

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. H. HAMPERL)

Über die Enzymaktivität im Fremdkörpergranulationsgewebe*

Von

PETER GEDIGK und ERIKA BONTKE

Mit 11 Textabbildungen

(Eingegangen am 5. Juni 1957)

Werden Fremdkörper in tierischen Geweben abgelagert, so kommt es zu charakteristischen Abwehrreaktionen, deren morphologisches Bild teils durch den Austritt von Blutbestandteilen aus den Capillaren, teils durch eine Gewebsneubildung gekennzeichnet ist. Das Ziel dieser Gewebsantworten, nämlich die Reinigung des Gewebes, wird auf verschiedenen Wegen erreicht:

Große unlösliche Fremdkörper, wie Stahlnadeln oder Kunststofffasern, werden nach dem Abklingen der ersten exsudativen Gewebsreaktionen von einem Granulationsgewebe umgeben, das in ein faserreiches Narbengewebe übergeht und den Fremdkörper gegen die Umgebung abkapselt.

Feindisperse, anorganische Fremdkörper, wie Siliciumdioxydderivate oder Schwermetallverbindungen, werden von den ortsständigen Zellen phagocytiert, die dann Proteine, Mucopolysaccharide und Lipide bilden. Diese organischen Stoffe befinden sich im Cytoplasma genau an der Stelle der Schwermetall- bzw. Siliciumdioxydablagerungen und dienen offenbar als Trägersubstanzen für die anorganischen Fremdkörper. Die phagocytierten Schwermetall- bzw. Siliciumdioxydverbindungen werden dabei von den Trägersubstanzen adsorbiert und anscheinend auch als Salze und Ester gebunden. Offenbar werden sie auf diese Weise unschädlich gemacht. Die reaktive Bildung organischer Stoffe bei der Speicherung schwer löslicher anorganischer Substanzen stellt somit eine Art von Abwehrleistung der Mesenchymzellen gegen Fremdkörper dar^{10, 11, 12}.

Organische körperfremde Substanzen, wie z. B. Eiweißstoffe, werden sehr häufig durch die Einwirkung von Enzymen extracellulär oder intracellulär abgebaut und schließlich resorbiert. Andere organische Fremdkörper, wie ungesättigte Lipide, werden phagocytiert und durch

* Die Arbeit wurde mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Oxydations- und Polymerisationsvorgänge in eine stabile Form übergeführt und gespeichert^{25, 26, 27, 13}.

In allen Fällen werden von den Blutzellen und von den proliferierenden Mesenchymzellen erhebliche Stoffwechselleistungen vollbracht, bei denen enzymatische Vorgänge eine wesentliche Rolle spielen. Für das Verständnis dieser Abwehrreaktionen des Gewebes dürfte daher eine nähere Kenntnis der Fermentaktivität der in Fremdkörpergranulationsgeweben vorkommenden Zellelemente von Bedeutung sein.

Zunächst wäre es wichtig zu wissen, welche *Enzyme in einem Fremdkörpergranulationsgewebe nachweisbar sind, und in welchen Zellen und Zellbezirken diese Fermente auftreten*. Von besonderem Interesse sind ferner die enzymatischen Leistungen der Fremdkörperriesenzellen, deren funktionelle Bedeutung bei diesen Abwehrvorgängen nach wie vor umstritten ist. Weiterhin ist zu klären, ob Unterschiede bestehen zwischen den Gewebsreaktionen auf verschiedenartige Fremdkörper. Und schließlich wäre festzustellen, welche morphologischen Beziehungen bestehen zwischen den in Siliciumdioxydablagerungen auftretenden organischen Trägersubstanzen und den in diesen Granulomen nachweisbaren Enzymen.

Zur Klärung dieser Fragen implantierten wir eine Reihe von Fremdkörpern in die Subcutis von Mäusen und Ratten. Wir verwendeten für diese Versuche verschiedenartige Substanzen, die bei der Ablagerung in tierischen Geweben ein sehr unterschiedliches Schicksal erleiden, nämlich *synthetische Kunststoffe* (Polystan und chirurgisches Nahtmaterial), *Siliciumdioxysterivate* (kolloidale Kieselsäure, Talkum und Quarz), *Proteine* (Gelatine und Fibrinschaum) und *Ester ungesättigter Fettsäuren*. In diesen experimentell erzeugten Fremdkörpergranulomen verfolgten wir dann die Enzymaktivität der einzelnen Zellelemente.

Für die Lösung eines derartigen Problems ist die Anwendung histochemischer Methoden unerlässlich, da es nur mit diesen Nachweisreaktionen möglich ist, die Enzymaktivität in verschiedenen, dicht nebeneinander liegenden Zellen morphologisch zu erfassen und vielfach auch in ganz bestimmten Zellarealen zu lokalisieren.

Versuchsordnung und Methoden

A. Tierversuche

Bei den Versuchen verwendeten wir 10—20 Wochen alte weiße Inzuchtmäuse und Ratten, welche eine Mischkost (Würfelfütterung und Getreide) erhielten. Außerdem gaben wir zusätzlich Salatblätter und Karotten. Die Experimente wurden mit insgesamt 110 Mäusen und 11 Ratten durchgeführt. Diesen Tieren wurden die Fremdkörper je nach ihrer Beschaffenheit als Aufschwemmung, bzw. als Emulsion subcutan am Rücken injiziert oder chirurgisch implantiert.

B. Folgende Fremdkörper wurden subcutan injiziert, bzw. implantiert*I. Nicht resorbierbare organische Fremdkörper und Kunststoffe*
(23 Mäuse und 6 Ratten)

1. Polystan (chirurgisches Plombenmaterial für Lobektomien; hochpolymerisierter Kunststoff; Fa. R. Graf & Co., Süddeutsche Catgutfabrik, Nürnberg) wurde in einer Klopfmühle zerkleinert und bei 14 Mäusen und 3 Ratten in die Subcutis implantiert. Tötung der Tiere nach 5, 7, 13, 18, 21, 25, 29, 41, 46, 49, 81, 100, 116, 149, 300 und 370 Tagen.

2. Tensofil (synthetisches chirurgisches Nahtmaterial; hochpolymerisierter Kunststoff; Fa. R. Graf & Co.). Implantation bei 3 Mäusen und 1 Ratte. Tötung der Tiere nach 107, 174, 188 und 288 Tagen.

3. Sterilozwirn (chirurgisches Nahtmaterial pflanzlicher Herkunft; Fa. R. Graf & Co.). Implantation bei 3 Mäusen. Tötung der Tiere nach 46, 162 und 174 Tagen.

4. Hanffasern. Wir verwendeten Fasern, die als Abdichtung für Wasserleitungen im Handel sind. Implantation bei 1 Maus und 2 Ratten. Tötung der Tiere nach 18, 41 und 53 Tagen.

II. Siliciumdioxiddervivate (38 Mäuse und 3 Ratten)

1. Kieselsäure. 12 Mäusen wurden 0,1 ml einer 10%igen wäßrigen Aufschwemmung von kolloidaler Kieselsäure (Merck 657, Teilchengröße 0,1 μ) subcutan injiziert. Tötung der Tiere nach 6, 10, 15, 26, 30, 55, 82, 90, 100 und 104 Tagen.

2. Quarz. 0,1 ml einer 10%igen wäßrigen Aufschwemmung von reinem Quarz (Teilchengröße unter 5 μ) wurde 13 Mäusen subcutan injiziert. Tötung der Tiere nach 9, 20, 30, 55, 93, 104, 161, 169, 180 und 303 Tagen.

3. Talkum. 10 Mäusen wurden 0,1 ml einer 10%igen wäßrigen Aufschwemmung von Talkum (Merck 8070, Teilchengröße unter 5 μ) subcutan injiziert. Tötung der Tiere nach 13, 21, 29, 41, 49, 81, 105, 148, 180 und 321 Tagen.

4. Glaswolle. Mit Salzsäure gewaschene, bleifreie Glaswolle (Merck 4086) wurde im Mörser zerkleinert und 3 Mäusen und 3 Ratten in die Subcutis implantiert. Die Tiere wurden nach 18, 41, 55, 107, 116 und 181 Tagen getötet.

III. Resorbierbare organische Fremdkörper (Eiweißstoffe)
(24 Mäuse und 2 Ratten)

1. Gelatine. 20%ige Gelatine (Fa. Delft) in 1%igem Phenolwasser 30 min bei Zimmertemperatur und 24 Std bei 37° C quellen lassen. Die flüssige Masse wurde in einer Glasschale dünn ausgegossen, nach dem Erstarren in runde Plättchen von 3 mm Durchmesser geschnitten und subcutan bei 11 Mäusen und 1 Ratte implantiert. Die Tiere wurden nach 6, 12, 27, 35, 49, 54 und 57 Tagen getötet. Eine längere Versuchsdauer war zwecklos, weil die Gelatine schnell resorbiert wurde und schon nach 6 Wochen nur noch spärliche Reste dieses Fremdkörpers in der Subcutis zu finden waren.

2. Sterilogutt (chirurgisches Nahtmaterial tierischer Herkunft; Fa. R. Graf & Co.) wurde 2 Mäusen in die Subcutis implantiert. Tötung der Tiere nach 48 und 107 Tagen.

3. Fibrospum (aus Blutplasma gewonnener Fibrinschaum; Nordmark-Werke Hamburg, Uetersen, Holstein). Je ein kleines Plättchen Fibrospum wurde 11 Mäusen in die Subcutis implantiert. Tötung der Tiere nach 13, 19, 21, 49 81 und 110 Tagen.

IV. Fettsäureester* (26 Mäuse)

1. Methylester hochungesättigter C₂₀ und C₂₂ Polyensäuren aus *Lebertran* (JZ = 307).

a) *Völlig ungefärbte, in N₂-Atmosphäre aufbewahrte Substanz.* Die 15%ige Emulsion wurde in Stickstoffatmosphäre hergestellt und bis zur unmittelbaren Injektion aufbewahrt, um eine Oxydation zu verhindern (9 Mäuse). Tötung der Tiere nach 6, 13, 24, 35, 41, 50, 77, 99 und 218 Tagen.

b) Die gleiche Substanz wie unter a wurde mehrere Monate bei Zimmer-temperatur unter Sauerstoffzutritt stehengelassen und färbte sich dabei braun. Sie wurde dann gleichfalls emulgiert und als 15%ige Emulsion 6 Mäusen injiziert. Tötung der Tiere nach 36, 51, 60, 78, 150 und 210 Tagen.

c) Die gleiche Substanz wie unter a und b wurde mit H₂O₂ behandelt und dann als 15%ige Emulsion 5 Mäusen subcutan injiziert. Tötung der Tiere nach 29, 48, 100, 160 und 163 Tagen.

2. *Lebertran (DAB 6).* 0,1 ml einer 10%igen Emulsion wurde in die Subcutis von 6 Mäusen injiziert. Tötung der Tiere nach 3, 6, 13, 24 und 41 Tagen.

C. Histochemische Methoden

Reaktionen zum Nachweis von Enzymen

1. **Saure Phosphatase.** a) *Bleiphosphatmethode nach GOMORI (1950)¹⁶.* Substrat: Natrium- β -Glycerophosphat. Inkubation: p_H 5,0—5,1, 37° C, 15 min bis 4 Std.

b) *Azofarbstoffmethode nach GROGG und PEARSE (1952)²³.* Substrat: α -Naphthylphosphat; *Diazoniumsalz:* diazotiertes o-Dianisidin. Inkubation: p_H 5,1, 20° C, 1—2 Std.

2. **Alkalische Phosphatase.** a) *Calcium-Kobaltmethode nach GOMORI (1946)¹⁹.* Substrat: Natrium- β -Glycerophosphat. Inkubation: p_H 9,2, 37° C, 15 min bis 4 Std.

b) *Azofarbstoffmethode nach PEARSE (1953)³⁹.* Substrat: Natrium- α -Naphthylphosphat, *Diazoniumsalz:* diazotiertes 4-Benzoylamino-2,5-Dimethoxyanilin oder 4-Chloro-o-anisidin. Inkubation: p_H 9,2, 20° C, 15 min bis 4 Std.

3. **Unspezifische Esterase** [GOMORI (1952, 1953, 1955)^{18, 19, 20}, PEARSE (1953)³⁹]. a) *Substrat:* α -Naphthylacetat. *Diazoniumsalz:* Diazotiertes o-Dianisidin. Inkubation: p_H 7,4, 20° C, 20—30 min.

b) *Substrat:* Naphthol-AS-Acetat. *Diazoniumsalz:* diazotiertes 4-Benzoylamino-2,5-Dimethoxyanilin. Inkubation: p_H 7,2, 20° C, 1—2 Std.

4. **Lipasen** [GOMORI (1950, 1953)^{17, 19}, PEARSE (1953)³⁹]. *Substrat:* Tween 60 (Polymannitolstearinsäureester) oder Tween 80 (Polymannitololeinsäureester). Inkubation: p_H 7,2, 37° C, 6—24 Std.

5. **Phosphoamidase** [GOMORI (1953)¹⁹, PEARSE (1953)³⁹]. *Substrat:* p-Chloroanilidophosphorsäure. Inkubation: p_H 5,5—5,6, 37° C, 6—12 Std.

6. **β -Glucuronidase** BURTON und PEARSE (1952)³. *Substrat:* 8-Oxychinolin-glucuronid. Inkubation: p_H 5,2, 37° C, 5—24 Std.

