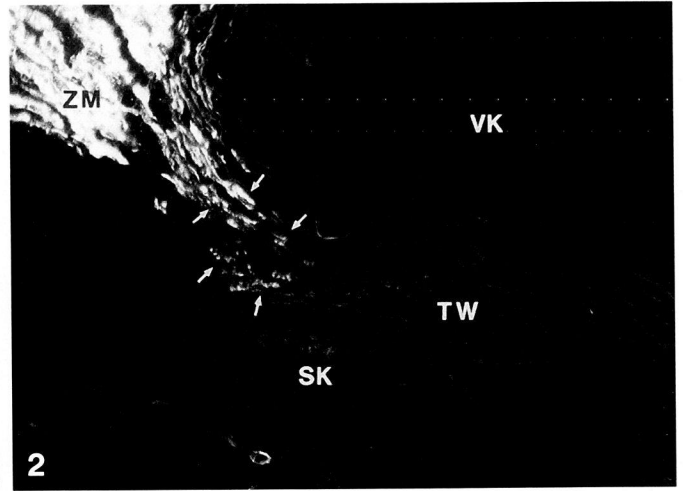
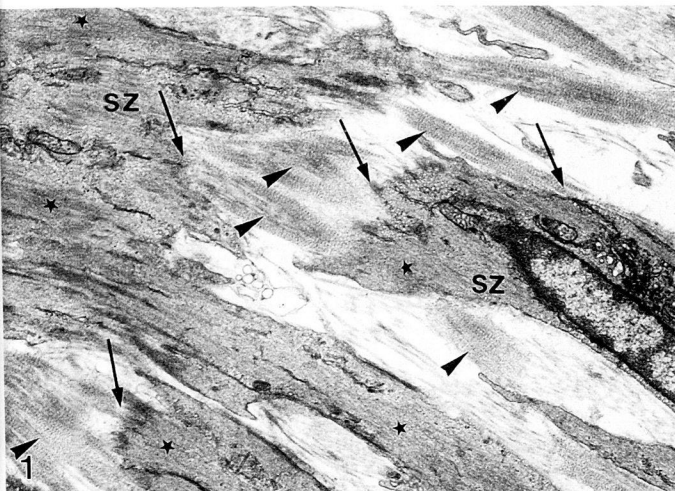
Es ist allgemein bekannt, daß eine, z. B. durch die Gabe von Cholinergika ausgelöste Ziliarmuskelkontraktion zu einer Senkung des Abflußwiderstands im Trabekelwerk führt. Der menschliche Ziliarmuskel ist über kollagene und elastische Sehnen am Skleralsporn und am Trabekelwerk befestigt [32, 34–36]. Während der Kontraktion kommt es zu einer Verlagerung des Skleralsporns nach hinten und innen [5, 11, 34] und dadurch zu einer Vergrößerung der Abflußwege innerhalb des kribösen Trabekelwerks direkt unter der Innenwand des Schlemm-Kanals [21]. Tatsächlich beeinflußt Pilocarpin

nach der experimentellen Ablösung des Ziliarmuskels von seinem Ansatz am Skleralsporn und am Trabekelwerk nicht mehr den Abflußwiderstand [17].

Interessanterweise fanden Kaufman u. Bárány [18], daß Adrenalin hingegen, auch nach der vollständigen Abtrennung des Ziliarmuskels von seinem Ansatz, den Abflußwiderstand noch beeinflussen kann. Der Wirkungsmechanismus des Adrenalins in diesem Bereich ist jedoch ungeklärt. Aus Untersuchungen am Kammerwinkel des Rinderauges wissen wir, daß bei dieser Spezies myofibroblastenähnliche Zellen, die das für kontraktile Zellen spezifische glattemuskuläre  $\alpha$ -Aktin enthalten, im Bereich des Abflußgewebes vorkommen [7]. Physiologische Untersuchungen von Lepple-Wienhues et al. [20] haben ergeben, daß diese Zellen tatsächlich kontraktile Eigenschaften haben. Um der Frage nachzugehen, ob auch in der Umgebung des menschlichen Abflußgewebes kontraktile Zellen lokalisiert sind, die über eine vom Ziliarmuskel unabhängige Kontraktion den Abflußwiderstand beeinflussen können, haben wir den Skleralsporn und den vorderen Ansatz des Ziliarmuskels menschlicher Augen untersucht.

Dabei charakterisierten wir eine bisher nicht beschriebene Population von kontraktiven Zellen innerhalb des Skleralsporns, die sich immunzytochemisch und ultrastrukturell vom Ziliarmuskel unterscheidet. Diese

\* Vortrag gehalten auf der 89. Tagung der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft in Leipzig



**Abb. 1.** Elektronenmikroskopischer Tangentialschnitt durch den Skleralsporn eines 18jährigen Menschen. Die länglichen Skleralspornzellen (SZ) sind stark verzweigt. Ihr Zytoplasma ist weitgehend ausgefüllt mit Aktinfilamenten (Stern). In unmittelbarer Nähe der Skleralspornzellen verlaufen zahlreiche elastische Fasern (Pfeilköpfe), die sehnartige Verbindungen (Pfeile) mit den Spornzellen eingehen, Vergr. 7400:1

