

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

Nachweis von Enzymen an in vitro gezüchteten Makrophagen und epitheloiden Zellen*

Von

A. GROPP und K. HUPE

Mit 3 Textabbildungen in 7 Einzeldarstellungen

(Eingegangen am 16. August 1958)

Bei der Explantation vieler und unterschiedlicher Gewebe treten amöboid bewegliche Zellen auf, die je nach der Art des explantierten Gewebes in mehr oder minder großer Zahl und über einen verschiedenen langen Zeitraum während der ersten Züchtungspassagen aus dem Explantat auswandern. Diese Zellen sind vor allem von CARREL und EBELING¹, W. R. LEWIS², CHEVREMONT² u. a. eingehend untersucht, allerdings nicht ganz einheitlich benannt worden. Zumeist werden sie als Makrophagen bezeichnet, obgleich damit eigentlich nur auf die Eigenschaft der Phagozytose bzw. Makrophagie hingewiesen wird, die ja, zumal unter den Bedingungen in vitro⁶, auch vielen anderen Zellen zukommt. Die Makrophagen, die aus Kulturen von embryonalem Bindegewebe oder z. B. auch von Tumorgeweben auswandern, sind in ihrer Gestalt sehr wechselnde und überaus rasch bewegliche Zellen. Unter bestimmten, offenbar milieu- bzw. pH-abhängigen Umständen wandeln sie sich in flach ausgebreitete, weniger stark umherwandernde Zellen von epitheloidem Charakter um und dann oft auch noch weiter in mehrkernige Riesenzellen. In frischen Explantaten von der Mäusemilz oder auch von der embryonalen Mäuselunge bilden solche epitheloiden Zellen meist breite, zusammenhängende Wachstumssäume, während die amöboid beweglichen Makrophagen an Zahl mehr zurücktreten.

Die Herkunft der Makrophagen und epitheloiden Zellen in der Gewebekultur ist teilweise noch umstritten. CHEVREMONT² z. B. glaubt, daß sie durch Umwandlung aus einer Reihe von verschiedenen Zellformen, vor allem Fibroblasten und Myoblasten, entstehen könnten. Für die Mehrzahl der in Gewebekulturen auswandernden Makrophagen liegt es unserer Auffassung nach⁶ allerdings am nächsten, sie von den Histiocyten herzuleiten, die das explantierte Gewebe jeweils enthält. Das sind vor allem die „ruhenden Wanderzellen“¹⁰ des lockeren Bindegewebes, z. B. auch im Stroma von Geschwulstgewebe; oder es sind die reticulo-endothelialen Zellen etwa der Milz oder es mögen die Blutmonocyten sein, die sich — wie in Kulturen von Hühnerblut — besonders leicht in epitheloide Zellen und Riesenzellen umwandeln^{9,14}. Wir fassen daher im folgenden Makrophagen, epitheloide Zellen und die Riesenzellformen auch unter der Bezeichnung „histiocytäre Zellformen“ zusammen.

Bereits in einer früheren Untersuchung⁵ war auf die allgemein reiche Enzymausstattung der Makrophagen hingewiesen und mit der besonderen Spezialisierung auf aktive Freß- und Resorptionsleistung erklärt worden. Es mußte daher interessieren, weitere Befunde über histo-

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

chemisch an diesen Zellen nachweisbare Enzyme zu erhalten. Dabei war auch die Frage zu beantworten, mit welchen weiteren enzymhistochemischen Methoden sich Unterschiede zwischen den histiocytären Zellen und Fibroblasten auffinden ließen.

Im Rahmen solcher Untersuchungen verdient, wie wir glauben, eine Frage besondere Aufmerksamkeit: welchen Einfluß hat die Züchtung eines Gewebes *in vitro*, also die Gesamtheit der damit verbundenen Veränderungen der Lebensbedingungen, des Milieus usw. auf die enzymatischen Eigenschaften der Zelle? Bei der sauren Phosphatase kommt es nach unseren vergleichenden Beobachtungen⁵ an embryonalen Mäusefibroblasten *in vivo* und *in vitro* offenbar durch die Wachstumsaktivierung bei der Explantation und der Züchtung zu einem Aktivitätsanstieg des Enzyms. Es taucht daher die Frage auf, ob auch bei der Züchtung von *Makrophagen und epitheloiden Zellen in vitro* bzw. bei ihrer Entstehung aus ruhenden histiocytären Zellformen eine nachweisbare Veränderung oder Vermehrung ihres Enzymgehaltes eintritt. Über den histochemischen Nachweis einer Reihe von Enzymen in Phagocyten und Fremdkörperriesenzellen von Fremdkörpergranulomen der Maus haben aus unserem Institut GEDIGK und BONTKE³ eingehend berichtet: für *phagocytierende Zellen* hatten sich gegenüber ruhenden Histiocyten Hinweise auf eine offenbar „unspezifische“, d. h. nicht durch die Art des Fremdkörpers beeinflusste Bildung bzw. Vermehrung einiger Enzyme ergeben, darunter auch der sauren Phosphatase.