7. **Amino-peptidase** BURSTONE und FOLK (1956)². *Substrat:* l-Leucyl- β -Naphthylamid. *Diazoniumsalz:* diazotiertes o-Aminoazotoluol (Fast Garnet GBC Salz). Inkubation: p_H 5,8 oder 6,9, 20° C, 15 min bis 2 Std.

8. **5-Nucleotidase** [GOMORI (1949)¹⁵; PEARSE und REIS (1952)³³]. *Substrat:* Adenosin-5-Phosphorsäure. Inkubation: p_H 7,5, 37° C, 3—18 Std.

* Herrn Prof. Dr. KLENK, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Köln, danken wir für die liebenswürdige Überlassung von Substanzproben dieser Fettsäuremethylester.

9. Bernsteinsäuredehydrogenase [SELIGMAN und RUTENBERG (1951)⁴⁴, PEARSE (1953)³⁹]. *Substrat*: Natriumsuccinat, *Tetrazoliumsalz*: a) Blue Tetrazoliumsalz. b) Neotetrazoliumsalz. *Inkubation*: p_H 7,6, 37° C, a) 30 min bis 4 Std. b) 5—30 min.

10. Oxydase (Cytochromoxydase) [MOOG (1943)³⁷, PEARSE (1953)³⁹]. Oxydation von Dimethyl-p-Phenylendiamin und α -Naphthol unter Bildung von Indophenolblau. *Inkubation*: 37° C, 2—5 min.

11. Peroxydase [DE ROBERTIS und GRASSO (1946)⁴², PEARSE (1953)³⁹]. Oxydation von Benzidin oder α -Naphthol in Gegenwart von H_2O_2 . *Inkubation*: 20° C, 2 min.

Die Grundlagen und die Durchführung der histochemischen Methoden zum Nachweis von Enzymen finden sich in den zusammenfassenden Darstellungen von GOMORI¹⁹ und PEARSE³⁹. Auf Einzelheiten der Methodik und der erforderlichen Kontrollversuche haben wir außerdem in einer früheren Mitteilung hingewiesen¹⁴.

Bei der Einbettung des Gewebes, die bei einer Reihe von Fermentnachweisen zweckmäßig ist, bewährte sich erneut das unlängst angegebene Vorgehen: Die sehr dünnen Gewebsstücke werden bei +4° C 4—12 Std in Aceton fixiert. Anschließend werden diese Gewebstückchen 2mal 1 Std bei Zimmertemperatur in Aceton, 1 Std in 2 Chargen absoluten Äthanol, 1 Std in 2 Chargen Äther-Äthanol (1:1) und 2mal 30 min in Benzol gebracht. Durch die Paraffindurchtränkung im Vakuumbrutschrank (+58° C) konnten wir die Zeit für die Einbettung auf 2mal 30 min und manchmal sogar auf 2mal 20 min abkürzen und somit größere Aktivitätsverluste der Enzyme vermeiden. Außerdem lassen sich Diffusions- und Adsorptionsartefakte weitgehend ausschalten. So beobachteten wir z. B. bei den Reaktionen für saure Phosphatase keine Diffusion des Fermentes oder der Reaktionsprodukte des Enzymnachweises in die Zellkerne.

Untersuchungsergebnisse

I. Kunststoffgranulome (nicht resorbierbare, organische Fremdkörper)

Nach der Implantation der Fremdkörper kam es zunächst zu einer exsudativen Gewebsreaktion, die meistens nach etwa 14 Tagen beendet war. Nur gelegentlich trat infolge einer Infektion der Operationswunde eine länger dauernde, eitrig-abscedierende Entzündung auf.

In der Regel begann schon sehr bald (nach etwa 2 Wochen) an der Implantationsstelle eine Gewebsneubildung, die durch die Vermehrung und Einwanderung von Bindegewebszellen, sowie durch eine Sprossung und Neubildung von Capillaren gekennzeichnet war. Bei dieser proliferativen Gewebsreaktion beherrschten schließlich die gewucherten histiocytären Elemente das Bild, während Lymphocyten und vor allem Leukocyten weitgehend in den Hintergrund traten. Die vorwuchernden Histiocyten kamen dabei mit den Fremdkörpern in enge Berührung. Sie lagerten sich vielfach geradezu an sie an und phagocytierten kleinere Kunststoffpartikel. Gleichzeitig entstanden typische Fremdkörperriesenzellen, die sich ebenfalls in der unmittelbaren Nähe der Fremdkörperteilchen ansammelten.

Mit *histochemischen Methoden* ließen sich schon nach 7 Tagen in den Zellen der Fremdkörpergranulome eine Reihe von Enzymen nachweisen:

Zunächst haben wir das Verhalten der *sauren Phosphatase* (vgl. Abb. 1a) geprüft und dabei gefunden, daß sich bereits nach einer kurzen Bebrütung der Schnitte mit der gepufferten Glycerophosphat-Bleinitratlösung (p_H 5,1) im Cytoplasma der mononucleären Phagocyten und der Riesenzellen mit Ammoniumsulfid schwarze, gekörnte Niederschläge darstellen lassen. Bringt man die Schnitte für längere Zeit in die Substrat-Pufferlösung, so werden die Präcipitate umfangreicher und schließlich (nach 4—5 Std) entstehen fast homogene Niederschläge, die keine cytologischen Einzelheiten mehr erkennen lassen.

Die Fermentaktivität ist in den einkernigen Phagocyten in der Regel gleichmäßig über das ganze Cytoplasma verteilt. In den Riesenzellen ist das Bild nicht einheitlich. Die Phosphataseaktivität tritt zwar vorzugsweise in den dem Fremdkörper anliegenden Cytoplasmagebieten und in den zentralen Zellbezirken auf,

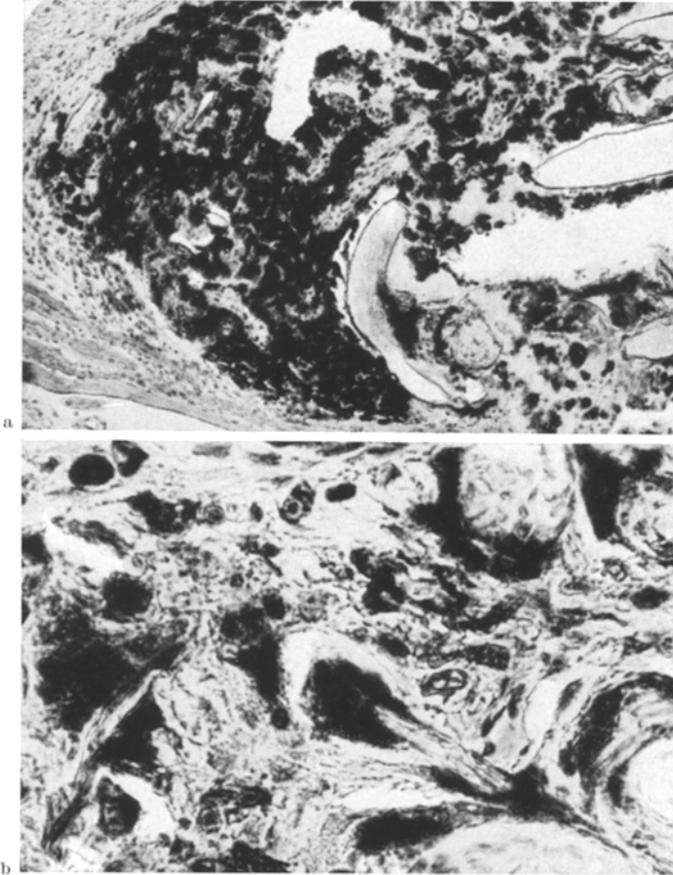


Abb. 1a u. b. Polystangranulom (100 Tage nach der Implantation). a Saure Phosphatase (GOMORI), Inkubationszeit 90 min. Kernfärbung: Hämatoxylin, Vergr. 94mal. b Phosphoamidase, Inkubationszeit 7 Std. Vergr. 630mal. Die sich mit dem Kunststoff auseinandersetzen einkernigen und mehrkernigen Zellen besitzen eine ausgeprägte Aktivität dieser hydrolytischen Enzyme

gelegentlich findet man dieses Enzym aber auch nur in der Peripherie der Riesenzellen.

Weiterhin ist die Phosphataseaktivität in denjenigen Zellen am stärksten, die sich unmittelbar mit den Fremdkörpern auseinandersetzen. Die Schwärzung des Cytoplasmas tritt daher am frühesten in den Zellen auf, die in der Nachbarschaft der Fremdkörper liegen. Erst bei längeren Inkubationszeiten (2—3 Std) zeigen auch die etwas weiter entfernten Histiocyten eine Phosphataseaktivität. Die

Fibroblasten in der bindegewebigen Kapsel der Granulome geben gleichfalls nur eine schwache, inconstante Fermentreaktion. In jedem Fall aber bleibt die Aktivität der sauren Phosphatase auf die Zellen des Fremdkörpergranuloms beschränkt; die in der weiteren Umgebung liegenden Mesenchymzellen besitzen keine histochemisch nachweisbare saure Phosphatase.

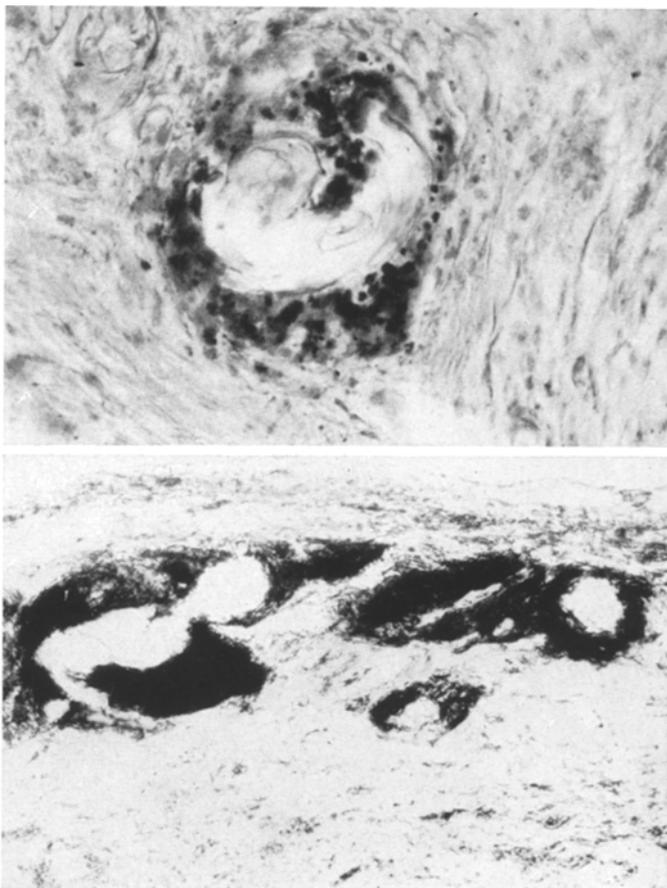


Abb. 2a u. b. Polystangranulom (a 100 Tage, b 149 Tage nach der Implantation). a β -Glucuronidase, Inkubationszeit 21 Std. Kernfärbung: Kernechtrot, Vergr. 630mal. b Aminopeptidase, Inkubationszeit 2 Std. Kernfärbung: Hämatoxylin, Vergr. 380mal. Die mononucleären Phagocyten und Riesenzellen zeigen eine starke Glucuronidase- und Aminopeptidaseaktivität

Ein ähnliches Verhalten wie die saure Phosphatase zeigt die *Phosphoamidase* (Abb. 1b).

Bei der Nachweisreaktion für *unspezifische Esterase* mit α -Naphthylacetat als Substrat kam es fast immer zu einer Anfärbung des Cytoplasmas der Riesenzellen, während die mononucleären Phagocyten in der Regel keine Enzymaktivität aufwiesen. Demgegenüber ließ sich mit Naphthol-AS-Acetat als Substrat eine

Esteraseaktivität in den Fibroblasten in der bindegewebigen Kapsel der Granulome nachweisen. In den phagocytierenden Zellen war mit dieser Methode keine Fermentaktivität feststellbar.

Eine schwache *Lipaseaktivität* beobachteten wir gelegentlich in den Riesenzellen. Die einkernigen Phagocyten färbten sich bei dieser Enzymreaktion nicht an.

β -Glucuronidase konnten wir fast regelmäßig in mononucleären Phagocyten und Riesenzellen nachweisen (vgl. Abb. 2a). Beide Zelltypen wurden bei der Anwendung der Nachweismethode für dieses Enzym stark anfärbt. Wegen des grobkörnigen Reaktionsproduktes dieses Enzymnachweises war eine nähere Lokalisation der *β -Glucuronidase* innerhalb der Zellen nicht sicher durchführbar. Außerdem besaßen die Fibroblasten eine deutliche *β -Glucuronidaseaktivität*.

Eine starke Aktivität von *Aminopeptidase* (Abb. 2b) fanden wir in den Riesenzellen und einkernigen Phagocyten. In den Fibroblasten und Capillarwänden war diese Fermentreaktion nur schwach positiv.

Peroxydase und Oxydasen beobachteten wir regelmäßig in den polymorphkernigen Leukocyten, und zwar sowohl in den Capillaren als auch in den Granulocyten, die in das Granulom eingewandert waren. Die einkernigen Phagocyten und Riesenzellen enthielten keine Peroxydasen und Oxydasen.

Alkalische Phosphatase fanden wir fast stets in den Capillaren am Rand der Granulome. Dagegen besaßen die neugebildeten, in das Granulom einsprossenden Capillaren keine Phosphataseaktivität. Auch die phagocytierenden Zellen enthielten keine histochemisch nachweisbare alkalische Phosphatase.