**Abb. 2.** Immunzytochemische Färbung des Kammerwinkels eines 74jährigen Menschen (sagittale Schnittführung) mit Antikörpern gegen glattmuskuläres  $\alpha$ -Aktin. Eine starke Färbung ist im Bereich des Ziliarmuskels zu sehen (ZM), aber auch die Skleralspornzellen (Pfeile) färben sich intensiv positiv. VK Vorderkammer, TW Trabekelwerk, SK Schlemm-Kanal, Vergr. 150:1

**Abb. 3.** Immunzytochemische Färbung des Kammerwinkels des gleichen Spenders wie in Abb. 2 (tangentielle Schnittführung) mit Antikörpern gegen glattmuskuläres  $\alpha$ -Aktin. Die Muskelbündel der longitudinalen Ziliarmuskelportion (ZM), die am Sporn ansetzen, sind positiv gefärbt. Innerhalb des Sporns (S) sind die Skleralspornzellen positiv gefärbt, die im Gegensatz zu den Ziliarmuskelzellen zirkulär orientiert sind und im Sporn ein dichtes Netzwerk ausbilden. TW Trabekelwerk, Vergr. 260:1

Zellen haben Ähnlichkeiten mit kontraktiven Myofibroblasten und bilden sehnige Verbindungen mit dem elastischen Fasersystem des Skleralsporns, das mit den elastischen Fasern des Trabekelwerks verbunden ist. Die Kontraktion dieser Skleralspornzel-

len könnte somit den Abflußwiderstand des Trabekelwerks beeinflussen.

### Material und Methode

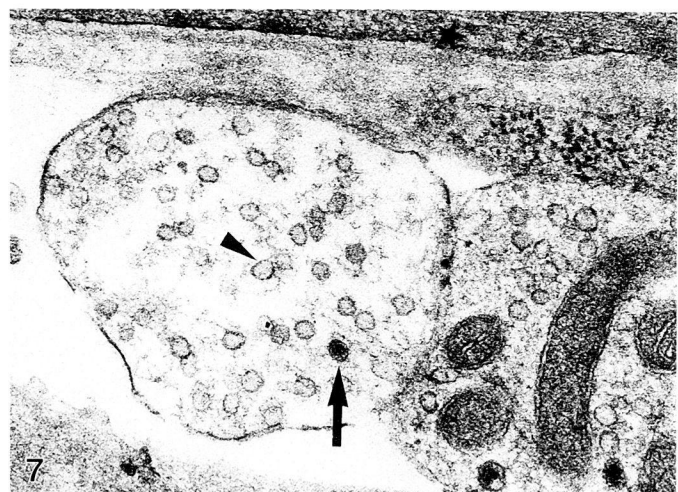
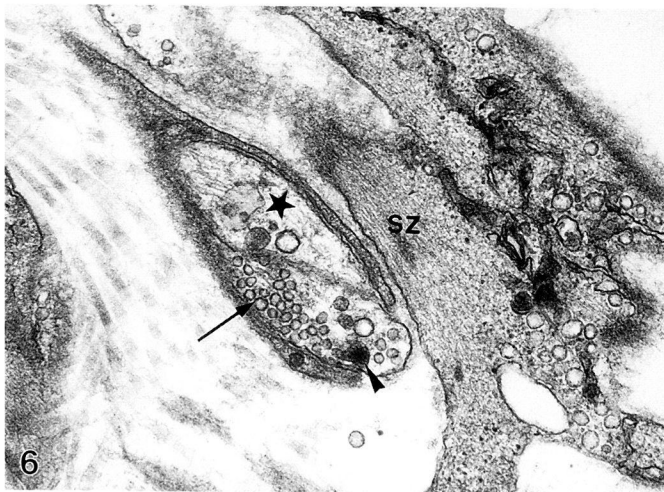
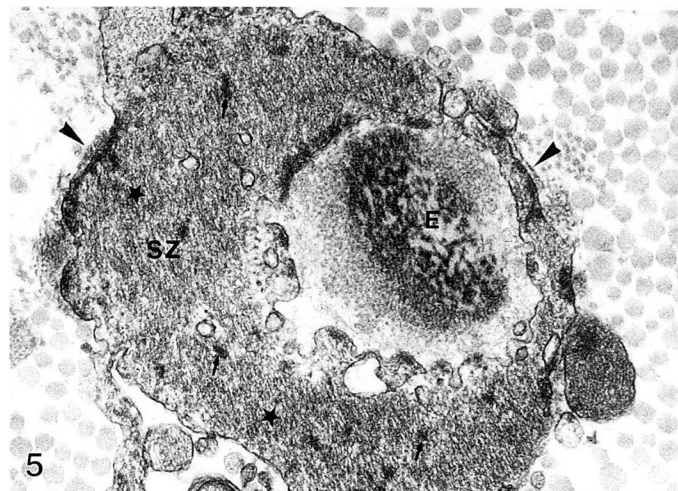
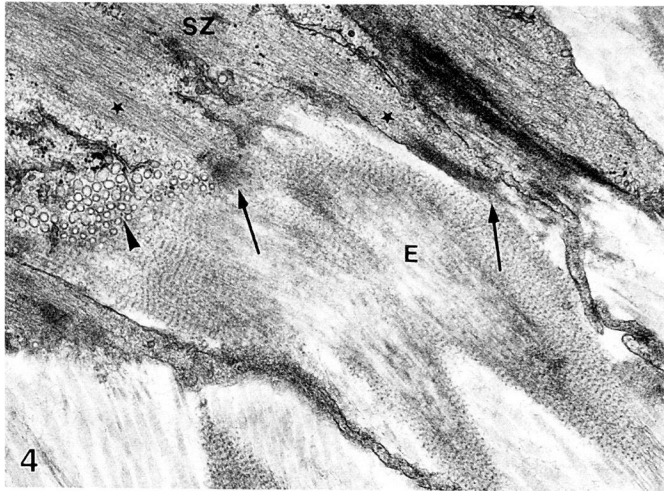
Untersucht wurden die Augen von 12 normalen Spendern (Lebensalter 17–87 Jahre)