Für die vorliegende Untersuchung verwendeten wir (1) Explantate von der Milz jugendlicher Mäuse des DBA-Inzuchtstammes und von embryonalem Lungengewebe des gleichen Mäusestammes. Diese Gewebe wurden ohne Plasma direkt auf Glasstreifen in Rollröhrchen, gewöhnlich nicht länger als bis zur 3. Passage, gezüchtet. — Außerdem (2) gewannen wir aus spontanen Mammacarcinomen von DBA-Inzuchtmäusen Zellkulturen, die in den ersten Passagen vorwiegend aus Makrophagen bestanden. Erst mit zunehmender Züchtungsdauer verdrängten die anfänglich nur spärlich vorhandenen Carcinomzellen die histiocytären Zellformen fast völlig. Zur Herstellung dieser Kulturen wurden die Tumoren zunächst fein zerschnitten und dann in 0,05%iger Trypsinlösung durch Schütteln mit Glaskugeln weiter zerkleinert; als Sieb zum Zurückhalten gröberer Bestandteile diente Glaswolle. Die so erhaltene Zellsuspension wurde in Züchtungsflaschen pipettiert, deren Boden mit Glasstreifen ausgelegt war.

Als Züchtungsmedium diente für die Milz- und Lungenkulturen ein Gemisch aus Placentarserum, Embryonalextrakt und Salzlösung nach PANNET-COMPTON (modifiziert) im Verhältnis 4:1:5, für die Zellkulturen des Mammacarcinoms ein Nährgemisch mit 2,5% Lactalbumin-Hydrolysat in Salzlösung nach HANKS + 10% Placentarserum.

Reaktionen zum Nachweis von Enzymen

1. *Adenosintriphosphatase (ATPase)*. Calcium-Kobalt-Methode entsprechend dem Nachweis unter 2b⁸ und nach PADYKULA und HERMAN¹¹; pH 9,2; Substrat: Na-Salz der Adenosintriphosphorsäure (Sigma); Inkubation: 10 min bis 4 Std bei 37°C.

2. *Alkalische Phosphatase*. a) Azofarbstoffmethode¹²; p_H 9,2; Substrat: Na- α -naphthylphosphat; Diazoniumsalz: diazot. 4-Benzoylamino-2,5-Dimethoxyanilin; Inkubation: 3—20 min, 20 C°. b) Calcium-Kobalt-Methode nach GOMORI¹²; p_H 9,2; Substrat: Na- β -Glycerophosphat. Inkubation: 10 min bis 4 Std bei 37° C.

3. *Phosphatase bei physiologischem p_H* . Bleiphosphat-Methode nach WACHSTEIN und MEISEL¹³; p_H 7,2; Substrat: Na- β -Glycerophosphat oder Na-Salz der Adenosintriphosphorsäure (Sigma); Inkubation 10—60 min bei 37° C.

4. *Saure Phosphatase*. Bleiphosphat-Methode nach GOMORI¹²; p_H 5,0; Substrat: Na- β -Glycerophosphat; Inkubation: 30 min bis 3 Std bei 37° C.

5. *Unspezifische Esterase* (GOMORI^{4,12}). p_H 7,4; Substrat: α -Naphthylacetat; Diazoniumsalz: diazot. o-Dianisidin; Inkubation: 3—10 min bei 20° C.

Die Gewebekulturen wurden in der Regel 1—2 Std in 2% Salzformalin bei 4° C fixiert, für die unspezifische Esterase meist nur 30 min. Bei Verwendung von unfixierten, lebenden Zellen konnte bei der unspezifischen Esterase die Inkubationszeit auf 2—5 min verringert werden⁷.

Ergebnisse

In den Gewebekulturen von der Milz und ähnlich auch von embryonaler Lunge besteht der Wachstumssaum nach der ersten Anzüchtung teils aus lebhaft amöboid

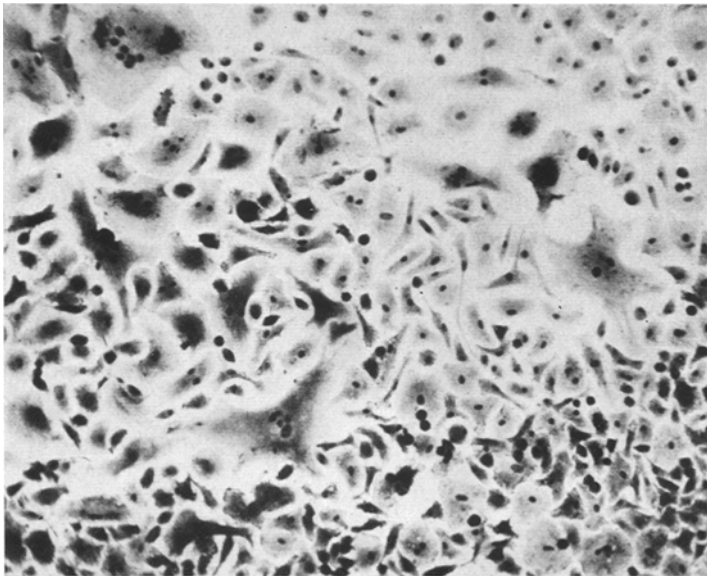


Abb. 1. Milzkultur (Maus), 2. Passage. Von der Innenzone des Wachstumssaumes (in der Abbildung unten) nach peripher (in der Abbildung oben) zunehmende Umwandlung von Makrophagen in epitheloide und Riesenzellen. ATPase-Reaktion (Calcium-Kobalt-Methode; p_H 9,2). Inkubationsdauer: 60 min