5-Nucleotidase und Dehydrogenasen ließen sich mit unseren Methoden in den Kunststoffgranulomen nicht nachweisen.

II. Siliciumdioxidgranulome (kolloidale Kieselsäure, Quarz und Talkum)

Die subcutane Speicherung von Siliciumdioxidverbindungen führt, wie seit langem bekannt, zu Gewebsreaktionen, bei denen teils die Zellproliferation, teils die Faserbildung im Vordergrund steht. In der jüngsten Zeit konnte außerdem gezeigt werden¹², daß bei der Verarbeitung von Siliciumdioxidverbindungen in den phagocytierenden Zellen organische Stoffe, wie Mucopolysaccharide, Proteine und Lipide entstehen. Diese neu gebildeten organischen Substanzen treten in enge morphologische und chemische Beziehungen zu den gespeicherten Siliciumdioxidverbindungen und dienen offenbar als *Trägersubstanzen* für diese anorganischen Fremdkörper¹².

In einer früheren Mitteilung war bereits darauf hingewiesen worden, daß die quarzspeichernden Mesenchymzellen eine ausgesprochene Aktivität von saurer Phosphatase besitzen (GEDIGK)¹⁰. Etwa gleichzeitig berichtete SCHMIDT-MATTHIASEN⁴⁵ ebenfalls von der starken Aktivität dieses Fermentes in Kieselsäuregranulomen.

Mit unseren jetzt durchgeführten Experimenten konnten wir zunächst die älteren Befunde bestätigen: Bei der Nachweisreaktion für *saure Phosphatase nach GOMORI* traten in den phagocytierenden Zellen regelmäßig braunschwarze Körnchen auf, die bei längeren Inkubationszeiten, genau wie bei anderen Granulomen, zu homogenen, schwarzen Präcipitaten zusammenflossen. Dieser Befund ließ sich durch die *Azofarbstoffmethode* für saure Phosphatase sichern, bei der die phagocytierenden Zellen selektiv einen tiefroten Farbton annahmen (vgl. Abb. 3, 4a).

In den Kieselsäuregranulomen entsprachen die Anordnung und die Größe der zunächst auftretenden körnigen Niederschläge weitgehend der mit der PAS-Reaktion nachweisbaren organischen Trägersubstanz. Auffällig war die unterschiedliche

Verteilung der sauren Phosphatase in den Riesenzellen der Talkum- und Quarzgranulome. Während in den meisten Riesenzellen die Fermentaktivität annähernd gleichmäßig im Zelleib auftrat oder sogar in den zentralen Abschnitten besonders

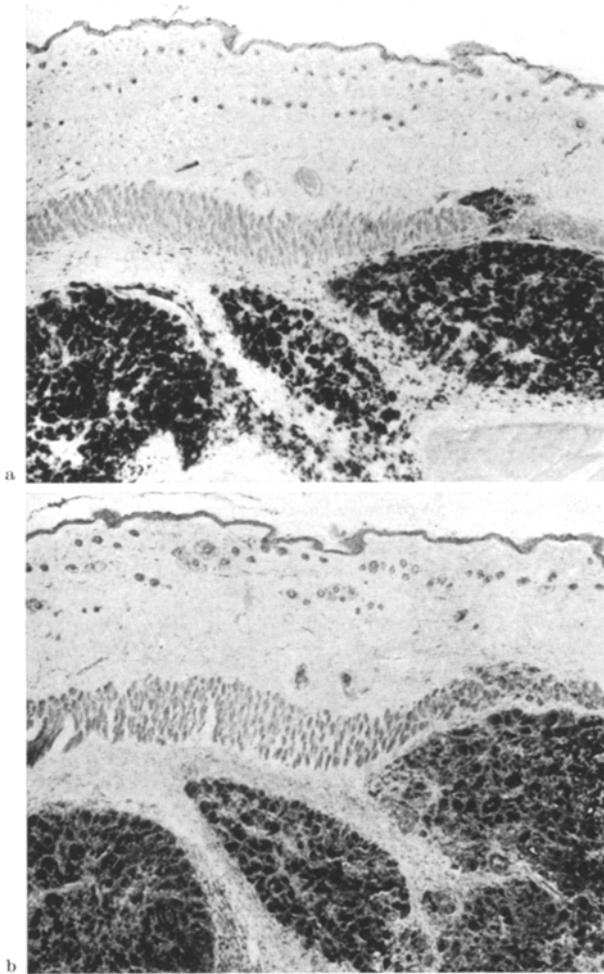


Abb. 3a u. b. Talkumgranulom (41 Tage nach der Implantation). Zwei dicht aufeinander folgende Serienschnitte des gleichen Gewebstückchens. Vergr. 32mal. a Saure Phosphatase (GOMORI), Inkubationszeit 30 min. Kernfärbung: Hämatoxylin. b Saure Phosphatase (Azofarbstoffmethode), Inkubationszeit 2 Std. Kernfärbung: Hämatoxylin. Deutliche Enzymaktivität der phagocytierenden Zellen. Es zeigt sich, daß mit diesen beiden, auf verschiedenen Prinzipien beruhenden Methoden das gleiche Ergebnis erzielt wird

deutlich war, blieb die Phosphatasereaktion in einigen Zellen auf die *kernhaltige Mantelschicht* beschränkt (vgl. Abb. 11). Eine geringe Aktivität von saurer Phosphatase beobachteten wir manchmal auch in den Fibroblasten der Granulomkapseln.

Phosphoamidase konnten wir in den Phagocyten der Siliciumdioxidgranulome regelmäßig nachweisen. Die intracelluläre Verteilung dieses Enzyms stimmte fast völlig mit der Lokalisation der sauren Phosphatase überein (Abb. 4b). In den

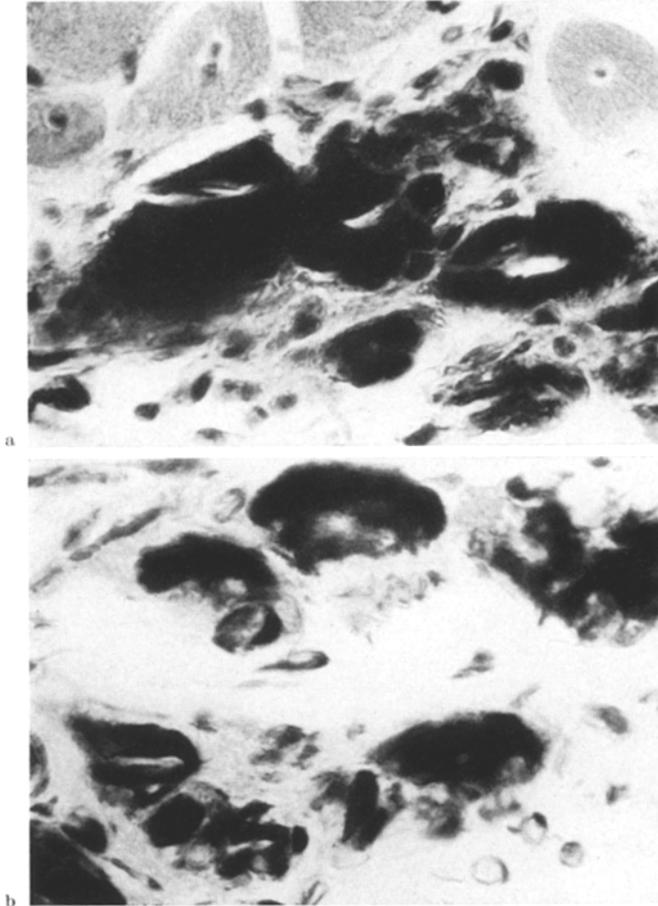


Abb. 4 a u. b. Talkumgranulom (105 Tage nach der Implantation). a Saure Phosphatase (GOMORI), Inkubationszeit 2 Std. Kernfärbung: Hämatoxylin, Vergr. 576mal. b Phosphoamidase, Inkubationszeit 10 Std. Vergr. 576mal. Die phagozytierenden Zellen besitzen eine ausgeprägte Aktivität dieser hydrolytischen Enzyme

Fibroblasten war demgegenüber nur gelegentlich eine schwache Phosphoamidaseaktivität zu finden.

Unspezifische Esterase fanden wir mit der α -Naphthylacetat-Methode häufig (jedoch nicht regelmäßig) in Riesenzellen und gelegentlich auch in einzelnen einkernigen Phagocyten. Die Fibroblasten der bindegewebigen Kapsel des Granuloms zeigten bei der Verwendung von Naphthol-AS-Acetat als Substrat eine deutliche Esteraseaktivität. Eine *Lipaseaktivität* war in diesen Granulomen nicht feststellbar.

Die Riesenzellen und die einkernigen Phagocyten besaßen stets eine starke Aktivität von β -Glucuronidase (Abb. 5a). Auch in den Fibroblasten der Granulomkapsel und in den Capillaren ließ sich dieses Enzym häufig nachweisen.

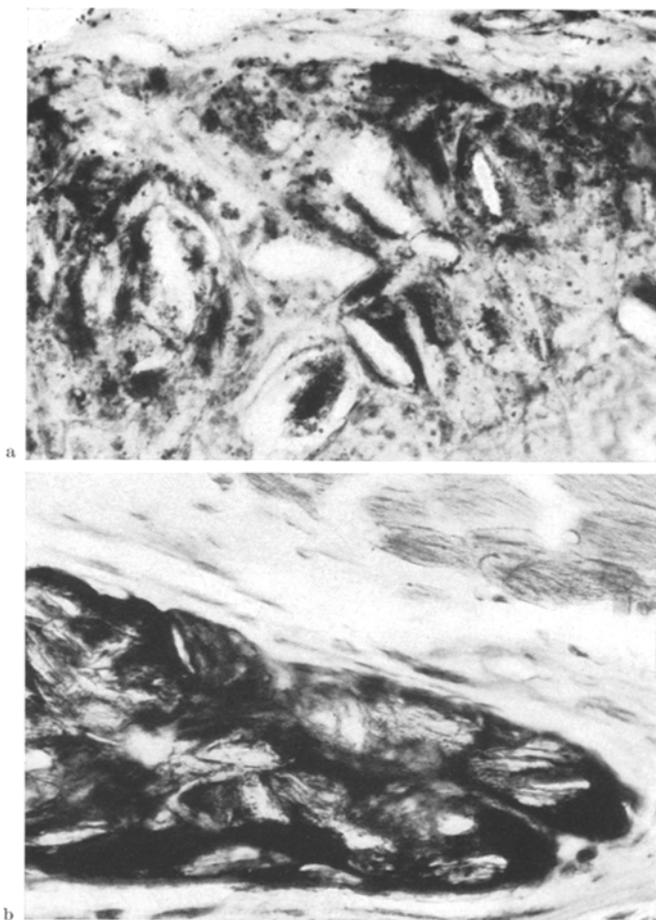


Abb. 5a u. b. Talkumgranulom (a 105, b 148 Tage nach der Implantation). a β -Glucuronidase, Inkubationszeit 6 Std. Kernfärbung: Kernechtrot, Vergr. 400mal. b Aminopeptidase, Inkubationszeit 30 min. Kernfärbung: Hämatoxylin, Vergr. 360mal. Die phagocytierenden Zellen besitzen eine starke Glucuronidase- und Aminopeptidaseaktivität

Sehr ausgeprägt war die *Aminopeptidaseaktivität* phagocytierender Zellen, wie aus der Abb. 5b hervorgeht. Demgegenüber fand sich in den Fibroblasten und Capillarwänden nur eine schwache Aktivität dieses Fermentes.

Peroxydase und Oxydasen fanden wir in den polymorphkernigen Leukocyten.

Alkalische Phosphatase war in den Capillaren am Rand der Granulome vorhanden.

5-Nucleotidase und Dehydrogenasen konnten wir auch in den Siliciumdioxidgranulomen nicht nachweisen.