sowie 25 Augen (18–54 Jahre), die wegen eines malignen Melanoms der Aderhaut enukleiert worden waren. Bei keinem der Spender lagen anamnestisch oder klinisch Hinweise für eine Erkrankung des vorderen Augenabschnitts vor. Bei keinem der Tumoraugen war der vordere Abschnitt durch den Tumor infiltriert.

Der vordere Abschnitt der Spenderaugen wurde in Quadranten unterteilt. Von jedem Quadranten wurden 2–3 mm breite Stückchen in sagittaler Richtung abgetrennt, die Ziliarkörper, Kammerwinkel und angrenzende Sklera enthielten. Ein Teil des Materials wurde in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, ein anderer Teil in einer Paraformaldehyd-Lysin-Periodat-Lösung (PLP) [26] fixiert und in Paraffin eingebettet. Gefrierschnitte (10  $\mu$ m) und Paraffinschnitte (5  $\mu$ m) wurden sowohl in meridionaler als auch tangentialer Orientierung (als Schnittserie durch den gesamten Kammerwinkel) angefertigt. Diese Schnitte wurden entweder mit einer kombinierten Färbung nach Weigert u. Goldner [38] gefärbt oder für die Immunzytochemie verwendet.

Weitere Sektoren wurden für die elektronenmikroskopische Untersuchung in der Lösung nach Ito u. Karnovsky [15] fixiert. Dieses Material wurde mit 1% Osmiumtetroxid nachfixiert und in üblicher Weise in Epon eingebettet. Sagittal und tangential orientierte Dünnschnitte wurden mit Bleizitrat und Uranylazetat kontrastiert und an einem Zeiss (EM 902) Elektronenmikroskop ausgewertet.

Die immunzytochemische Untersuchung erfolgte an Gefrier- oder Paraffinschnitten, die mit monoklonalen Antikörpern gegen glattmuskelspezifisches  $\alpha$ -Aktin (Klon 1A4 [41], Sigma, 1:150) sowie mit polyklonalen Antikörpern gegen skelett- und glattmuskuläres Myosin (Sigma, 1:5) und mit an Fluoreszein gekoppelten sekundären Antikörpern gefärbt worden waren [7, 44, 45].



**Abb. 4.** Elektronenmikroskopischer Tangentialschnitt durch den Skleralsporn eines 18jährigen Menschen. Die sehnartige Verbindung einer Skleralspornzelle (SZ) mit einer elastischen Faser (E) ist dargestellt. Die Spornzelle bildet eine Invagination aus, in die die elastische Faser einstrahlt. Dabei nähert sich das quergebänderte Hüllmaterial der Faser unmittelbar der Zellmembran an (Pfeile), die in diesem Bereich elektronendichte „dense bands“ ausbilden. An diese heften sich die intrazellulären Aktinfilamente an (Sterne) und setzen die Verlaufsrichtung der elastischen Fasern fort. Zudem zeigt die Zellmembran zahlreiche Kaveolae (Pfeilkopf), Vergr. 14400:1

**Abb. 5.** Elektronenmikroskopischer Sagittalschnitt durch den Skleralsporn eines 18jährigen Menschen. Man erkennt im Querschnitt eine Skleralspornzelle (SZ) im Bereich ihrer Sehne mit einer elastischen Faser (E). Die Spornzelle hüllt die elastische Faser vollständig ein. Das Zytoplasma der Spornzelle ist ausgefüllt mit quergeschnittenen Aktinfilamenten (Stern), zwischen denen sich zahlreiche „dense bodies“ (Pfeile) befinden. Nur die Bereiche der Zellmembran, in denen „dense bands“ ausgebildet sind, werden von einer Basalmembran bedeckt (Pfeilköpfe), Vergr. 24000:1

**Abb. 6.** Elektronenmikroskopischer Tangentialschnitt durch den Skleralsporn eines 18jährigen Menschen. Eine Nervenendigung (Stern) mit kleinen agranulären Vesikeln (30–60 nm, Pfeil) und großen granulären Vesikeln (65–100 nm, Pfeilkopf) kommt in engen Kontakt mit der Zellmembran der Skleralspornzelle (SZ), Vergr. 24000:1

**Abb. 7.** Elektronenmikroskopischer Tangentialschnitt durch den Skleralsporn eines 24jährigen Menschen. Eine Nervenendigung mit kleinen agranulären (Pfeilkopf) und granulären Vesikeln (Pfeil) befindet sich in unmittelbarer Nähe einer Skleralspornzelle (Stern), Vergr. 45000:1