beweglichen Makrophagen und teils aus epitheloiden Zellen, die sich auch zu dünnen Membranen zusammenfügen. Nach und nach wachsen dann zahlreiche Fibroblasten aus. Das mehr oder minder dichte Zellgerüst, das sie bilden, „platzt“ leicht einmal von der Glasfläche ab. An solchen Stellen im Wachstumssaum läßt sich dann die besondere gegenseitige Beziehung der einzelnen histiocytären Zellformen gut überblicken (Abb. 1); Die innere Zone des Wachstumssaums der Kultur

(in der Abbildung unten) besteht vorwiegend aus den kleineren Makrophagen; nach der Peripherie der Kultur zu (in der Abbildung oben) wandeln sie sich zunehmend in die größeren, epitheloiden Zellen und in mehrkernige Riesenzellen um. — Die Zellkulturen aus dem Mammacarcinom enthalten während der ersten Züchtungspassagen, in denen die Kulturen verwendet wurden, neben kleinen Inseln von Carcinomzellen und einigen Fibroblasten in reichem Maße alle Übergangsformen (Abb. 2 b) zwischen Makrophagen und mehr epitheloiden Zellen. Dagegen finden sich in ihnen nur selten mehrkernige Riesenzellen. Trotz gewisser Unterschiede — vor allem im mengenmäßigen Anteil der einzelnen Zellformen — besitzen die histiocytären Zellformen in den Kulturen von Milz, Lunge und Carcinom im wesentlichen ganz entsprechende morphologische (vgl. Abb. 2 a und b) und verhaltensmäßige Eigenschaften. Die ändern in den Kulturen vorhandenen Zellarten, wie z. B. Fibroblasten oder Krebszellen, lassen sich leicht von den histiocytären Zellformen unterscheiden. Ihre Anwesenheit ermöglicht bei den einzelnen Enzymnachweisreaktionen gewisse Vergleiche und Kontrollen.

Adenosintriphosphatase (ATPase). Schon bei kürzerer Inkubation der Kulturen in dem ATP-haltigen Substrat (Calcium-Kobalt-Methode; pH 9,2) läßt sich im Cytoplasma der histiocytären Zellformen feinkörniges Reaktionsprodukt nachweisen; aber auch in den kleinen, dichten Zellkernen kommt es bereits früh, meist schon zugleich mit der ersten deutlichen Reaktion im Cytoplasma, zu einer Schwärzung (Abb. 3 a). Zunehmende Inkubationsdauer, nämlich über $2\frac{1}{2}$ Std bis 4 Std, führt dann bis zu einer starken, fast homogenen Schwärzung der ganzen Zelle. Die kleineren Makrophagen sind etwas reicher an Enzymaktivität als die größeren, flachen, epitheloiden Zellen und die Riesenzellen (Abb. 3 a). Daher zeigt die Abb. 1 wie mit der Umwandlung von Makrophagen über epitheloide Zellen in Riesenzellen (auf der Abbildung von unten nach oben) die Enzymaktivität absinkt.

Es bestanden keine Unterschiede im Ergebnis der beiden Nachweismethoden nach 1 a, (s. oben) (GOMORI) oder nach 1 b (s. oben) (PADYKULA u. HERMAN¹⁴). Zusatz von KCN 0,001 und 0,01 M oder von l-Cystein 0,0025 und 0,01 M hemmt die Reaktion nicht; durch die genannten Cysteinkonzentrationen wird sie sogar teilweise leicht verstärkt. Nach Hitzezerstörung des Enzyms tritt bei Inkubation bis 4 Std keine Reaktion oder Schwärzung auf, insbesondere auch nicht an den Zellkernen. Bei Verwendung von β -Glycerophosphat oder Adenosin-5'-monophosphat als Substrat an Stelle von ATP blieb die Reaktion negativ.

An den größeren *epitheloiden* Zellen und den mehrkernigen Riesenzellen ist das Reaktionsprodukt innerhalb des Cytoplasmas meist perinucleär (Abb. 2 a) lokalisiert oder vielfach in deutlich radiärer Anordnung (Abb. 3 a) von der perinucleären Region nach der Peripherie an Intensität abnehmend. Ein Zusammenhang mit einem besonderen cytoplasmatischen Strukturelement ist nicht sicher erkennbar. Allerdings enthält die gleiche perinucleäre Zone zahlreiche feine Bläschen und Vacuolen (Abb. 2 a und 3 a), die nach phasenkontrastmikroskopischen Beobachtungen zum mindesten teilweise damit zusammenhängen, daß hier die durch Pinocytose aufgenommenen Flüssigkeitströpfchen zusammenströmen und verarbeitet werden. In den vielgestaltigen *Makrophagen* ist