In besonderen Versuchen haben wir geprüft, *welche morphologischen Beziehungen zwischen den Stellen der Phosphataseaktivität und der in den Kiesel-*

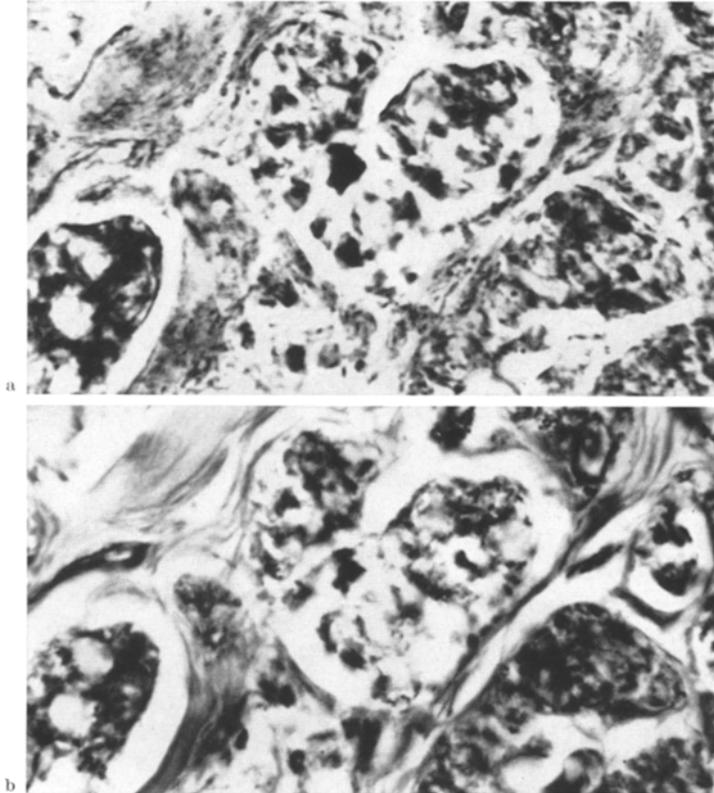


Abb. 6a u. b. Kieselsäuregranulom (90 Tage nach der Injektion). Vergr. 1296mal. a Saure Phosphatase, Azofarbstoffmethode, Inkubationszeit 1 Std. Kernfärbung: Hämatoxylin. b Der gleiche Schnitt wie a nach der Entfernung des Azofarbstoffes mit Aceton und Äthanol und anschließender PAS-Reaktion. Die polysaccharidhaltige organische Trägersubstanz findet sich im Cytoplasma der Phagocyten genau an den Stellen der Phosphataseaktivität

säuregranulomen auftretenden PAS-positiven organischen Trägersubstanz bestehen. Dabei sind wir so vorgegangen, daß wir an ein und demselben histologischen Schnitt nacheinander die Aktivität der sauren Phosphatase und die polysaccharidhaltige organische Trägersubstanz dargestellt und fotografiert haben:

Zunächst fertigten wir von den Schnitten, an denen die Aktivität der sauren Phosphatase mit der Bleiphosphatmethode nach GOMORI oder dem Azofarbstoffverfahren dargestellt worden war, eine Photographie an. Dann brachten wir die Schnitte 10 min in 20%ige Salzsäure oder in 2%igen Salzsäurealkohol, um das

jeweilige Endprodukt des histochemischen Enzymnachweises, nämlich das Bleisulfid, bzw. den Azofarbstoff zu entfernen. Anschließend wurde die PAS-Reaktion durchgeführt und das Ergebnis nochmals photographiert. Der Vergleich der beiden Bilder zeigte, daß die PAS-positiven Granula genau an den Stellen der Aktivität der sauren Phosphatase liegen, daß also die organische Trägersubstanz selbst dieses Enzym enthält (vgl. Abb. 6).

Wie wir in früheren Experimenten gezeigt hatten, wird die PAS-positive organische Trägersubstanz von den Phagocyten der Kieselsäuregranulome sehr langsam gebildet, und zwar erst 3—5 Wochen nach der Injektion¹². Führt man nun die Phosphatasereaktion an jüngeren Granulomen durch, in denen noch keine Trägersubstanz nachweisbar ist, so werden die Stellen der Fermentaktivität ebenfalls als kleine braunschwarze Körnchen markiert, die annähernd gleichmäßig im Cytoplasma verteilt sind. Nach der Entfernung der Bleisulfidniederschläge sind dann in diesen Präparaten noch keine PAS-positiven Granula vorhanden. Es zeigt sich also, daß die Aktivität der sauren Phosphatase früher auftritt als die organische Trägersubstanz für die Kieselsäure.

Die morphologischen Beziehungen zwischen der kieselsäurehaltigen, PAS-positiven Trägersubstanz und anderen Enzymen, die in den Phagocyten auftreten, wie der Phosphoamidase, β -Glucuronidase und Aminopeptidase konnten wir nicht genauer bestimmen, da die histochemischen Nachweisreaktionen dieser Fermente für eine feinere cytologische Lokalisation ungeeignet sind. Wir müssen uns daher auf die Feststellung beschränken, daß es in den phagocytierenden Zellen zu einer erhöhten Aktivität dieser Enzyme kommt, und die Frage vorerst offen lassen, ob die gesteigerten Fermentaktivitäten in der organischen Trägersubstanz selbst oder im benachbarten Cytoplasma lokalisiert sind.

III. Resorbierende Fremdkörpergranulome (abzubauende, organische Fremdkörper)

In diesen Versuchsgruppen haben wir das Verhalten von Mesenchymzellen verfolgt, welche abbaufähige Eiweißstoffe, wie Fibrin, Gelatine usw. verarbeiten.

Auch an den Implantationsstellen dieser Eiweißstoffe entwickelte sich nach einer kurzen (8—14 Tage dauernden) exsudativen Gewebsreaktion ein typisches Fremdkörpergranulationsgewebe mit einsprossenden Capillaren, sowie mononucleären Phagocyten und Riesenzellen. Die teils fädigen und teils amorphen Fremdkörper wurden dabei von den eingewanderten und neu gebildeten Zellen umschlossen und vielfach phagocytiert.

Das morphologische Bild dieser resorbierenden Fremdkörpergranulome war nicht so einheitlich wie bei anderen Granulomen, da das Ausmaß der Zellproliferation und das Auftreten von Riesenzellen weitgehend von der Resorbierbarkeit und Größe der Fremdkörper abhing. Ganz allgemein zeigte es sich, daß die Zellproliferation um so geringer war, je leichter der jeweilige Fremdkörper abgebaut werden konnte und je kleiner die implantierten Fremdkörperpartikel waren. So beobachteten wir z. B. bei der Verarbeitung von *Gelatine* in der Regel nur eine schwache Neubildung von histiocytären Elementen, und Riesenzellen traten in diesen Granulomen nur außerordentlich selten auf. Demgegenüber entwickelte sich nach der Implantation von *Fibrinschaum (Fibrosponum)*, der nur sehr langsam aufgelöst wurde, ein zell- und gefäßreiches, typisches Fremdkörpergranulationsgewebe mit zahlreichen Riesenzellen. Die *Fibrosponum*granulome wiesen darüber hinaus insofern eine Besonderheit auf, als die Fibrinfäden mehr und mehr verkalkten. Eine Reihe von Enzymnachweisen, und zwar vor allem die Gomori-Methoden, wurde durch diese Kalkablagerungen empfindlich gestört.

Histochemisch fanden wir in den resorbierenden Fremdkörpergranulomen ebenfalls eine Reihe von Enzymen:

Genau wie in den anderen Granulomen besaßen die einkernigen Phagozyten und Riesenzellen eine starke Aktivität von *saurer Phosphatase*: Schon nach einer kurzen Bebrütungszeit traten im Cytoplasma dieser Zellen braunschwarze gekörnte Niederschläge auf, die schließlich zu homogenen schwarzen Präcipitaten zusammenflossen. Die Enzymaktivität war auf die Zellen des Granuloms beschränkt; die umliegenden, nicht an der Resorption der Eiweißmassen beteiligten Mesenchymzellen besaßen keine histochemisch nachweisbare saure Phosphatase.

Unspezifische Esterase war bei der Verwendung von α -Naphthylacetat als Substrat in den Riesenzellen häufig, jedoch nicht regelmäßig nachweisbar (Abb. 8b). Dagegen besaßen die einkernigen Phagozyten keine nennenswerte Esteraseaktivität. Mit Naphthol-AS-Acetate als Substrat ließ sich eine Esteraseaktivität in den Fibroblasten darstellen. Eine *Lipaseaktivität* war in den resorbierenden Fremdkörpergranulomen histochemisch nicht sicher nachweisbar.

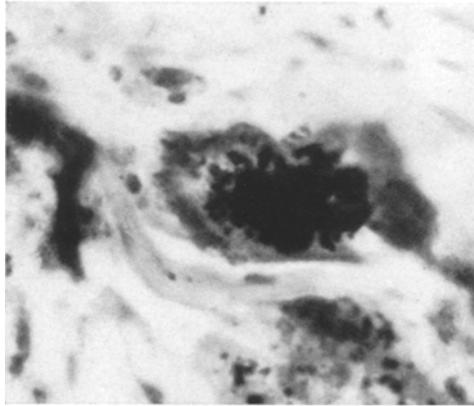


Abb. 7. Fibrospumgranulom (49 Tage nach der Implantation). Vergr. 843mal. β -Glucuronidase, Inkubationszeit 7 Std. Enzymaktivität im Zentrum einer Riesenzelle

Bei der Nachweisreaktion für β -Glucuronidase traten sowohl in den mononucleären Phagozyten als auch in den Riesenzellen ausgedehnte blaue Niederschläge auf (Abb. 7). Außerdem beobachteten wir gelegentlich auch in den faserbildenden Zellen in der bindegewebigen Kapsel der Fremdkörpergranulome und in den Capillaren eine Glucuronidaseaktivität. In den weiter entfernt liegenden Mesenchymzellen war histochemisch keine β -Glucuronidase nachweisbar.

Eine deutliche Aktivität von *Amino-peptidase* besaßen die mononucleären Phagozyten und Riesenzellen (Abb. 8a). Die Fibroblasten und Capillarwände zeigten demgegenüber nur eine schwache Amino-peptidasereaktion.

Alkalische Phosphatase fand sich in den Capillaren am Rand der Granulome, während die neu gebildeten Capillaren phosphatasefrei waren.

Peroxydase und Oxydasen konnten wir regelmäßig in den polymorphkernigen Leukocyten nachweisen.

5-Nucleotidase und Dehydrogenasen waren auch in den resorbierenden Granulomen nicht feststellbar.

IV. Fettsäuregranulome (Methylester mehrfach ungesättigter Fettsäuren, Lebertran usw.)

Werden Emulsionen von Estern ungesättigter Fettsäuren in die Subcutis von Mäusen injiziert, so kommt es nach dem Abklingen der akuten Entzündungserscheinungen (nach 8—10 Tagen) zu einer lebhaften Proliferation histiocytärer Elemente. Gleichzeitig werden die Fettstoffe von den wuchernden Zellen phagozytiert, so daß die in den Saftspalten abgelagerten amorphen Fettmassen allmählich verschwinden. Im Cytoplasma der Phagozyten treten dabei zunächst

große Fetttropfen auf, die in zunehmendem Maße in kleinere Tröpfchen unterteilt und schließlich zu einem gelblichen Lipopigment umgewandelt werden. Dieses

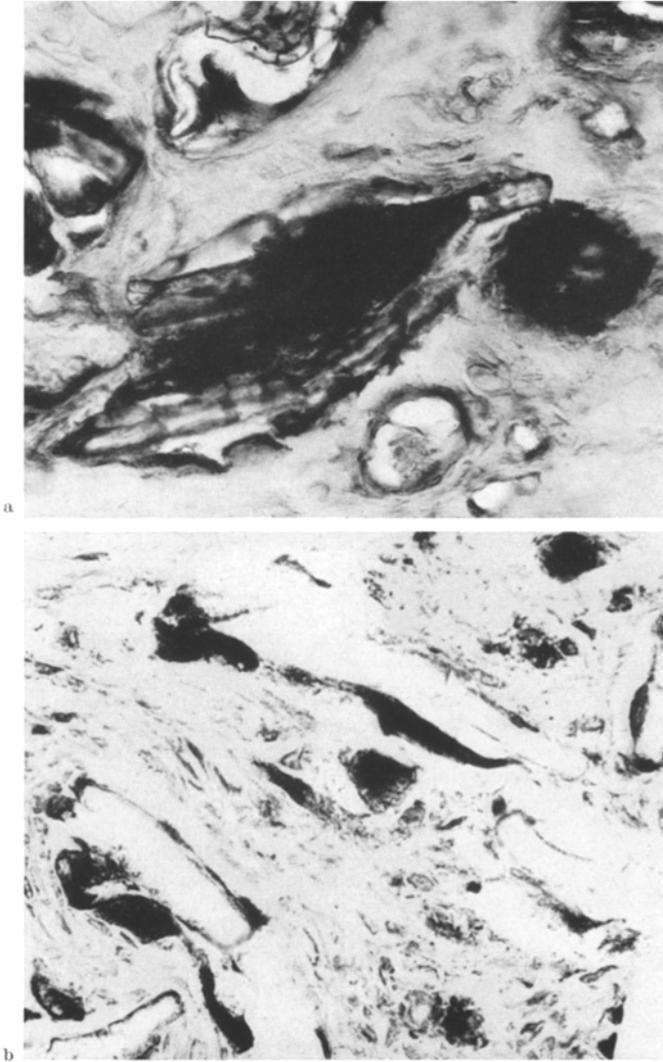


Abb. 8 a u. b. Fibrospumgranulom (a 110 Tage, b 49 Tage nach der Implantation). a Amino-peptidase, Inkubationszeit $1\frac{1}{2}$ Std., Vergr. 360mal. Starke Enzymaktivität in den mono-nucleären Phagocyten und Riesenzellen. b Unspezifische Esterase, α -Naphthylacetat-methode, Inkubationszeit $1\frac{1}{2}$ Std., Vergr. 331mal. Starke Esteraseaktivität in den Riesenzellen

experimentell erzeugte Pigment stimmt in seinen cytologischen und cytochemischen Eigenschaften weitgehend mit dem Ceroidpigment überein^{4, 5, 6, 7, 13, 25, 26, 27.}