## Ergebnisse

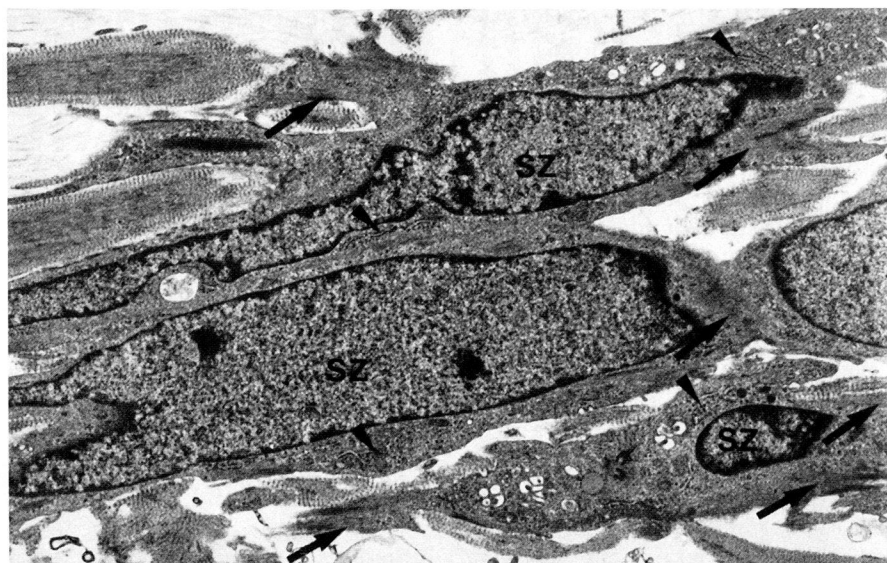
Der Skleralsporn des menschlichen Auges baut sich aus kollagenen Faserbündeln auf, zwischen denen sich ein Netzwerk aus elastischen Fasern erstreckt. Dieses elastische Netzwerk ist mit den elastischen Fasersystemen des Trabekelwerks verbunden. Kollagene und elastische Fasersysteme zeigen im Sporn eine vorwiegend äquatoriale bzw. zirkuläre Verlaufsrichtung. Zwischen dem extrazellulären fibrillären Material befinden sich, locker angeordnet, zahlreiche langgestreckte, flache Skleralspornzellen (Abb. 1), die oft stark verzweigt sind und zahlreiche zytoplasmatische Fortsätze ausbilden. Diese Skleralspornzellen sind ebenfalls vorwiegend äquatorial ausgerichtet. Die Muskelzellen der longitudinalen Ziliarmuskelportion strahlen nicht direkt in den Skleralsporn ein, sondern inserieren am Sporn mittels elasti-



scher Sehnen, die mit dem elastischen Fasernetz des Sporns verbunden sind.

Immunzytochemisch findet sich eine ausgeprägte positive Färbung für glattmuskuläres  $\alpha$ -Aktin in den Zellen des Ziliarmuskels, allerdings ebenso in den Skleralspornzellen (Abb. 2). Dies ist besonders deutlich bei einer tangentialen Schnittführung, die die positiv gefärbten, zirkulär orientierten Skleralspornzellen im gesamten Sporngewebe verteilt zur Darstellung bringt (Abb. 3). Eine entsprechende Färbung findet sich nach einer Inkubation mit Antikörpern gegen Myosin.

Ultrastrukturell ist das Zytoplasma der Skleralspornzellen gefüllt mit zahlreichen 6–7 nm dicken Aktinfilamenten, die parallel zur Zellachse verlaufen (Abb. 1, 4, 5). Zwischen den Filamenten finden sich „dense bodies“ und einzelne Mitochondrien (Abb. 1, 5). Das rauhe endoplasmatische Retikulum und die Golgi-Membranen sind nur in der Nähe des Zellkerns angeschnitten (Abb. 1). Die Zellmembran zeigt zahlreiche Kaveolae (Abb. 4). Die Zellen sind untereinander über Maculae adherentes und Nexus (Gap junctions) verbunden. In unmittelbarer Nähe der Skleralspornzellen verlaufen die elastischen Fasern des Sporns. Diese elastischen Fasern zeigen die gleichen Charakteristika wie für die elastischen Fasern des Trabekelwerks beschrieben [22, 37, 51]. So bestehen sie aus einem weitgehend elektronendichten Kern sowie einer Hülle aus quergebändertem Material mit einer Periodik von 50–60 nm (Abb. 1, 4, 5). Die elastischen Fasern gehen enge Kontakte mit den Skleralspornzellen ein, die Invaginationen und Protrusionen ausbilden und die elastischen Fasern z. T. vollständig umgeben (Abb. 4, 5). Das Hüllmaterial der elastischen Fasern kommt dabei in Kontakt mit der Zellmembran, die „dense bands“ ausbildet (Abb. 4). Die Verlaufsrichtung der elastischen Fasern wird intrazellulär durch die Aktinfilamente der Skleralspornzellen fortgesetzt, so daß sehnartige Strukturen entstehen (Abb. 4). Die Basalmembran der Skleralspornzellen ist unvollständig, nur in der Nähe der sehnartigen Verbindungen sind die Skleralspornzellen immer von einer Basalmem-