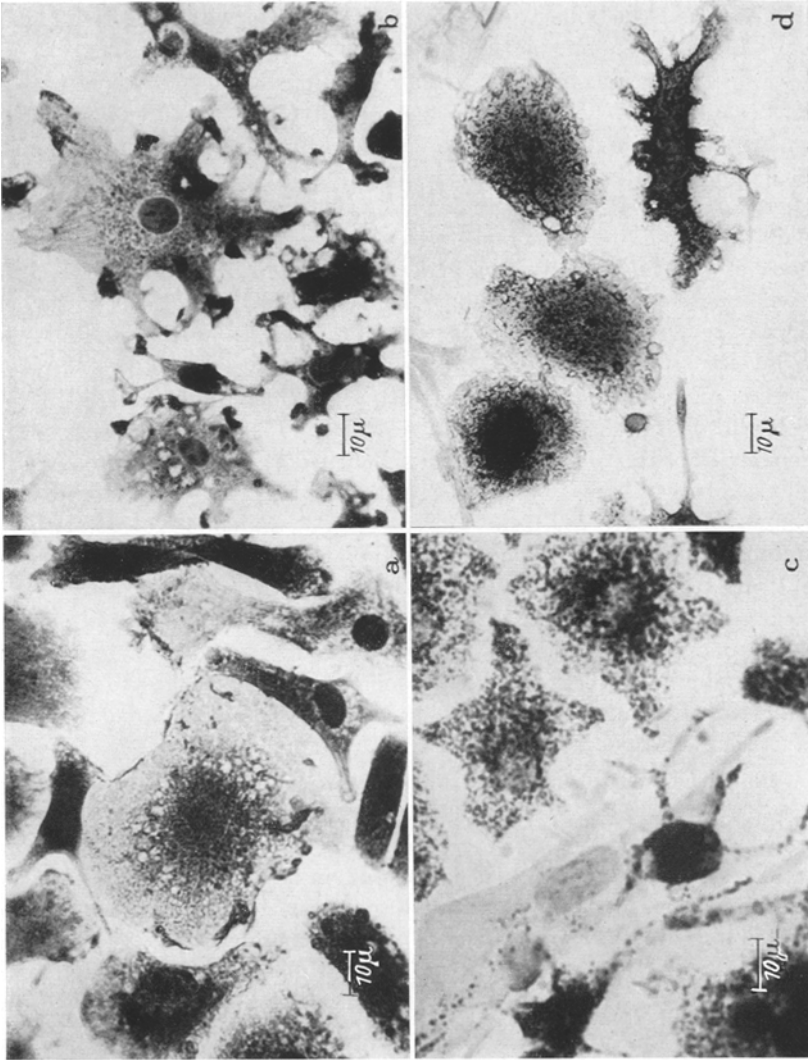


Abb. 2. a und b ATPase-Reaktion (Calcium-Kobalt-Methode; pH 9,2). Inkubationsdauer 120 min. a Milz (Maus); größere epitheloide Zelle und mehrere Makrophagen. Positive Reaktion im Cytoplasma, vorwiegend perinucleär, bei den Makrophagen auch stärkere Schwärzung des Zellkerns. b Zellkultur aus einem Mammarcarcinom der Maus; kleinere und größere Makrophagen mit Übergang in epitheloide Zellen. Unregelmäßig verteilte Reaktion im Cytoplasma. Zellkern geschwärzt. c Saure Phosphatase (Bleiphosphat-Methode, pH 5,0); Inkubationszeit: 60 min. Milz (Maus); Epitheloide Zellen und Makrophagen mit schmalen, langen Fortsätzen. Stärkere, gleichmäßig verteilte Reaktion im Cytoplasma. Ein Fibroblast noch ohne nachweisbare Enzymreaktion. Leichte Kerngegenfärbung mit MAYERS Hämalaun. d Unspezifische Esterase. Zellkultur aus einem Mammarcarcinom (Maus), Fixierung 30 min. Substrat: α -Naphthylacetat; pH 7,4; Inkubationsdauer: 10 min. Makrophage und epitheloide Zellen mit positiver Reaktion an der Zelloberfläche, insbesondere den Zelloberflächenfaltungen

das Reaktionsprodukt unregelmäßiger verteilt: hier findet es sich häufig auch in den pseudopodienartigen Cytoplasmafortsätzen (Abb. 2b).

Die Nachweisreaktion der ATPase (Calcium-Kobalt-Methode; p_H 9,2) an den *übrigen Zellarten*, die in den untersuchten Kulturen vorhanden sind, weicht in ihrer Lokalisation deutlich von derjenigen an den Makrophagen und epitheloiden Zellen ab: in Fibroblasten und Carcinomzellen tritt eine positive Reaktion an den fädigen Mitochondrien ein. Soweit die Carcinomzellen in membranartigen Verbänden liegen, ist außerdem noch eine geringe Aktivität an den Zellgrenzen vorhanden. Die Zellkerne sind in Fibroblasten und Carcinomzellen, im Gegensatz zu den Makrophagen und epitheloiden Zellen, bis zu Inkubationszeiten von 4 Std negativ.