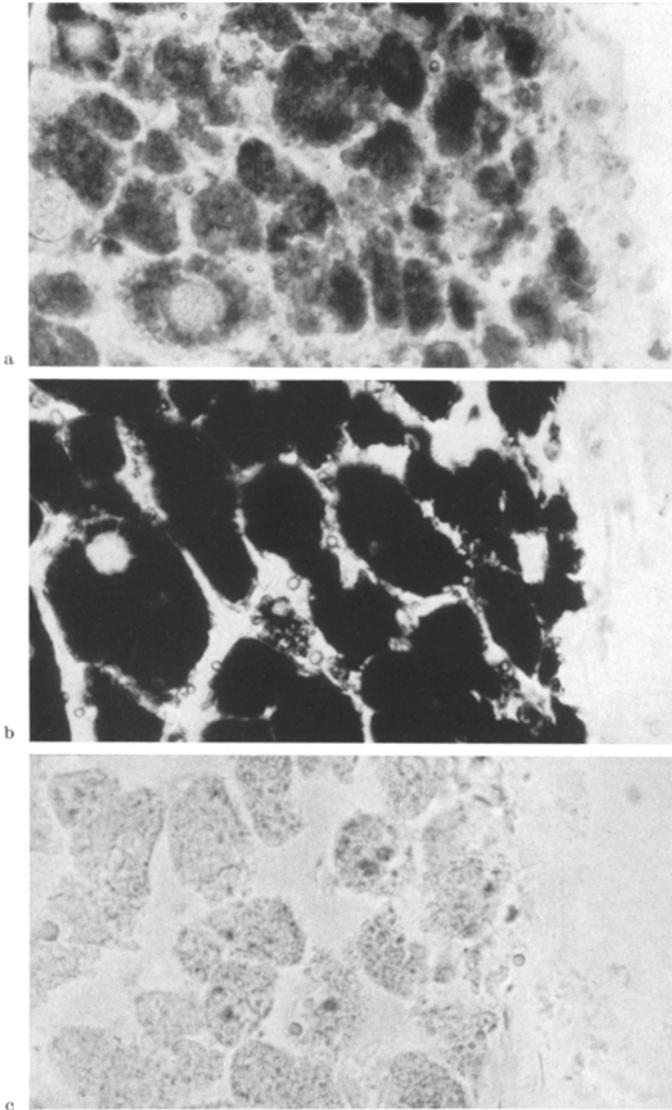


Abb. 9 a—c. Fettsäuregranulom (Vergr. 576mal) 100 Tage nach der Injektion. Saure Phosphatase (GOMORI). a Inkubationszeit 30 min. b Inkubationszeit 4 Std. c Hemmung der Enzymaktivität mit Natriumfluorid. Die zunächst feinkörnigen, den Ort der Enzymaktivität markierenden Niederschläge (a) fließen bei längeren Bebrütungszeiten zu homogenen Präcipitaten zusammen (b). Bei der Hemmung der Fermentaktivität durch Natriumfluorid (c) treten keine Niederschläge auf. Die gespeicherten Fettsäurepartikel sind infolge ihrer gelbbraunen Eigenfarbe sichtbar

Lipopigmente sind in der letzten Zeit das Ziel eingehender chemischer und histochemischer Untersuchungen gewesen. So wurden von HELDENREICH und

SIEBERT³⁰ im isolierten Lipofuscin des Herzmuskels Proteasen und Esterasen nachgewiesen. GÖSSNER²² sowie GOMORI²⁰ fanden histochemisch im Lipofuscin des Herzmuskels und der Leber Esterasen. In eigenen Experimenten stellten wir in Lipopigmenten verschiedener menschlicher Organe saure Phosphatase und unspezifische Esterasen fest (GEDIGK und BONTKE)¹⁴.

In Übereinstimmung mit diesen Befunden fanden wir auch in den phagocytierenden Zellen der Fettsäuregranulome eine Reihe von Enzymen. So traten bei der Reaktion für *saure Phosphatase* schon nach einer kurzen Inkubationszeit in den lipidspeichernden Phagocyten braunschwarz gefärbte Körnchen auf, die in Gestalt und Anordnung den entstehenden Lipopigmenten entsprachen. Bei einer

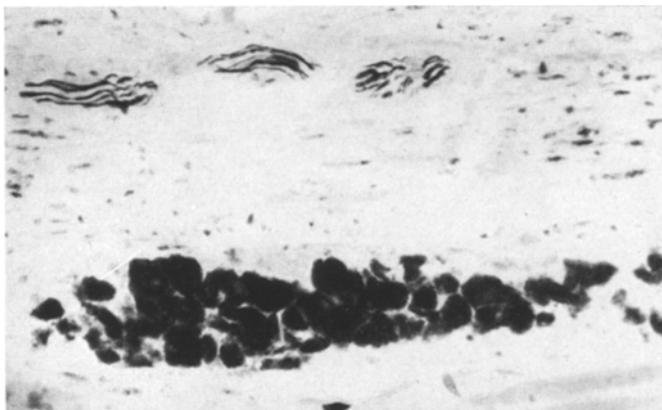


Abb. 10. Fettsäuregranulom (100 Tage nach der Injektion). Vergr. 450mal. Phosphoamidase, Inkubationszeit 8 Std. Ausgeprägte Enzymaktivität in den Phagocyten und in den Nervenfasern

längeren Bebrütung der Schnitte kam es zu einer diffusen Anfärbung der fettverarbeitenden Zellen durch die Bleisulfidniederschläge. Die Phosphatasereaktion war stets auf die feintropfigen lipidhaltigen Zelleinschlüsse beschränkt, also auf das Ceroidpigment, bzw. seine Vorstufen. Die großen, intracellulären Fetttropfen wurden nicht angefärbt (Abb. 9a, b).

In geringem Umfang enthielten manchmal auch die Fibroblasten eine Aktivität von saurer Phosphatase.

Die fettverarbeitenden Zellen besaßen ferner eine ausgesprochene Aktivität von *Phosphoamidase* (Abb. 10). Dagegen war diese Fermentreaktion in den Fibroblasten nur gelegentlich schwach positiv.

In mehreren Fettsäuregranulomen konnten wir auch eine deutliche *Lipaseaktivität* feststellen. Die positive Lipasereaktion trat jedoch nicht regelmäßig auf. Wir können vorerst noch nicht entscheiden, ob diese wechselnden Befunde auf die noch unzulängliche histochemische Nachweisreaktion für dieses Ferment zurückzuführen sind, oder ob diese Unterschiede vielleicht von dem Alter der Granulome abhängen.

Unspezifische Esterase (α -Naphthylacetatmethode) haben wir nur sehr selten in den lipidspeichernden Zellen beobachtet. Mit der Naphthol-AS-Acetatmethode läßt sich — genau wie bei anderen Fremdkörpern — in den Fibroblasten am Rand der Granulome eine Esteraseaktivität nachweisen.

Die fettsäurespeichernden Zellen und die Fibroblasten in der bindegewebigen Kapsel der Granulome besaßen weiterhin eine deutliche Aktivität von β -Glucuronidase.

Die pigmenthaltigen Phagocyten zeigten ferner eine deutliche *Amino-peptidaseaktivität*. Auch die Fibroblasten und Capillarwände wurden bei dieser Fermentreaktion angefärbt.

In weiteren Experimenten sind wir der Frage nachgegangen, welche morphologischen Beziehungen zwischen den entstehenden Lipopigmenten und der Aktivität der sauren Phosphatase bestehen. Durch die nacheinander vorgenommene Darstellung der Enzymaktivität und fettsäurehaltigen Pigmentkörnchen am gleichen histologischen Schnitt läßt sich — genau wie bei unseren früheren Versuchen¹⁴ — zeigen, daß die Stellen der Phosphataseaktivität mit den Pigmentablagerungen übereinstimmen. Das experimentell erzeugte Lipopigment enthält also offenbar dieses hydrolytische Enzym.

Der in Abb. 9c wiedergegebene Kontrollversuch zeigt eine Phosphatase-reaktion, bei der zur Inkubationslösung Natriumfluorid als Fermenthemmstoff hinzugesetzt worden ist. Trotz der extrem langen Bebrütungszeit von 24 Std bleiben die phagocytierenden Zellen und ihre lipidhaltigen Einschlüsse ungefärbt. Es war also nicht zu einer Adsorption von Bleiionen an die fettsäurehaltigen Partikel gekommen. In gleicher Weise ließ sich eine Diffusion des Enzyms durch Aufeinanderlegen eines hitzeinaktivierten und eines unbehandelten aktiven Schnittes ausschließen.

Eine genauere Untersuchung der morphologischen Beziehungen zwischen den Lipopigmenten und der Phosphoamidase, β -Glucuronidase und Amino-peptidase war mit den uns zur Verfügung stehenden Methoden nicht durchführbar (vgl. S. 550). Wir müssen uns auch hier auf die Aussage beschränken, daß diese Enzyme in den fettsäureverarbeitenden Zellen vermehrt auftreten. Es kann vorerst nicht zu der Frage Stellung genommen werden, ob diese Fermente Bestandteile der Lipopigmente oder des umliegenden Cytoplasmas der Phagocyten sind.

Diskussion

I. Welche Enzyme treten in den Zellen des Fremdkörpergranulationsgewebes auf?

Bei allen Experimenten haben wir danach getrachtet, das Ergebnis der histochemischen Fermentreaktionen durch *Kontrollversuche* zu sichern (vgl. die methodischen Angaben in der Arbeit GEDIGK und BONTKE¹⁴). Dabei zeigte es sich, daß die bei den Enzymnachweisen erzielten Anfärbungen der Granulomzellen die Kriterien echter Fermentreaktionen besaßen: Nach dem Kochen der Schnitte, beim Weglassen des Substrates in dem Reaktionsgemisch oder beim Zusatz eines spezifischen Hemmstoffes zur Inkubationslösung fiel die jeweilige Nachweisreaktion negativ aus. Auch das Vorkommen von *Diffusions- oder Adsorptionsartefakten* durch eine Verlagerung des Enzyms während der Fixierung und Einbettung des Gewebes und bei der Bebrütung der Schnitte konnten wir durch die üblichen Kontrollversuche ausschließen. Grundsätzlich besteht auch die Möglichkeit, daß schon im lebenden tierischen Gewebe Enzyme von den implantierten Fremdkörpern adsorbiert werden, und es wäre vielleicht denkbar, daß der Fermentreichtum

Tabelle. Verteilung der Enzymaktivität im Fremdkörpergranulationsgewebe

	Saure Phosphatase	Phosphoramidase	Alkalische Phosphatase	5-Nucleotidase	Unspezifische Esterase	Lipase	β -Glucuronidase	Aminopeptidase	Oxydase	Peroxydase	Dehydrogenase
Mononucleäre Phagocyten	++	++	0	0	0 ⁵	0 ⁵	++	++	0	0	0
Riesenzellen	++	++	0	0	(+) ¹	(+)	++	++	0	0	0
Histiocyten	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fibroblasten	(+)	(+)	0	0	++ ²	0	+/(+)	(+)	0	0	0
Capillarwände	0	0	++ ³	0	0	0	(+)	(+)	0	0	0
Polymorphkernige Leukocyten	0	0	(+) ⁴	0	0	0	0	0	++	++	0
Lymphocyten	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Enzymreaktion: +++ sehr stark, ++ deutlich positiv, (+) inkonstant oder schwach, 0 negativ.

¹ Positiv bei der Verwendung von Naphthylacetat als Substrat. ² Positiv mit Naphthol-AS-Acetat als Substrat. ³ Stark positiv am Rand der Granulome, negativ in jungen Capillarsprossen. ⁴ Schwach positiv in intravasalen Leukocyten, negativ in den emigrierten Leukocyten. ⁵ In der Regel negativ, nur ganz selten schwach positiv.

der Riesenzellen und mononucleären Phagocyten auf derartigen intravitalem Adsorptionsvorgängen beruht. Nahegelegt wird diese Vermutung durch die Beobachtungen von HELFERICH und SCHMITZ³¹, BAUMANN¹ sowie SCHMIDT-MATHIESEN⁴⁵, welche in vitro eine deutliche Adsorption von verschiedenen Fermenten an Siliciumdioxydderivate beobachtet haben.

In den vorliegenden Experimenten hat es sich jedoch gezeigt, daß die in den Phagocyten histochemisch nachweisbare Aktivität von *saurer Phosphatase*, *Phosphoramidase*, *Aminopeptidase* und *β -Glucuronidase* von der chemischen Natur der Fremdkörper nicht beeinflußt wird. Die Aktivität dieser Enzyme war in allen Granulomen etwa gleich stark, und zwar unabhängig davon, ob wir Gelatine, Kunststoffe, Siliciumdioxydderivate oder Fettsäureester in die Subcutis implantiert hatten. Daß aber diese chemisch verschiedenen Fremdkörper alle in der gleichen Weise Enzyme adsorbieren, dürfte recht unwahrscheinlich sein. Diese Beobachtungen legen vielmehr den Schluß nahe, daß die genannten hydrolytischen Enzyme in den phagocytierenden Zellen neu gebildet oder aktiviert werden.

Auf Grund unserer Experimente können wir nun zu der Frage Stellung nehmen, welche

Enzyme mit histochemischen Methoden in den verschiedenen Zellen der Fremdkörpergranulationsgewebe nachweisbar sind. Von besonderem Interesse sind dabei die enzymatischen Leistungen der Phagocyten, weil vor allem in ihnen die Verarbeitung und Abwehr der schädigenden Stoffe erfolgt (s. Tabelle).

In allen Fremdkörpergranulomen besaßen die *phagocytierenden Zellen*, bzw. die sich an die Fremdkörper anlagernden Zellelemente eine ausgesprochene Aktivität von saurer Phosphatase, Phosphoamidase, β -Glucuronidase und Aminopeptidase. Die Aktivität dieser Fermente war in den mononucleären Zellen und in den Riesenzellen in der gleichen Stärke nachweisbar.

Nicht so einheitlich war das Verhalten der *unspezifischen Esterase*: Bei der Verwendung von α -Naphthylacetat als Substrat fanden wir sehr häufig (nicht regelmäßig!) eine Enzymaktivität im Cytoplasma von Fremdkörperriesenzellen. Die Esteraseaktivität der Riesenzellen war in der Regel nicht sehr stark und z. B. mit der Fermentaktivität der im gleichen Schnitt vorhandenen Talgdrüsenepithelien nicht vergleichbar. Die einkernigen Phagocyten enthielten demgegenüber keine histochemisch nachweisbare unspezifische Esterase.