**Abb. 8.** Elektronenmikroskopischer Tangentialschnitt durch den Skleralsporn eines 84jährigen Menschen. Im Gegensatz zu den Augen jüngerer Menschen zeigen die Skleralspornzellen (SZ) Bündel an Aktinfilamenten (Pfeile) nur noch im Bereich der zytoplasmatischen Ausläufer. Große Teile des Zytoplasmas sind angefüllt mit rauhem endoplasmatischem Retikulum (Pfeilköpfe), Golgi-Systemen und einzelnen Lysosomen, Vergr. 5950:1

bran bedeckt. In der Umgebung der Skleralspornzellen finden sich Nervenfasern und Nervenendigungen. Dabei können 2 Arten von Nervenendigungen unterschieden werden: Endigungen mit kleinen, agranulären Vesikeln (30–60 nm) und großen granulären Vesikeln (65–100 nm) (Abb. 6) sowie Endigungen mit kleinen agranulären und granulären (30–60 nm) Vesikeln (Abb. 7). Diese Nervenendigungen sind von der Zellmembran der Spornzellen durch einen ca. 100 nm breiten Spalt getrennt, in dem ebenfalls eine Basalmembran vorhanden ist (Abb. 7).

Auch im hohen Alter sind für glattmuskuläres  $\alpha$ -Aktin positive Skleralspornzellen in unveränderter Dichte nachweisbar. Allerdings zeigen die Skleralspornzellen ultrastrukturelle Veränderungen im Vergleich zu den Augen der jüngeren Altersgruppe. So ist die Menge an rauhem endoplasmatischem Retikulum, Ribosomen und Golgi-Material vermehrt, während die Anzahl an 5–6 nm dicken Aktinfilamenten reduziert ist (Abb. 8). Dazu enthalten viele der Zellen nun lysosomale Einschlüsse und Lipofuszingranula.

Auch die elastischen Fasern des Skleralsporns zeigen deutliche Altersveränderungen. So ist das gebänderte

Hüllmaterial deutlich verdickt, wodurch sich breite flächige Platten aus elastischen Fasern bilden, die die Skleralspornzellen und die ansetzenden Ziliarmuskelzellen oft dicht umgeben.

## Diskussion

Die Ausbildung eines prominenten Skleralsporns ist ein charakteristisches Merkmal des Kammerwinkels menschlicher Augen [9, 10, 32, 33]. Unsere Ergebnisse zeigen, daß sich innerhalb des menschlichen Skleralsporns ein System von zirkulär ausgerichteten Zellen (Skleralspornzellen) erstreckt. Diese Zellen unterscheiden sich in ihrer Struktur deutlich von den Zellen des Ziliarmuskels und wurden bisher als Fibroblasten beschrieben [14]. Tatsächlich handelt es sich jedoch, wie unsere Arbeit zeigt, bei den Skleralspornzellen um Myofibroblasten, wie sie in ähnlicher Art auch in anderen Geweben des Körpers wie z.B. der Theca externa des Tertiärfollikels im Ovar [1, 28], den Villi intestinales der Duodenalschleimhaut [12] oder den Alveolarsepten der Lunge [16] gefunden werden. Alle bislang beschriebenen Arten von Myofibroblasten haben kontraktile Eigenschaften [40], so daß wir

davon ausgehen, daß dies auch für die Skleral-spornzellen zutrifft. Dies wird im einzelnen durch folgende Befunde unterstützt. Die Skleral-spornzellen zeigen die typischen ultrastrukturellen Merkmale von Myofibroblasten. So enthalten sie zahlreiche longitudinal ausgerichtete Bündel von 6–7 nm dicken Mikrofilamenten, von denen bekannt ist, daß es sich um sog. Streßfasern handelt, die sich vorwiegend aus Aktin aufbauen [2]. Zudem färben sich die Skleral-spornzellen immunzytochemisch mit Markern, mit denen glatte Muskelzellen und Myofibroblasten spezifisch von Fibroblasten unterschieden werden können [2]. Ein solcher Marker ist das glattmuskuläre  $\alpha$ -Isoaktin [50], von dem bekannt ist, daß es spezifisch in glatten Muskelzellen unterschiedlichster Herkunft, aber auch in Myofibroblasten anfärbbar ist [1, 2, 7, 41, 42].

De Kater et al. [3] beschrieben kürzlich lichtmikroskopisch Zellen im Skleral-sporn, die sich positiv mit Antikörpern gegen glattmuskuläres Myosin färben, und sie hielten diese Zellen für Ziliarmuskelzellen. Allerdings unterscheiden sich die Skleral-spornzellen hinsichtlich zahlreicher Merkmale deutlich von den Zellen des Ziliarmuskels. So färben sich die Zellen des Ziliarmuskels intensiv mit Antikörpern gegen das Intermediärfilament Desmin, das gemeinhin für das typische Zytoskelettfilament aller Arten von Muskelzellen gehalten wird [29]. Im Gegensatz dazu konnten wir zeigen, daß sich die Skleral-spornzellen nicht für Desmin färben [45], sondern für das Intermediärfilament Vimentin, wie auch andere Arten von Myofibroblasten. Auch zeigen die Skleral-spornzellen nicht die charakteristischen ultrastrukturellen Merkmale der Ziliarmuskelzellen, wie die ungewöhnlich große Anzahl an Mitochondrien und den sehr regelmäßigen Aufbau der Myofilamente, der durch die in regelmäßigen Abständen senkrecht zur Zellmembran einstrahlenden „dense bands“ zustandekommt [6, 13, 25, 49]. Die Skleral-spornzellen gruppieren sich nicht zu Bündeln, sondern zeigen eine lockere Anordnung. Im Gegensatz zu glatten Muskelzellen bilden sie keine vollständige Basalmembran aus. Ähnlich wie die Fibroblasten in der

vorderen Sklera und im Irisstroma [31] sind sie durch Nexus bzw. gap junctions verbunden, die zwischen den Ziliarmuskelzellen weder mit Gefrierbruchtechniken [31] noch mit der Transmissionselektronenmikroskopie nachgewiesen werden konnten [24, 43]. Zusammengefaßt zeigen unsere Befunde, daß es sich bei den Skleral-spornzellen um eine, vom Ziliarmuskel unabhängige, kontraktile Zellpopulation handelt.