Das Ergebnis des ATPase-Nachweises bei physiologischem p_H (Bleiphosphatmethode) nach WACHSTEIN und MEISEL¹³ entspricht an den Makrophagen und epitheloiden Zellen den Befunden mit der Calcium-Kobalt-Methode bei p_H 9,2, während die Fibroblasten und Carcinomzellen negativ bleiben. Anders als bei der Calcium-Kobalt-Methode treten jedoch bei der Bleiphosphatmethode leicht störende Niederschläge auf, die die Lokalisierung erschweren.

Alkalische Phosphatase. Weder an den Makrophagen und epitheloiden Zellen noch an den anderen in den Kulturen anwesenden Zellarten ließ sich — zumindest bei den hier verwendeten Inkubationszeiten der Calcium-Kobalt- und Azofarbstoffmethode — histochemisch nachweisbare alkalische Phosphatase auffinden.

Die Bleiphosphatreaktion zum Nachweis der *Glycerophosphatase* bei *physiologischem* p_H ¹³ blieb ebenfalls durchweg negativ.

Saure Phosphatase. In den Makrophagen, epitheloiden Zellen und mehrkernigen Riesenzellen ist dieses Enzym in der Form eines körnigen Niederschlags im Cytoplasma nachweisbar (Abb. 2c und 3b). Seine Verteilung innerhalb des flachen Cytoplasmasaums der epitheloiden Zellen und der Riesenzellen ist meist recht gleichmäßig. Die Zellkerne blieben auch bei höheren Inkubationszeiten bis 3 Std in der Regel frei von Reaktionsprodukt (vgl. Abb. 3b mit 3a). Die anderen in den untersuchten Kulturen vorhandenen Zellarten, nämlich Fibroblasten oder Carcinomzellen, wiesen eine qualitativ ähnliche Reaktion der sauren Phosphatase auf; doch sind für sie etwas höhere Inkubationszeiten notwendig. Die Abb. 2c zeigt z. B. einen noch negativen Fibroblasten aus einer Milzkultur, der von bereits stärker positiven Makrophagen und epitheloiden Zellen umgeben ist.

Die Nachweisreaktion der sauren Phosphatase ließ sich durch NaF 0,01 M und L-Cystein 0,01 M völlig, durch Cystein 0,0025 M stark hemmen. Nach Hitzeinaktivierung blieb eine Reaktion aus. Substratansätze mit ATP oder Adenosin-5'-Phosphat an Stelle von β -Glycerophosphat waren negativ.

Unspezifische Esterase ist offenbar in reichlicher Menge in Makrophagen, epitheloiden Zellen und mehrkernigen Riesenzellen vorhanden. Denn mit α -Naphthylacetat als Substrat ist an diesen Zellen bereits nach einer Inkubation von wenigen Minuten eine starke Reaktion zu beobach-

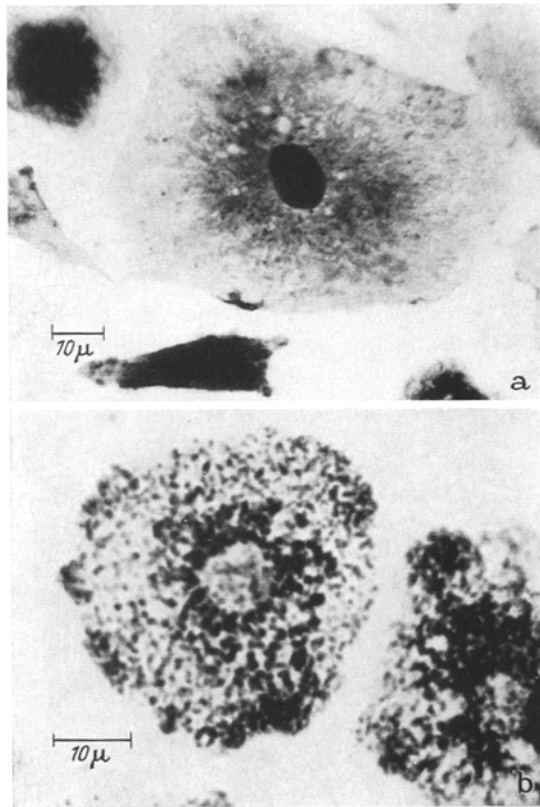


Abb. 3a u. b. Epitheloide Zellen aus der Milz (Maus), 3. Passage: a ATPase (Calcium-Kobalt-Methode; pH 9,2; Inkubationsdauer: 120 min). Perinucleäre, radiäre Lokalisation des Enzyms. Stärkere Schwärzung des Zellkerns. b Saure Phosphatase (Bleiphosphat-Methode; pH 5,0; Inkubationsdauer: 60 min). Gleichmäßige Verteilung im Cytoplasma. Freibleiben der Zellkerne

ten, während Fibroblasten oder Carcinomzellen in denselben Präparaten vergleichsweise nur eine geringe Aktivität aufwiesen oder völlig negativ blieben. Allerdings sind die Ergebnisse davon abhängig, ob die Nachweisreaktion an lebenden oder fixierten Kulturen vorgenommen wird. Bei Inkubation lebensfrischer Kulturen in einer Substratlösung auf der Grundlage einer physiologischen Salzlösung (HANKS) genügen 2—4 min für eine intensive Enzymreaktion an den histiocytären Zellen; Fibroblasten oder Carcinomzellen sind weniger stark positiv. Nach Fixierung