Eine *Lipaseaktivität* beobachteten wir häufig (jedoch nicht regelmäßig) in den einkernigen und mehrkernigen Phagocyten der Fettsäuregranulome. In anderen Granulomtypen war dieses Enzym histochemisch nicht oder nicht sicher nachweisbar.

Alkalische Phosphatase, 5-Nucleotidase, Dehydrogenasen, Oxydasen und Peroxydasen konnten wir in den phagocytierenden Mesenchymzellen nicht feststellen.

Die am Rande der älteren Granulome auftretenden *Fibroblasten* besaßen bei der Verwendung von Naphthol-AS-Acetat als Substrat eine ausgeprägte Aktivität von *unspezifischer Esterase*. Weiterhin konnten wir in diesen Zellen häufig eine schwache *Aminopeptidase*- und *β -Glucuronidaseaktivität*, sowie gelegentlich auch *saure Phosphatase und Phosphoamidase* feststellen. Die Aktivität dieser hydrolytischen Enzyme trat in den Fibroblasten jedoch nicht regelmäßig auf und war stets auch sehr viel schwächer ausgeprägt als in den Phagocyten. Alkalische Phosphatase, Lipasen, Dehydrogenasen, Oxydasen und Peroxydasen waren in diesen Zellelementen nicht nachweisbar.

Die Capillarwände enthielten — wie es zu erwarten war — *alkalische Phosphatase*. Die Phosphataseaktivität war jedoch nur in den Capillaren am Rande der Granulome nachweisbar, während die neu gebildeten, jungen Capillaren im Innern des Granulationsgewebes noch keine Fermentaktivität aufwiesen. Die Enzymausrüstung der sprossenden jungen Gefäße wird offenbar erst allmählich vervollständigt. Nicht

selten fanden wir in den Capillarwänden auch eine β -Glucuronidase- und Aminopeptidaseaktivität.

Die intravasalen und die in das Granulom emigrierten *polymorphkernigen Leukocyten* besaßen — wie seit langem bekannt — eine deutliche *Oxydase- und Peroxydaseaktivität*. Außerdem enthielten die Leukocyten innerhalb der Blutgefäße sehr häufig alkalische Phosphatase, während die emigrierten, in den Gewebsspalten liegenden Leukocyten keine Phosphataseaktivität aufwiesen. Diesen Unterschied zwischen den enzymatischen Leistungen der intravasalen und extravasalen Leukocyten können wir an Hand unserer Versuche nicht erklären. Es wäre aber vielleicht denkbar, daß diese Zellelemente durch den Austritt in das Gewebe eine Schädigung erfahren, die mit einer herabgesetzten Phosphataseaktivität einhergeht.

In den *Lymphocyten* konnten wir mit unseren Methoden keine Fermentaktivität feststellen. Auch die ruhenden (inaktiven) *Bindegewebszellen* (Histiocyten) in der weiteren Umgebung der Granulome besaßen keine oder keine nennenswerte histochemisch nachweisbare Enzymaktivität.

II. In welchen Zellbezirken sind die Enzyme lokalisiert?

Während die Frage, in welchen Zellen des Granulationsgewebes Fermente nachweisbar sind, in der Regel leicht beantwortet werden kann, bereitet die Lokalisation der Enzymaktivität in der Zelle oft erhebliche Schwierigkeiten. Das liegt bei einigen Methoden daran, daß die Reaktionsprodukte der Fermentnachweise sehr grobkörnig sind und keine näheren Beziehungen zu bestimmten Cytoplasmastrukturen erkennen lassen. Andere Nachweisverfahren erfordern sehr lange Bebrütungszeiten, so daß mit einer Diffusion der Enzyme oder der Reaktionsprodukte gerechnet werden muß und somit das Auftreten von Diffusions- und Adsorptionsartefakten nicht mit genügender Sicherheit ausgeschlossen werden kann.

Zu den Methoden, welche cytologischen Anforderungen gerecht werden, gehören nach unseren Erfahrungen die Nachweisreaktionen für alkalische und saure Phosphatase, sowie für Esterasen. Bei den Verfahren zum Nachweis von Aminopeptidase, β -Glucuronidase und Phosphoamidase sind die cytologisch verwertbaren Ergebnisse wesentlich schlechter. Die Aktivität dieser Enzyme kann allenfalls auf größere Cytoplasmabezirke, z. B. die Peripherie oder das Zentrum von Riesenzellen bezogen werden. Die derzeit gebräuchlichen histochemischen Methoden zur Darstellung der Aktivität von Lipasen und Dehydrogenasen sind für cytologische Untersuchungen unseres Erachtens ungeeignet. Sie können zwar einen Einblick in die Enzymaktivität von Zellgruppen und unter Umständen von einzelnen Zellen gewähren, Aus-

sagen über den Fermentgehalt bestimmter Cytoplasmabezirke lassen sich an Hand dieser Methoden jedoch nicht machen.

Im folgenden soll daher nur die cytologische Lokalisation der Esterasen und Phosphatasen und — soweit das in einzelnen Fällen möglich war — die Zuordnung der Aminopeptidase, Phosphoamidase und β -Glucuronidase zu einzelnen Cytoplasmagebieten behandelt werden.

Bei der Verarbeitung größerer, schwer löslicher oder unlöslicher Fremdkörper wie Fibrinschaum oder Polystan, ist die Enzymaktivität in denjenigen Zellen am ausgeprägtesten, die in der unmittelbaren Nähe des Fremdkörpers liegen, bzw. kleinere Bruchstücke dieser Substanzen phagozytiert haben. Innerhalb der mononucleären Phagocyten und Riesenzellen ist die Enzymaktivität meistens gleichmäßig verteilt. Nicht selten kann man aber auch feststellen, daß die Aktivität der hydrolytischen Fermente in den dem Fremdkörper anliegenden Cytoplasmabezirken größer ist als in den entfernten Zellabschnitten.

Von besonderem Interesse war die Frage, *welche morphologischen Beziehungen zwischen den Stellen der Enzymaktivität und der phagozytierten kolloidalen Kieselsäure, sowie der reaktiv gebildeten organischen Trägersubstanz bestehen*. Nach der Injektion dieses Siliciumdioxidpräparates wurden in den Phagocyten die Cytoplasmabezirke mit einer gesteigerten Aktivität von saurer Phosphatase als kleine braunschwarze Körnchen markiert. Durch die nacheinander vorgenommene Darstellung der Enzymaktivität und der kieselsäurehaltigen, PAS-positiven organischen Trägersubstanz ließ sich der Nachweis erbringen, daß die Stellen der Phosphataseaktivität mit der reaktiv gebildeten organischen Trägersubstanz übereinstimmen. Diese Beobachtungen legen den Schluß nahe, daß die organische Trägersubstanz selbst dieses Enzym enthält. Bei der Untersuchung junger (1—2 Wochen alter) Kieselsäuregranulome, in denen es noch nicht zur Bildung der Trägersubstanz gekommen war, trat die Aktivität der sauren Phosphatase gleichfalls in Form umschriebener braunschwarzer Körnchen in Erscheinung, die in Gestalt und Anordnung völlig der in den älteren Granulomen (etwa 4 Wochen nach der Injektion) nachweisbaren granulären, PAS-positiven Trägersubstanz entsprachen. Nach der Phagocytose der Kieselsäurepartikel kommt es also offensichtlich zunächst an umschriebenen, kleinen Cytoplasmabezirken zu einer Neubildung bzw. Aktivierung der sauren Phosphatase. An diesen Stellen der erhöhten Fermentaktivität erfolgt dann allmählich die Bildung der aus Proteinen, Mucopolysacchariden und Lipiden bestehenden organischen Trägersubstanz, welche das Siliciumdioxidderivat bindet.

Schließlich war zu prüfen, wie sich die in den Fettsäuregranulomen entstehenden Lipopigmente zu den hier neu gebildeten oder aktivierten Enzymen verhalten. In den Phagocyten dieser Fremdkörpergranulome

traten bei der Reaktion für saure Phosphatase kleine braunschwarze Körnchen auf, die gleichmäßig im Cytoplasma verteilt waren. Die nacheinander vorgenommene Darstellung der Enzymaktivität und der fettsäurehaltigen Pigmentkörnchen am gleichen Schnittpräparat zeigte, daß die Pigmentgranula an den Stellen der Phosphataseaktivität lagen, daß also das Pigment dieses Enzym enthält. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit dem Ergebnis unserer Untersuchungen an Lipopigmenten menschlicher Organe, in denen wir regelmäßig hydrolytische Enzyme gefunden hatten: Die Lipofuscine enthielten saure Phosphatase und unspezifische Esterase; im Ceroid ließ sich ebenfalls stets saure Phosphatase nachweisen, während unspezifische Esterase in diesem Pigment nur gelegentlich auftrat¹⁴.

III. Besteht eine Abhängigkeit der Enzymaktivität vom Alter der Granulome?

Bei einem Vergleich von Granulomen verschiedenen Alters zeigte es sich, daß die histochemisch nachweisbare Fermentaktivität der Phagozyten und Riesenzellen innerhalb der Fehlerbreite unserer Methoden sehr lange Zeit nahezu konstant blieb. Die gesteigerte Aktivität der sauren Phosphatase, β -Glucuronidase, Aminopeptidase und Phosphoamidase trat schon wenige Tage nach der Implantation der Fremdkörper auf und war in fast gleicher Stärke auch noch nach 8—10 Monaten vorhanden. Bemerkenswert war vor allem die verhältnismäßig schnelle Aktivierung, bzw. Neubildung dieser Fermente: Die erhöhte Enzymaktivität war in allen Granulomen schon 6—8 Tage nach der Implantation der Fremdkörper nachweisbar, während z. B. die reaktiv gebildete organische Trägersubstanz für anorganische Fremdkörper erst nach 3 bis 5 Wochen deutlich in Erscheinung trat (vgl. GEDIGK und PROCH¹²).

In alten *Kunststoffablagerungen* (10—12 Monate nach der Implantation) wurde das Granulationsgewebe in der Regel in ein zellarmes, fibröses Narbengewebe umgewandelt, das schließlich die Fremdkörper umschloß und gegen die Umgebung abkapselte. In den Zellen dieses „reaktionslosen“ Narbengewebes kam die histochemisch nachweisbare Enzymaktivität mehr und mehr zum Erlöschen, um schließlich ganz zu verschwinden. Die histochemisch nachweisbare gesteigerte Enzymaktivität geht also weitgehend mit der exsudativen und proliferativen Gewebsreaktion parallel. Sobald das Granulationsgewebe in ein Narbengewebe übergeht, verschwindet auch allmählich die erhöhte Fermentaktivität in den Mesenchymzellen.

IV. Riesenzellen

Unsere besondere Aufmerksamkeit galt dem Verhalten der *Riesenzellen*, deren Herkunft, Entstehung und funktionelle Bedeutung bei den Reaktionen der Gewebe auf Fremdkörper trotz vieler Untersuchungen noch ungeklärt sind.

Sehr unterschiedlich wird die Frage nach der *Herkunft der Fremdkörperriesenzellen* beantwortet. So ist noch keine Einigkeit darüber erzielt worden, ob sie von Histiocyten, von Endothelzellen der Blut- und Lymphgefäße, von Kapillarsprossen, von Zellen des adventitiellen Bindegewebes oder von Reticulumzellen abstammen (vgl. die zusammenfassenden Darstellungen von LINZBACH³⁴ und von ROULET⁴³). Aus der Enzymausrüstung der Riesenzellen ergeben sich nun recht bemerkenswerte Hinweise auf ihre Genese:

Die Fremdkörperriesenzellen besitzen — ebenso wie die mononucleären Phagocyten — eine sehr starke Aktivität von saurer Phosphatase, Phosphoamidase, β -Glucuronidase und Amino-peptidase, während ihnen die alkalische Phosphatase fehlt. Demgegenüber sind die Gefäßendothelien und Capillarwände gerade durch eine starke Aktivität von alkalischer Phosphatase und negative Reaktionen für saure Phosphatase und Phosphoamidase gekennzeichnet. β -Glucuronidase und Amino-peptidase kommen zwar auch in den Capillarwänden gelegentlich vor, diese Fermentreaktionen sind bei den Gefäßendothelien aber inkonstant und nicht so stark ausgeprägt wie bei den mononucleären Phagocyten und Riesenzellen. Es zeigt sich also, daß die *enzymatischen Leistungen der Fremdkörperriesenzellen mit denen der einkernigen, phagocytierenden Mesenchymzellen weitgehend übereinstimmen und von den Fermentreaktionen der Gefäßendothelien und Capillarwände abweichen*. Diese Befunde können u. E. für die Annahme ins Feld geführt werden, daß die Fremdkörperriesenzellen von den zur Phagocytose befähigten Mesenchymzellen, und zwar vor allem von histiocyären und reticulocytären Elementen abstammen (FRESEN^{8, 9}, WURM^{46, 47}). Sie sprechen gegen ihre Entstehung aus Blutgefäßendothelien und Capillaren.

Vergleicht man weiterhin die Enzymausrüstung der Fremdkörperriesenzellen und der *Langhansschen Riesenzellen bei der Tuberkulose* (GROGG und PEARSE²⁴, sowie GÖSSNER²¹), so fällt die weitgehende Übereinstimmung zwischen diesen beiden Riesenzelltypen ins Auge. Beide Arten von Riesenzellen besitzen eine Aktivität von saurer Phosphatase und unspezifischer Esterase, während die alkalische Phosphatase beiden fehlt. Dieser Befund kann als weiterer Hinweis für die enge genetische Verwandtschaft und ähnliche funktionelle Bedeutung dieser Zellelemente gewertet werden, die schon früher von verschiedenen Autoren angenommen worden ist (HECTOEN²⁹, MAXIMOW³⁶, HAYTHORN²⁸).