Vereinzelte, für das glattmuskuläre  $\alpha$ -Aktin positive Zellen wurden kürzlich von De Kater et al. [4] und Flügel et al. [8] auch im Bereich des korneoskleralen und uvealen Trabekelwerks menschlicher Augen beschrieben. Diese Zellen sind allerdings im Alter (>60 Jahre) und bei Glaukomaugen nicht mehr nachweisbar [8]. Im Gegensatz dazu färben sich die Skleral-spornzellen bis ins höchste Alter unverändert positiv für das glattmuskuläre  $\alpha$ -Aktin. Ultrastrukturell zeigen allerdings auch die Skleral-spornzellen Altersveränderungen, so kommt es zu einer deutlichen Zunahme an rauhem endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Systemen. Es besteht die Möglichkeit, daß diese Zunahme an für die Proteinbiosynthese benötigten Organellen in Zusammenhang mit der altersbedingten Vermehrung an extrazellulärem Material im Skleral-sporn steht. So zeigen die elastischen Fasern des Sporns im Alter eine deutliche Zunahme ihres typischen Hüllmaterials, ähnlich wie auch für die elastischen Fasern des Trabekelwerks [23] und der vorderen Spitze des Ziliarmuskels [24] beschrieben. Derartige zytologische Veränderungen finden sich auch in glatter Gefäßmuskulatur und zwar unter Bedingungen, die ebenfalls mit einer vermehrten Produktion an extrazellulärer Matrix einhergehen, wie z. B. der Verdickung der Wandung der Aorta nach einer experimentellen Verletzung des Endothels [19, 30].

Myofibroblasten in anderen Geweben lassen sich von den verschiedensten Neurotransmittern und Pharmaka zur Kontraktion stimulieren. Das Reaktionsmuster zeigt jedoch große Unterschiede von Organ zu Organ und zwischen den einzelnen stimulierenden Substanzen [40]. Die Skleral-spornzellen zeigen sicher nicht

die extrem dichte Innervation des Ziliarmuskels [13, 46, 47, 49].

Allerdings finden sich in enger Nachbarschaft mit den Spornzellen Nervenendigungen mit kleinen agranulären Vesikeln (30–60 nm) und großen granulären Vesikeln (65–100 nm), aber auch Nervenendigungen mit kleinen granulären Vesikeln (30–60 nm). Letztere werden als charakteristisch für adrenerge Nervenendigungen angesehen [39, 48]. Interessanterweise wurden auch im Skleral-sporn des Cynomolgusaffen, nach einer Markierung mit 5-Hydroxydopamin, zahlreiche adrenerge Nervenendigungen beschrieben [27]. Obwohl sicherlich die Innervation der Skleral-spornzellen noch genauer untersucht werden muß, scheint es doch sehr wahrscheinlich, daß diese Zellen, zumindest teilweise, adrenerg innerviert sind. Die Skleral-spornzellen bilden Sehnen mit den elastischen Fasern im Sporn, die mit denen des Trabekelwerks verbunden sind. Eine Kontraktion der Skleral-spornzellen könnte somit einen Einfluß auf die Architektur des Trabekelwerks und damit auf den Abflußwiderstand des Kammerwassers nehmen und eine Erklärung für die Wirkung von Adrenalin darstellen.

Wir danken Frau Simone Klein und Frau Ursi Beckmann für ihre hervorragende technische Assistenz und Herrn Marco Gößwein für die ausgezeichnete Ausarbeitung der Fotografien. Die Arbeit wurde mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Dr 124/6-1) und der Akademie der Wissenschaften und der Literatur, Mainz, unterstützt.

## Myofibroblasts in the human scleral spur

### Summary

Contraction of the ciliary muscle induced by cholinergic drugs causes movement of the scleral spur and separation of the trabecular meshwork lamellae. The effect of epinephrine, however, does not seem to be mediated by ciliary muscle tone. We investigated the scleral spur in 37 human eyes (age 17–87 years). Serial tangential sections were studied with ultrastructural and immunocytochemical

methods. The ciliary muscle cells do not enter the scleral spur, but their tendons, which consist of elastic fibers, are continuous with the elastic fibers in the scleral spur. Within the scleral spur is found a population of circularly oriented and spindle-shaped cells. The scleral spur cells form no bundles, but are loosely aggregated. They have long cytoplasmic processes and are connected to each other by adherence type and gap junctions. The scleral spur cells show intense staining for smooth-muscle-specific  $\alpha$ -actin and myosin. Ultrastructurally, the scleral spur cells contain abundant actin filaments, but otherwise do not show the typical ultrastructure of ciliary muscle cells. The scleral spur cells do not express a complete basal lamina. They form individual tendinous connections with the elastic fibers in the scleral spur, which are continuous with the elastic fibers of the trabecular meshwork. The scleral spur cells are in close contact with nerve terminals containing small granular vesicles that are typical for adrenergic terminals. We conclude that the scleral spur cells are contractile myofibroblasts. Their contraction might be involved in the effects of epinephrine on the aqueous outflow. [Ophthalmologie (1993) 90:66–72]