in Formalin nimmt mit zunehmender Fixierungsdauer in Makrophagen und epitheloiden Zellen die nachweisbare Enzymaktivität etwas ab, dagegen werden Fibroblasten bzw. Carcinomzellen dann völlig negativ. Die Abb. 2d zeigt aus einer 30 min lang fixierten Kultur epitheloide Zellen und einen Makrophagen, an denen nach 10 min Inkubation noch eine kräftige Enzymaktivität erkennbar ist. Das Reaktionsprodukt ist meist feinstäbchen- oder kommaförmig oder auch mehr netzig-filigranartig. Die Beobachtung der Entstehung des Reaktionsproduktes unter dem Phasenkontrastmikroskop und der Vergleich mit Ergebnissen an Zellen von menschlichen Epidermoidcarcinomen *in vitro*⁷ lassen annehmen, daß die Aktivität der unspezifischen Esterase auch bei den Makrophagen und den epitheloiden Zellen zu einem großen Teil an die Zelloberfläche zu lokalisieren ist. Dabei scheint bei Makrophagen das Reaktionsprodukt gleichmäßiger und dichter an der Oberfläche des Zellkörpers und der Cytoplasmafortsätze verteilt zu sein. Bei den epitheloiden Zellen und Riesenzellen dagegen tritt die Reaktion an den sehr feinen Fältelungen auf, die sich auch im Phasenkontrastmikroskop an der Oberfläche dieser Zellen beobachten lassen.

Besprechung

Unter den Enzymen, deren histochemischer Nachweis an *in vitro* gezüchteten Makrophagen und epitheloiden Zellen in dieser Arbeit versucht wurde, waren eine *Adenosintriphosphatase* bei p_H 9,2 und bei p_H 7,2¹³, die *saure Phosphatase* und die *unspezifische Esterase* in genügender Menge vorhanden, um recht starke und teilweise auch näher lokalisierbare Reaktionen zu ergeben. Dagegen fehlte eine nachweisbare *alkalische Phosphatase*. Bereits in einer früheren Untersuchung⁵, in der an makrophagenhaltigen Bindegewebs- und Sarkomkulturen einige Aussagen über die Aktivität einzelner Enzyme an Makrophagen möglich waren, konnte auf den besonders starken Ausfall der *Phosphoamidase* und der *sauren Phosphatase* sowie auf die positive β -*Glucuronidase*-Reaktion an diesen Zellen hingewiesen werden. An Hühnermonocytenkulturen haben WEISS und FAWCETT¹⁴ mit der Umwandlung der Monocyten in Makrophagen und Riesenzellen einen Anstieg der histochemisch nachweisbaren *sauren Phosphatase* festgestellt. Wie in der vorliegenden Untersuchung war die *alkalische Phosphatase* negativ.

Dagegen gelang es WEISS und FAWCETT¹⁴ nicht, an den von ihnen verwendeten Zellen eine *unspezifische Esterase* nachzuweisen. Dies hängt möglicherweise damit zusammen, daß dieses Enzym auf Grund seiner besonderen Lokalisation einer längeren Fixierung nicht standhält; ist es doch hauptsächlich an die Zelloberfläche und besonders an deren feine Fältelungen gebunden. In anderen von uns untersuchten Zellen, z. B. menschlichen Carcinomzellen *in vitro*, an denen die *unspezifische Esterase*

eine ähnliche Lokalisation besitzt⁷, ist sie bereits nach ganz kurzer Fixierung nicht mehr nachweisbar. Das ist bei den Makrophagen und epitheloiden Zellen aus Mäusegewebe nicht ganz so. Aber schon bei geringer Verlängerung der Fixierungsdauer über 30 min vermindert sich auch an diesen die nachweisbare Enzymaktivität beträchtlich.

Besondere Aufmerksamkeit verdient das Vorhandensein von *Adenosin-triphosphatase* in den Makrophagen und epitheloiden Zellen. Wir haben uns bemüht, durch Kontrollversuche das Ergebnis zu sichern und eine unspezifische Reaktion auszuschließen. Wesentlich ist dabei, daß mehrere Nachweismethoden zu dem gleichen Resultat führten, nämlich sowohl die Calcium-Kobalt-Methoden bei p_H 9,2 entsprechend der Nachweisreaktion der alkalischen Glycero-Phosphatase und diejenige entsprechend den Angaben von PADYKULA und HERMAN¹¹, als auch eine Bleiphosphatmethode bei physiologischem p_H ¹³. Die Substratansätze mit β -Glycero-phosphat an Stelle von ATP waren bei diesen 3 Nachweismethoden jeweils negativ. Wenn die ATPase-Reaktion durch KCN nicht gehemmt, durch L-Cystein dagegen eher aktiviert wird, stimmt das mit Beobachtungen⁸ überein, die wir an Gewebeskulturen von menschlichen Carcinomen machen konnten. Auffallend ist die starke Schwärzung der Zellkerne der Makrophagen und epitheloiden Zellen durch das Reaktionsprodukt des ATPase-Nachweises. Denn sie tritt schon gleichzeitig mit der ersten Reaktion im Cytoplasma ein; andererseits fehlt eine ähnliche Schwärzung der Zellkerne in Fibroblasten oder Carcinomzellen, die, wenn auch in anders gearteter Lokalisation, gleichfalls eine Aktivität im Cytoplasma aufweisen. Wenn schließlich die Zellkerne der Makrophagen und der epitheloiden Zellen bei der sauren Phosphatase (Bleiphosphat-Methode) keine Zeichen von Kerndiffusion zeigen (vgl. Abb. 3a mit 3b), so erhebt sich die Frage, ob die Schwärzung der Zellkerne der Makrophagen und epitheloiden Zellen bei der ATPase-Reaktion kein gewöhnlicher Adsorptionsartefakt, sondern eventuell Ausdruck einer echten Enzymreaktion ist. Allerdings kann diese Frage nicht entschieden werden.