Über die biologische Wertigkeit der Fremdkörperriesenzellen gehen die Meinungen gleichfalls noch auseinander. Am meisten hat sich die Ansicht durchgesetzt, daß es sich bei den Riesenzellen eher um geschädigte Zellelemente handelt, die trotz der zahlreichen Kerne und der großen Cytoplasmamasse nur eine geringe vitale Energie besitzen. Überblickt man die histochemisch nachweisbare Fermentaktivität der Riesenzellen in den verschiedenen Fremdkörpergranulomen, so zeigt es sich, daß sie

eine recht beachtliche Enzymausrüstung besitzen und sich dadurch von anderen Mesenchymzellen deutlich unterscheiden: Sie weisen eine ausgesprochene Aktivität von saurer Phosphatase, Phosphoamidase, β -Glucuronidase und Aminopeptidase auf. Weiterhin geben sie häufig eine positive Esterasereaktion und gelegentlich enthalten sie anscheinend auch Lipasen. Diese Enzymausstattung, die den Fermentreaktionen der mononucleären Phagocyten weitgehend gleicht, weist doch darauf hin, daß die Riesenzellen erhebliche Stoffwechselleistungen vollbringen und offenbar wesentliche Aufgaben bei der Verarbeitung der Fremdkörper zu erfüllen haben. Keinesfalls dürfen sie daher von vornherein als funktionell minderwertige Zellen angesehen werden.

Von den Langhansschen Riesenzellen wird vielfach angenommen, daß in ihren zentralen Cytoplasmabezirken nekrotische, bzw. verkäste Massen liegen, und daß nur die kernhaltige Zellperipherie aus lebendem Cytoplasma besteht. So hat RASHEVSKY⁴⁰ darauf hingewiesen, daß die zentralen Abschnitte großer Riesenzellen wegen des großen Zelldurchmessers nur in geringem Umfang am Stoffwechsel teilnehmen können. LINZBACH^{34, 35} hebt die Unterschiede zwischen dem lebenden, basophilen, peripheren Cytoplasma und dem oft grobgekörnten, scharf gegen die Peripherie abgegrenzten Zentrum hervor. Er gelangt gleichfalls zu der Ansicht, daß große Riesenzellen offenbar die kritische Zellgröße überschritten haben und in ihrem Zentrum ein nekrotisches Material enthalten.

Bei unseren Untersuchungen ist uns die unterschiedliche Enzymverteilung in Riesenzellen vom Langhans-Typ aufgefallen. In den meisten Riesenzellen ist zwar die Aktivität hydrolytischer Enzyme in der Peripherie und im Zentrum gleich stark ausgeprägt oder sogar in den zentralen Bezirken etwas deutlicher als in den peripheren (vgl. Abb. 11a). Daneben findet man aber nicht selten Riesenzellen, deren Fermentaktivität ausschließlich auf die kernhaltige, basophile Zellperipherie beschränkt ist, während die zentralen Bezirke, welche in der gewöhnlichen Hämatoxylin-Eosin-Färbung mehr rötlich gefärbt und grob gekörnt erscheinen, keine histochemisch nachweisbaren Enzyme besitzen (vgl. Abb. 11b). Dieser Befund steht mit der Annahme im Einklang, daß das Zentrum dieser Riesenzellen aus einem inerten, bzw. nekrotischen Material besteht, das nicht mehr im wesentlichen Umfang am Stoffwechsel teilnimmt.

An Hand unseres Untersuchungsmaterials sind wir auch der Frage nachgegangen, worauf diese unterschiedliche Verteilung der Enzymaktivität in den Riesenzellen beruhen könnte. Dabei ergaben sich folgende Befunde:

Die Zellgröße allein ist für die fehlende Enzymaktivität in den zentralen Abschnitten nicht verantwortlich, da es verhältnismäßig kleine Riesenzellen mit einem fermentfreien Zentrum gibt, und weil in der

Regel auch die großen Exemplare der Riesenzellen in den zentralen Cytoplasmaabschnitten eine deutliche Enzymaktivität besitzen. Auch die Lage der Riesenzellen innerhalb des Granulationsgewebes läßt sich mit der intracellulären Anordnung der Fermentaktivität nicht in Zusammenhang bringen.

Dagegen hat offenbar die Art des gespeicherten, bzw. verarbeiteten Fremdkörpers auf die Verteilung der Enzymaktivität in den Riesenzellen einen Einfluß. Wir fanden Riesenzellen mit einem fermentfreien Zentrum in den Siliciumdioxidgranulomen erheblich häufiger als bei den Gewebsreaktionen auf Kunststoffe oder Eiweißkörper. Diese Beobachtung legt die Annahme nahe, daß es durch eine chemische, bzw. toxische Schädigung der Riesenzellen zu einer Nekrobiose der zentralen Zellabschnitte kommt, die mit einem Verlust der Fermentaktivität einhergeht.

Da sich das *Alter von Riesenzellen* in Schnittpräparaten nur sehr schwer bestimmen läßt, kann über seine Beziehungen zur Enzymver-

teilung an sich keine sichere Aussage gemacht werden. Wir haben jedoch den Eindruck gewonnen, daß Riesenzellen mit einem fermentfreien (nekrobiotischen) Zentrum in älteren Fremdkörpergranulomen (6 Monate nach der Implantation) häufiger vorkommen als in jüngeren. Wir halten es daher für möglich, daß die Nekrobiose der zentralen Cytoplasmabezirke auch eine Folge des Alterns der Zelle sein kann.

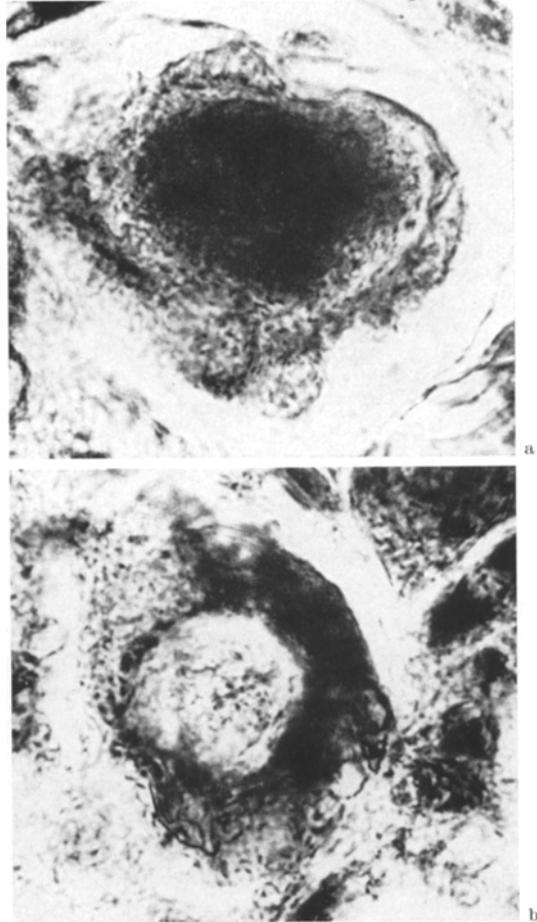


Abb. 11 a u. b. Riesenzellen in einem Talkumgranulom (148 Tage nach der Implantation). Saure Phosphatase (GOMORI). Vergr. 1238mal. a Enzymaktivität im Zentrum der Zelle. b Enzymaktivität in der Zellperipherie

Auf Grund dieser Beobachtungen gelangen wir somit zu der Ansicht, daß es sich bei den Riesenzellen mit einem fermentfreien (nekrobiotischen) Zentrum um regressiv veränderte Zellen handelt. Die Nekrobiose der zentralen Cytoplasmabezirke scheint in erster Linie durch eine toxische Schädigung der Zellen hervorgerufen zu werden. Außerdem könnte vielleicht die Alterung der Zellen ursächlich eine Rolle spielen.

V. Welchen Einblick vermögen unsere Versuche in den Enzymstoffwechsel der Phagocyten zu gewähren?

Seit langem ist es bekannt, daß die lebende Zelle die Fähigkeit besitzt, Enzyme zu synthetisieren und abzubauen. Fermente dienen daher nicht nur als Katalysatoren intracellulärer und extracellulärer Stoffwechselforgänge; sie sind als Proteine auch Objekte des Eiweißstoffwechsels. Der Enzymgehalt der Organe und Zellen läßt sich durch verschiedenartige exogene und endogene Faktoren beeinflussen, wie z. B. die Abhängigkeit der Enzymkonzentration vom Lebensalter und von der Tätigkeit innersekretorischer Drüsen zeigt. Eine besondere Rolle spielt im biologischen Geschehen die Entstehung von Fermenten in Anwesenheit spezifischer Substrate, die als „adaptive“ oder „induzierte“ Enzymbildung bezeichnet wird (vgl. das Übersichtsreferat von K. LANG³³ und die zusammenfassende Darstellung von HOFFMANN-OSTENHOFF³²).

Es liegt auf der Hand, daß mit histochemischen Methoden nur grobe Schätzungen des Enzymumsatzes erfolgen können, da die Aktivitäten und nicht die Konzentrationen von Fermenten erfaßt werden und quantitative Aussagen nur in geringem Umfange möglich sind. Auch auf eine Änderung der Aktivität eines Fermentes kann daher unter den gegebenen Versuchsbedingungen nur dann geschlossen werden, wenn die betreffende Enzymaktivität sehr stark zunimmt, bzw. neu auftritt, oder wenn die Fermentreaktion erheblich abgeschwächt wird, bzw. gänzlich verschwindet. Diese Voraussetzungen sind aber bei den vorliegenden Experimenten gegeben: Die Aktivitäten der in den Phagocyten auftretenden Enzyme sind sehr stark und mit den unter gleichen Bedingungen feststellbaren Fermentaktivitäten in den Parenchymzellen der Niere, der Leber oder des Pankreas durchaus vergleichbar. Demgegenüber sind diese Fermente in gleichartigen, ruhenden Mesenchymzellen (Histiocyten) nicht oder nicht nennenswert nachweisbar.

Eine Stellungnahme zur der Frage, ob in phagocytierenden Mesenchymzellen Enzyme *aktiviert* oder *synthetisiert* werden, kann jedoch vorerst nur zu der Diskussion einer Hypothese führen: Bei der Auseinandersetzung der Mesenchymzellen mit Fremdkörpern erfolgt eine deutliche Zunahme der Cytoplasmamasse. Unlängst hat LANG³³

den Enzymgehalt verschiedener Zellen berechnet und gezeigt, daß Fermente einen wesentlichen Teil des Gesamteiweißbestandes und den größten Teil des Nichtstruktureiweißes ausmachen. Da die gesteigerte Enzymaktivität der Phagocyten etwa gleichzeitig mit der Vergrößerung der Cytoplasmasubstanz und lange Zeit vor der Entstehung neuer Zellstrukturen, wie Trägersubstanzen, erfolgt, ist die Annahme nahelegend, daß *in den phagocytierenden Zellen vorwiegend eine Synthese der von uns nachgewiesenen Fermente stattfindet.*

Unsere Experimente geben vorerst keine Hinweise darauf, daß die Änderung der enzymatischen Ausrüstung der phagocytierenden Mesenchymzellen durch die Fremdkörper selbst „induziert“ wird, daß also eine „adaptive Enzyymbildung“ unter dem Einfluß spezifischer Substrate erfolgt. Diese Feststellung beruht auf folgenden Beobachtungen: Trotz der Verarbeitung sehr verschiedenartiger Fremdkörper ist in den Phagocyten stets eine Reihe von Enzymen in der gleichen Weise histochemisch nachweisbar. So fanden wir in allen Granulomen eine erhöhte Aktivität von saurer Phosphatase, Phosphoamidase, Aminopeptidase und β -Glucuronidase. Die Aktivität dieser Enzyme war unabhängig von der Art des verabfolgten Fremdkörpers: Sie war bei der Speicherung von Siliciumdioxydderivaten und nicht resorbierbaren Kunststoffen ebenso stark ausgeprägt, wie bei der Ablagerung ungesättigter Fettstoffe oder bei der Verarbeitung und Resorption von Eiweißstoffen. Auch die vermehrte Aktivität von Aminopeptidase bei der Phagocytose von Eiweißstoffen kann nicht auf eine induzierte Enzyymbildung zurückgeführt werden. Wie bereits betont, kommt es auch bei der Verarbeitung anderer Fremdkörper, wie Kunststoffe und Fettsäureester, zu einer Synthese (bzw. Aktivierung) dieses Fermentes.

Nur die Nachweisreaktion für Lipasen war in den Fettsäuregranulomen häufig stärker ausgeprägt als in den anderen Granulomtypen. Wegen des uneinheitlichen Ausfalles und der schlechten Reproduzierbarkeit dieses Nachweisverfahrens lassen sich jedoch aus diesem Befund vorerst noch keine weiteren Schlüsse ableiten.

Zusammenfassend ergibt sich somit, daß bei unseren Versuchen keine sicheren direkten chemischen Beziehungen zwischen den implantierten Fremdkörpern und den in den Phagocyten aktivierten Enzymen nachweisbar sind. Bei dieser Feststellung müssen wir jedoch die Tatsache in Rechnung stellen, daß wir z. Z. noch verhältnismäßig wenige Enzyme im histologischen Schnitt nachweisen können. Es dürfte daher lohnend sein, die Frage einer induzierten Enzyymbildung durch Fremdkörper mit einer verbesserten und vervollständigten histochemischen Methodik später erneut aufzugreifen.