## Key words

Scleral spur – Myofibroblast – Immunocytochemistry – Ultrastructure – Smooth muscle  $\alpha$ -actin

## Literatur

1. Czernobilsky B, Shezen E, Lifschitz-Mercer B, Fogel M, Luzon A, Jacob N, Skalli O, Gabbiani G (1989) Alpha smooth muscle actin ( $\alpha$ -SM actin) in normal human ovaries, in ovarian stromal hyperplasia and in ovarian neoplasms. *Virchows Arch [B]* 57:55–61
2. Darby I, Skalli O, Gabbiani G (1990)  $\alpha$ -smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest* 63:21–29
3. De Kater AW, Spurr-Michaud SJ, Gipson IK (1990) Localization of smooth muscle myosin-containing cells in the aqueous outflow pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31:347–353
4. De Kater AW, Shahsafaei A, Epstein DL (1992) Localization of smooth muscle and non muscle actin isoforms in the human aqueous outflow pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33:424–429
5. Flocks M, Zweng C (1957) Studies on the mode of action of pilocarpine on aqueous outflow. *Am J Ophthalmol* 44:380–387
6. Flügel C, Bárány EH, Lütjen-Drecoll E (1990) Histochemical differences within the ciliary muscle and its function in accommodation. *Exp Eye Res* 50:219–226
7. Flügel C, Tamm E, Lütjen-Drecoll E (1991) Different cell populations in trabecular meshwork: An ultrastructural and immunohistochemical study. *Exp Eye Res* 52:681–690
8. Flügel C, Tamm E, Lütjen-Drecoll E, Stefani FH (1992) Age-related loss of  $\alpha$ -smooth muscle actin in normal and glaucomatous human trabecular meshwork of different age groups. *J Glaucoma* 1 (in press)
9. Fischer F (1933) Entwicklungsgeschichtliche und anatomische Studien über den Skerlsporn im menschlichen Auge. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 133:318–358
10. Franz V (1934) III. Höhere Sinnesorgane. 1. Vergleichende Anatomie des Wirbeltierauges. In: Bolk L, Göppert E, Kallius E, Lubosch W (Hrsg) *Handbuch der vergleichenden Anatomie der Wirbeltiere*. Urban & Schwarzenberg, München Wien Baltimore, S 1009–1023
11. Grierson I, Lee WR, Abraham S (1978) Effects of pilocarpine on the morphology of the human outflow apparatus. *Br J Ophthalmol* 62:302–313
12. Güldner FH, Wolff JR, Keyserlingk D (1972) Fibroblasts as part of the contractile system in duodenal villi of the rat. *Z Zellforsch* 135:349–360
13. Ishikawa T (1962) Fine structure of the human ciliary muscle. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1:587–608
14. Iwamoto T (1964) Light and electron microscopy of the presumed elastic components of the trabeculae and scleral spur of the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 3:144–156
15. Ito S, Karnovsky MJ (1968) Formaldehyde-glutaraldehyde fixatives containing trinitro compounds. *J Cell Biol* 39:168A–169A
16. Kapanci Y, Assimacopoulos A, Irle C, Zwahlen A, Gabbiani G (1974) "Contractile interstitial cells" in pulmonary septa. *J Cell Biol* 60:375–392
17. Kaufmann PL, Bárány EH (1976) Loss of acute pilocarpine effect on outflow facility following surgical disinsertion and retrodisplacement of the ciliary muscle from the scleral spur in the cynomolgus monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 15:793–807
18. Kaufman PL, Bárány EH (1981) Adrenergic drug effects on aqueous outflow facility following ciliary muscle retrodisplacement in the cynomolgus monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 20:644–651
19. Kocher O, Skalli O, Bloom WS, Gabbiani G (1984) Cytoskeleton of rat aortic smooth muscle cells. Normal conditions and experimental intimal thickening. *Lab Invest* 50:645–652
20. Lepple-Wienhues A, Stahl F, Wiederholt M (1991) Differential smooth muscle-like contractile properties of trabecular meshwork and ciliary muscle. *Exp Eye Res* 53:33–38
21. Lütjen-Drecoll E (1973) Structural factors influencing outflow facility and its changeability under drugs: A study of *Macaca arctoides*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 12:280–294
22. Lütjen-Drecoll E, Futa R, Rohen JW (1981) Ultrahistochemical studies on tangential sections of the trabecular meshwork in normal and glaucomatous eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 21:563–573
23. Lütjen-Drecoll E, Shimizu T, Rohrbach M, Rohen JW (1986) Quantitative analysis of "plaque material" in the inner and outer wall of Schlemm's canal in normal and glaucomatous eyes. *Exp Eye Res* 42:443–455
24. Lütjen-Drecoll E, Shimizu T, Rohrbach M, Rohen JW (1986) Quantitative analysis of "plaque material" between ciliary muscle tips in normal and glaucomatous eyes. *Exp Eye Res* 42:457–465
25. Lütjen-Drecoll E, Tamm E, Kaufman PL (1988) Age changes in rhesus monkey ciliary muscle: Light and electron microscopy. *Exp Eye Res* 47:885–899
26. McLean IW, Nakane PK (1974) Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative: A new fixative for immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem* 22:1077–1083
27. Nomura T, Smelser GK (1974) The identification of adrenergic and cholinergic nerve endings in the trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 13:525–532
28. O'Shea J (1970) An ultrastructural study of smooth muscle-like cells in the theca externa of the ovarian follicle in the rat. *Anat Rec* 167:127–131
29. Osborn M, Weber K (1983) Tumor diagnosis by intermediate filament typing: A novel tool for surgical pathology. *Lab Invest* 48:372–394
30. Poole JC, Cromwell SB, Benditt EP (1971) Behavior of smooth muscle cells and formation of extracellular structures in the reaction of arterial wall to injury. *Am J Pathol* 62:391–414
31. Raviola G, Sagatius MJ, Miller C (1987) Intercellular junctions between fibroblasts in connective tissues of the eyes of macaque monkeys. A thin section and freeze fracture analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28:834–841
32. Rohen JW (1964) Ciliarkörper (Corpus ciliare). In: Möllendorf W von, Barg-