In den bei den vorliegenden Untersuchungen verwendeten Kulturen waren außer den histiocytären Zellelementen noch Fibroblasten oder auch Mammacarcinomzellen vorhanden. Der Vergleich der Ergebnisse der Enzymreaktion an diesen verschiedenen Zellarten unterstreicht die Besonderheiten der enzymatischen Ausrüstung der Makrophagen und epitheloiden Zellen. Bei der ATPase ist dabei die stärkere Enzymaktivität der Makrophagen und epitheloiden Zellen und der Unterschied der Enzymlokalisation bedeutsam. In den Fibroblasten und Carcinomzellen findet sich eine ATPase im wesentlichen nur an den Mitochondrien. Wahrscheinlich sind auch in den Makrophagen und epitheloiden Zellen die Mitochondrien positiv. Sie sind jedoch bei diesen Zellen sehr fein-

granulär und liegen vorwiegend in dem perinucleären Raum, der eine allgemein starke ATPase-Aktivität besitzt. Innerhalb dieser perinucleären Zone ist eine genauere Lokalisation des Enzyms an cytoplasmatische Strukturen nicht möglich. Die *saure Phosphatase* und die *unspezifische Esterase* weisen dagegen in den histiocytären Zellformen nur eine wesentlich stärkere Aktivität als in den Fibroblasten oder Carcinomzellen auf, während die Lokalisation etwa gleich ist.

Eingangs wurde der Frage besondere Bedeutung beigemessen, welchen Einfluß die Tatsache der *Züchtung* eines Gewebes, also die Veränderung der Lebensbedingungen, auf die Enzymaktivität der Zellen hat. Die Makrophagen und epitheloiden Zellen in Gewebekulturen dürften weitgehend durch eine Aktivierung ruhender Histiocyten des Explantats entstanden sein⁶. Ob die in den Makrophagen und epitheloiden Zellen in vitro nachgewiesenen Enzyme bei dieser Aktivierung der ruhenden Histiocyten erst entstanden sind oder vermehrt gebildet wurden, läßt sich aus den vorliegenden Beobachtungen nicht entscheiden. Nach ihren Untersuchungen über die Umwandlung von Hühnerblutmonocyten in Makrophagen nahmen WEISS und FAWCETT¹⁴ an, daß die Zunahme der sauren Phosphatase im Laufe dieser Umwandlung mit der erhöhten Phagocytoseaktivität zu erklären sei. Bedeutsame Hinweise ergeben sich aus den Befunden von GEDIGK und BONTKE³ an Fremdkörpergranulomen bei der Maus. Denn die sich an die Fremdkörper anlagernden, aktivierten und phagocytierenden histiogenen Zellelemente wiesen einen reichen Enzymgehalt auf, während an den weiterab liegenden, ruhenden Histiocyten nur geringere Enzymaktivität vorhanden war oder ganz fehlte. Für die von ihnen untersuchten Enzyme nahmen GEDIGK und BONTKE³ eine von der besonderen Art des Fremdkörpers unabhängige, unspezifische Aktivierung an, deren Aufgabe im Rahmen des allgemeinen Zellstoffwechsels liege. Eine ähnliche allgemeine Aktivierung ihres Enzymbestandes besteht offenbar für die Makrophagen und epitheloiden Zellen in der Gewebekultur: die Aktivierung wird, wie es scheint, allein schon durch die Explantation in vitro und den damit verbundenen Reiz ausgelöst. Bei Fibroblasten trifft dies in gewissem Umfange ebenfalls zu, wie frühere Untersuchungen⁵ wenigstens für die saure Phosphatase zeigten. Ob für die histiocytären Zellformen darüber hinaus die Phagocytose, wie sie in Kulturen der hier verwendeten Art als Phagocytose von Trümmern zugrunde gegangener Zellen immer möglich ist, eine bedeutsame Rolle spielt, ist nicht sicher zu entscheiden. Bei in vitro gezüchteten Fibroblasten ließ sich allerdings im Falle der sauren Phosphatase eine weitere Vermehrung des Enzyms durch Phagocytose histochemisch nicht nachweisen; es scheint dann im wesentlichen nur zu Verschiebungen der Enzymlokalisation zu kommen.