Unsere Befunde machen es wahrscheinlich, daß die in den Phagocyten gebildeten (oder aktivierten) Enzyme, nämlich die saure Phosphatase, Phosphoamidase, Aminopeptidase und β -Glucuronidase, Aufgaben

im Rahmen des allgemeinen Zellstoffwechsels zu erfüllen haben. Zweifellos werden von den Mesenchymzellen bei der Verarbeitung und Speicherung von Fremdkörpern erhebliche Leistungen vollbracht, die mit einer Steigerung des Protein-, Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsels einhergehen. Dabei kommt es dann zu einer Neubildung (bzw. Aktivierung) von Enzymen, welche bei diesen Stoffwechselvorgängen eine Rolle spielen. Es erfolgt sozusagen eine „unspezifische“, d. h. nicht durch die Fremdkörper selbst induzierte Bildung dieser Enzyme.

Die Enzymausrüstung der histiocytären Zellelemente ist also erheblichen Schwankungen unterworfen. Sie besitzen im Ruhezustand nur eine relativ geringe Fermentaktivität, die bei funktionellen Leistungen gesteigert wird. So unterscheiden sich die phagozytierenden Mesenchymzellen in ihren enzymatischen Leistungen wesentlich von inaktiven gleichartigen Zellen. Offensichtlich werden die Synthese und Aktivität der Fermente durch die funktionelle Beanspruchung dieser Zellen und damit von ihren StoffwechsellLeistungen in erheblichem Maße bestimmt. In Anbetracht ihrer mannigfaltigen Aufgaben ist ihre potentielle Fermentausrüstung sehr groß.

In den Fremdkörpergranulationsgeweben erfolgt also eine Art von chemischer Differenzierung der Histiocyten, die vergleichbar ist mit morphologischen Differenzierungen, wie z. B. der Faserbildung. Die Fähigkeit, Enzyme zu bilden oder zu aktivieren, gehört offenbar ebenso zu den prospektiven Potenzen der Histiocyten, wie viele andere funktionelle Leistungen.

Zusammenfassung

Werden Fremdkörper, wie Kunststoffe, Siliciumdioxydderivate, Eiweißstoffe und Ester hochungesättigter Fettsäuren in die Subcutis von Mäusen und Ratten implantiert, so lassen sich in den Zellen der hier entstehenden Fremdkörpergranulome mit histochemischen Methoden eine Reihe von Enzymen nachweisen (s. Tabelle S. 556).

In den *phagozytierenden Zellen* besteht eine ausgesprochene Aktivität von *saurer Phosphatase*, *Phosphoamidase*, *β -Glucuronidase* und *Aminopeptidase* sowie gelegentlich von *unspezifischer Esterase*.

Die Verteilung und Aktivität der *Enzyme* war in allen Granulomen gleichartig und unabhängig von der Art der verabfolgten Fremdkörper.

Nach Injektion von kolloidaler Kieselsäure ließ sich die saure Phosphatase in den phagozytierenden Zellen im Bereich der reaktiv gebildeten *organischen Trägersubstanz* nachweisen. In den Fettsäuregranulomen ist die Aktivität der sauren Phosphatase in den *Pigmentgranula* lokalisiert. In allen Granulomen trat die Enzymaktivität schon wenige Tage nach der Implantation der Fremdkörper auf und blieb über lange Zeit nahezu konstant. Erst beim Übergang sehr alter Granulome in ein faserreiches Narbengewebe verschwand die Aktivität der Fermente allmählich.

Wegen der weitgehenden Übereinstimmung der Fermentausrüstung der *Fremdkörperriesenzellen* mit den enzymatischen Leistungen der mononucleären Phagozyten wird im Einklang mit den morphologischen Befunden angenommen, daß die Riesenzellen aus den zur Phagozytose befähigten histiocytären Zellen entstehen. Ihre Enzymausstattung weist ferner darauf hin, daß sie erhebliche Stoffwechselleistungen vollbringen und nicht von vornherein funktionell minderwertige Zellen darstellen. Nur die *Riesenzellen vom Langhansschen Typ* zeigen gelegentlich ein fermentfreies Zentrum. Offenbar bestehen ihre zentralen Abschnitte aus einem inerten, bzw. nekrobiotischen Material.

Die starke Aktivität der hydrolytischen Enzyme in phagozytierenden Mesenchymzellen beruht vermutlich in erster Linie auf einer *Neubildung* dieser Fermente. Hinweise für eine induzierte (adaptive) Enzymbildung oder Aktivierung durch die implantierten Fremdkörper finden sich nicht.

Die phagozytierenden Mesenchymzellen unterscheiden sich in ihrer Enzymausstattung wesentlich von ruhenden gleichartigen Zellen. Offenbar werden die Synthese und die Aktivität der Fermente in wesentlichem Umfang durch ihre Stoffwechselleistungen, d. h. ihre funktionelle Beanspruchung bestimmt; sie machen eine Art chemische (reversible) Differenzierung mit.

Literatur

- ¹ BAUMANN, H.: Über den Einfluß verschiedener Stäube auf einige Fermente. Beitr. Silikoseforsch. **35**, 1—52 (1955). — ² BURSTONE, M. S., u. J. E. FOLK: Histochemical Demonstration of Aminopeptidase. J. Histochem. a. Cytochem. **4**, 217—226 (1956). — ³ BURTON, J. F., and A. G. E. PEARSE: A critical study of the methods for histochemical localisation of β -Glucuronidase. Brit. J. Exper. Path. **33**, 1, 87—97 (1952). — ⁴ DAM, H., u. H. GRANADOS: Histological changes in adipose tissue of rats receiving a Vitamin E-deficient diet containing highly unsaturated fatty acids. Acta path. scand. (Københ.) **24**, 86—95 (1947). — ⁵ DAM, H., u. H. GRANADOS: Peroxidation of body fat in Vitamin E-deficiency. Acta physiol. scand. **10**, 162—171 (1945). — ⁶ ENDICOTT, K. M.: Similarity of acid-fast pigment ceroid and oxidized unsaturated fat. Arch. of Path. **37**, 49—53 (1944). — ⁷ ENDICOTT, K. M., and R. D. LILLE: Ceroid, the pigment of dietary cirrhosis of rats, its characteristics and its differentiation from hemofuscin. Amer. J. Path. **20**, 149—153 (1944). — ⁸ FRESEN, O.: Untersuchungen zur Struktur und Genese des Tuberkels, als Beitrag zur tuberkulösen Entzündung. Virchows Arch. **317**, 491—517 (1950). — ⁹ FRESEN, O.: Beiträge zur Histogenese der Tuberkulose. Beitr. Klin. Tbk. **103**, 47 (1950). — ¹⁰ GEDIGK, P.: Zur Histochemie der Fremdkörperreaktionen. Verh. dtsh. Ges. Path. **1956**, 206—209. — ¹¹ GEDIGK, P., u. G. STRAUSS: Zur formalen Genese der Eisenpigmente. Virchows Arch. **326**, 172—190 (1954). — ¹² GEDIGK, P., u. W. PROCH: Über die Speicherung von Schwermetallverbindungen in mesenchymalen Geweben. Beitr. path. Anat. **116**, 124—148 (1956). — Über die Bildung von organischen Substanzen in Siliciumdioxidgranulomen. Virchows Arch. **328**, 513—535 (1956). — ¹³ GEDIGK, P., u. W. PROCH: Unveröffentlichte Versuche. — ¹⁴ GEDIGK, P., u. E. BONTKE: Über den Nachweis von hydrolytischen Enzymen in Lipopigmenten. Z. Zellforsch. **44**, 495—518 (1956). — ¹⁵ GOMORI, G.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **72**, 449 (1949). — ¹⁶ GOMORI, G.: An improved histochemical technic for acid phosphatase. Stain Technol. **25**, 81—85 (1950). — ¹⁷ GOMORI, G.: Methods of study for tissue

lipase, in Menstruation and its Disorders. Springfield, Ill.: C. C. Thomas 1950. — ¹⁸ GOMORI, G.: The histochemistry of esterases. *Internat. Rev. Cytol.* **1**, 323—335 (1952). — ¹⁹ GOMORI, G.: *Microscopical Histochemistry*. University of Chicago Press 1953. — ²⁰ GOMORI, G.: Histochemistry of human esterases. *J. Histochem. a. Cytochem.* **3**, 479—484 (1955). — ²¹ GÖSSNER, W.: Histoenzymatische Untersuchungen zur Tuberkulose. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **39**, 152—155 (1955). — ²² GÖSSNER, W.: Diskussionsbem. zum Vortrag O. HEIDENREICH und G. SIEBERT, Neue Methoden zur Untersuchung von Lipofuscin. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **39**, 193—199 (1955). — ²³ GROGG, E., u. A. G. E. PEARSE: A critical study of the histochemical techniques for acid phosphatase, with a description of an azodye method. *J. of Path.* **64**, 627—636 (1952). — ²⁴ GROGG, E., u. A. G. E. PEARSE: The enzymic and lipid histochemistry of experimental tuberculosis. *Brit. J. Exper. Path.* **33**, 567—576 (1952). — ²⁵ HASS, G. M.: Interzelluläre Transformation ungesättigter Fettsäuren und Ester. (Englisch.) *Arch. of Path.* **26**, 1196 (1938). *Zit. Zbl. Path.* **73**, 157 (1939). — ²⁶ HASS, G. M.: Tissue reaction to natural oils and thereof. *Arch. of Path.* **26**, 956—965 (1938). — ²⁷ HASS, G. M.: Membrane formation of lipid-aqueous interfacts in tissues. *Arch. of Path.* **28**, 177—198 (1939). — ²⁸ HAYTHORN, S. R.: Multinucleated giant cells. *Arch. of Path.* **7**, 651 (1929). — ²⁹ HECTOEN, L.: Giant cells in healing tuberculosis. *J. of Exper. Med.* **3**, 21 (1898). — ³⁰ HEIDENREICH, O., u. G. SIEBERT: Untersuchungen am isolierten, unveränderten Lipofuscin aus Herzmuskulatur. *Virchows Arch.* **327**, 112—126 (1955a). — Neue Methoden zur Untersuchung von Lipofuscin. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **39**, 193—199 (1955b). — ³¹ HELFERICH, B., u. E. SCHMITZ: Über den Einfluß von Quarzstaub und von Aluminiumphosphat auf einige Fermente. *Beitr. Silikoseforsch.* **24**, 1—20 (1953). — ³² HOFFMANN-OSTENHOF, O.: *Enzymologie*. Wien: Springer 1954. — ³³ LANG, K.: Die Biologie der Enzyme. In 4. Colloquium der Ges. für Physiolog. Chemie, S. 1—25. Berlin: Springer, 1953. — ³⁴ LINZBACH, A. J.: Quantitative Biologie und Morphologie des Wachstums einschließlich Hypertrophie und Riesenzellen. In *Handbuch der allgemeinen Pathologie*, Bd. VI/1, S. 254—280. 1955. — ³⁵ LINZBACH, A. J.: Über die Entstehung der Riesenzellen und ihrer Einschlüsse in epitheloidzelligen Granulomen. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **38**, 187—193 (1955). — ³⁶ MAXIMOW, A.: Tuberculosis of mammalian tissue in vitro. *J. Inf. Dis.* **34**, 549 (1924). — ³⁷ MOOG, F.: *J. Cellul. a. Comp. Physiol.* **22**, 223 (1943). — ³⁸ PEARSE, A. G. E., and J. L. REIS: *Biochemic. J.* **50**, 534 (1952). — ³⁹ PEARSE, A. G. E.: *Histochemistry, Theoretical and Applied*. London 1953. — ⁴⁰ RASHEVSKY, N.: *Mathematical biophysics*. Illinois 1938. *Zit. nach* A. J. LINZBACH. In *Handbuch der allgemeinen Pathologie*, Bd. VI/1, S. 254—280. 1955. — ⁴¹ RAU, L.: Über Vorkommen, Entstehung und Bedeutung der Riesenzellen in normalen und pathologischen Geweben. *Erg. Path.* **26**, 229—352 (1932). — ⁴² DE ROBERTIS and R. GRASSO: *Endocrinology* **33**, 137 (1946). — *Zit. nach* A. G. E. Pearse, *Histochemistry. Theoretical and Applied*, London, 1953. — ⁴³ ROULET, F. C.: Die infektiösen, „spezifischen“ Granulome. In *Handbuch der allgemeinen Pathologie*, Bd. VII/1, S. 325—496. 1956. — ⁴⁴ SELIGMAN, A. M., and A. M. RUTENBERG: The histochemical demonstration of succinic dehydrogenase. *Science (Lancaster, Pa.)* **113**, 317—320 (1951). — ⁴⁵ SCHMIDT-MATTHIASEN, H.: Siliciumdioxid und die reaktive Entstehung von Bindegewebe. *Virchows Arch.* **327**, 419—459 (1955). — ⁴⁶ WURM, H.: *Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Tuberkulose*. In: *Die Tuberkulose*, Bd. 1. Leipzig 1943. — ⁴⁷ WURM, E.: Über die Entstehung von Fremdkörperriesenzellen. *Beitr. path. Anat.* **116**, 149—167 (1956).

Dozent Dr. PETER GEDIGK,

Pathologisches Institut der Universität, Bonn-Venusberg