- mann W (Hrsg) Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Bd 3, Teil 4: Haut und Sinnesorgane. Das Auge und seine Hilfsorgane. Springer, Berlin Göttingen Heidelberg New York, S 189–237
33. Rohen JW (1982) The evolution of the primate eye in relation to the problem of glaucoma. In: Lütjen-Drecoll E (ed) Basic aspects of glaucoma research. Schattauer, Stuttgart New York, S 3–33
  34. Rohen JW, Unger H-H (1958) Studies on the morphology and pathology of the trabecular meshwork in the human eye. *Am J Ophthalmol* 46:802–813
  35. Rohen JW, Unger H-H (1959) Zur Morphologie und Pathologie der Kammerbucht des Auges. *Abhandlungen der Mainzer Akademie der Wissenschaften, math-nat Kl.* Bd 3. Steiner, Wiesbaden
  36. Rohen JW, Lütjen E, Bárány EH (1967) The relation between the ciliary muscle and the trabecular meshwork and its importance for the effect of miotics on aqueous outflow resistance. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 172:23–47
  37. Rohen JW, Futa R, Lütjen-Drecoll E (1981) The fine structure of the cribriform meshwork in normal and glaucomatous eyes as seen in tangential sections. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 21:574–585
  38. Romeis B (1989) *Mikroskopische Technik* (Neubearb. u. hrsg. v. Böck P), 17. Aufl. Urban & Schwarzenberg, München Wien Baltimore, S 517–522
  39. Ruskell GL (1982) Innervation of the anterior segment of the eye. In: Lütjen-Drecoll E (ed) Basic aspects of glaucoma research. Schattauer, Stuttgart New York, S 49–66
  40. Skalli O, Gabbiani G (1988) The biology of the myofibroblast: Relationship to wound contraction and fibrocontractive diseases. In: Clark RAF, Henson PM (eds) The molecular and cellular biology of wound repair. Plenum Publishing Corporation, New York, pp 373–402
  41. Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzana G, Gillesen D, Gabbiani G (1986) A monoclonal antibody against  $\alpha$ -smooth muscle actin: A new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* 103:2787–2796
  42. Skalli O, Vanderkerckhove J, Gabbiani G (1987) Actin isoform pattern as a marker of normal or pathological smooth muscle and fibroblastic tissues. *Differentiation* 33:232–238
  43. Tamm E, Lütjen-Drecoll E, Rohen JW (1990) Age-related changes of the ciliary muscle in comparison with changes induced by treatment with prostaglandin  $F_{2\alpha}$ . An ultrastructural study in rhesus and cynomolgus monkeys. *Mech Ageing Dev* 51:101–120
  44. Tamm E, Flügel C, Baur A, Lütjen-Drecoll E (1991) Cell cultures of human ciliary muscle: Growth, ultrastructural and immunocytochemical characteristics. *Exp Eye Res* 53:375–387
  45. Tamm E, Flügel C, Stefani FH, Lütjen-Drecoll E (1992) Contractile cells in the human scleral spur. *Exp Eye Res* 54:531–543
  46. Townes-Anderson E, Raviola G (1976) Giant nerve fibers in the ciliary muscle and iris sphincter of macaca mulatta. *Cell Tissue Res* 169:33–40
  47. Townes-Anderson E, Raviola G (1978) Degeneration and regeneration of autonomic nerve endings in the anterior part of rhesus monkey ciliary muscle. *J Neurocytol* 7:583–600
  48. Uehara Y, Campell GR, Burnstock G (1976) Muscle and its innervation. An atlas of fine structure. Arnold Publishers Limited, London
  49. Van der Zypen E (1967) Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen über den Bau und die Innervation des Ziliarmuskels bei Mensch und Affe (*Cercopithecus aethiops*). *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 174:143–168
  50. Vanderkerckhove J, Weber K (1979) The complete amino acid sequence of actins from bovine aorta, bovine heart, bovine fast skeletal muscle and rabbit slow skeletal muscle. *Differentiation* 14:123–133
  51. Vegge T, Ringvold A (1971) The ultrastructure of the extracellular components of the trabecular meshwork in the human eye. *Z Zellforsch* 115:361–376

Dr. E. Tamm  
Anatomisches Institut  
Lehrstuhl II der Universität  
Universitätsstraße 19  
W-8520 Erlangen