Zusammenfassung

An Makrophagen und epitheloiden Zellen aus Kulturen von Mäusegeweben, nämlich Milz, embryonaler Lunge und auch aus einem Spontantumor, lassen sich mit histochemischen Methoden folgende Enzyme auffinden: Adenosintriphosphatase, saure Phosphatase und unspezifische Esterase. Nachweisbare alkalische Phosphatase ist nicht vorhanden.

Die Aktivität dieser Enzyme ist in den Makrophagen und epitheloiden Zellen deutlich stärker als z. B. in Fibroblasten. Die Adenosintriphosphatase ist in den histiocytären Zellformen, ohne eine feinere Lokalisation zuzulassen, vorwiegend in einer perinucleären Zone, bei den Makrophagen auch in den pseudopodienartigen Fortsätzen festzustellen, in den Fibroblasten und Carcinomzellen dagegen fast ausschließlich in den Mitochondrien. Die nachweisbare unspezifische Esterase ist im wesentlichen an der Zelloberfläche lokalisiert.

Die reiche, histochemisch feststellbare Enzymausstattung der Makrophagen und epitheloiden Zellen in vitro wird auf den allgemeinen Anregungszustand dieser Zellen zurückgeführt, zu dem es bei der Umwandlung aus ruhenden histiocytären Zellformen unter dem Reiz der Explantation kommt.

Summary

Adenosintriphosphatase, acid phosphatase and non-specific esterase have been demonstrated in cultivated macrophages and epithelioid cells from tissue cultures of mouse spleen, embryonic lung, and of a mouse mammary carcinoma. These enzymes give a considerably stronger reaction in macrophages and epithelioid cells than in fibroblasts. No alkaline phosphatase has been observed.

Adenosintriphosphatase in macrophages and epithelioid cells is mainly found in a perinuclear zone but also in the pseudopodial cytoplasmic processes of macrophages; in fibroblasts and carcinoma cells, however, this enzyme gives a strongly positive reaction almost exclusively in mitochondria. *Acid phosphatase* shows a uniform distribution in the cytoplasm of all cells examined. Enzymatic staining of the cell surface was observed by *non-specific esterase* reaction.

It is suggested that the rich enzymatic system of cultivated macrophages and epithelioid cells — as far as it can be visualized by certain histochemical methods — may develop during the activation of resting histiocytic cells and their transformation occurring under the stimulus of explantation.

Literatur

- ¹ CARREL, A., and H. A. EBELING: The fundamental properties of the fibroblast and the macrophage. II. The macrophage. *J. exp. Med.* **44**, 261 (1926). —
- ² CHÈVREMENT, M.: Le système histiocytaire ou réticuloendothélial. *Biol. Rev.* **23**, 267—295 (1948). —
- ³ GEDIGK, P., u. E. BONTKE: Über die Enzymaktivität

im Fremdkörpergranulationsgewebe. *Virchows Arch. path. Anat.* **330**, 538—568 (1957). — ⁴ GOMORI, G.: Histochemistry of human esterases. *J. Histochem. Cytochem.* **3**, 479—484 (1955). — ⁵ GROPP, A., E. BONTKE u. K. HUPE: Ferment-histochemische Untersuchungen an Fibroblasten und Sarkomgewebe in vitro. *Z. Krebsforsch.* **62**, 170—187 (1957). — ⁶ GROPP, A., u. K. HUPE: Phagocytose und Kolloid(Eisen)speicherung an in vitro gezüchteten Zellen. *Verh. 55. Verslg. Anat. Ges. Frankfurt a. M.* 1958. — ⁷ GROPP, A., u. K. HUPE: Fermenthistochemische Untersuchungen an lebenden Zellen in Gewebekulturen. *Klin. Wschr.* **1958**, 361—362. — ⁸ GROPP, A., K. HUPE u. H. HELLWEG: Zum Nachweis der Adenosin-triphosphatase (ATPase) an in vitro gezüchteten Carcinomzellen. *Naturwiss.* **45**, 394 (1958). — ⁹ LEWIS, W. R.: The transformation of mononuclear blood cells into macrophages, epitheloid cells and giant cells. *Arch. exp. Zellforsch.* **6**, 253 (1928). — ¹⁰ MAXIMOW, A.: In *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*, herausgeg. von W. v. MÖLLENDORFF, Bd. II, Teil 1. 1927. — ¹¹ PADYKULA, H. A., and E. HERMAN: The specificity of the histochemical method for adenosin-triphosphatase. *J. Histochem. Cytochem.* **3**, 170—195 (1955). — ¹² PEARSE, A. G. E.: *Arbeitsvorschrift in: Histochemistry theoretical and applied.* London: J. & A. Churchill 1953. — ¹³ WACHSTEIN, M., and E. MEISEL: Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiologic pH. *Amer. J. clin. Path.* **27**, 13—23 (1957). — ¹⁴ WEISS, L. P., and D. W. FAWCETT: Cytochemical observations on chicken monocytes, macrophages and giant cells in tissue culture. *J. Histochem. Cytochem.* **1**, 47—65 (1953).

Dr. A. GROPP,

Pathologisches Institut der Universität, Bonn/Rhein-Venusberg