

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Heidelberg  
(Direktor: Prof. Dr. med. E. RANDEATH†)

## Fermenthistochemische Untersuchungen des Lymphknotens

### I. Mitteilung

#### Alkalische Phosphatase in Schnitt und Ausstrich

Von

K. LENNERT, H. LÖFFLER und L.-D. LEDER

Mit 7 Textabbildungen, davon 1 farbigen, in 14 Einzeldarstellungen

(Eingegangen am 15. Mai 1961)

In früheren Untersuchungen haben wir uns um die möglichst exakte Definition der einzelnen Lymphknotenzellen bemüht. Wir begannen mit der *vergleichenden Cytologie* von Schnitt und Ausstrich, indem wir histologische und Tupfpräparate mit etwa äquivalenten Methoden (Giemsa- bzw. Pappenheim-Färbung) untersuchten (LENNERT 1952, 1953). Es gelang dabei, auch eine Beziehung der Cytologie zu einzelnen histologischen Grundstrukturen zu finden. So konnten z. B. die basophilen Keimzentrumszellen (Germinoblasten) bereits im Ausstrich identifiziert und von den Lymphoblasten der Pulpa abgegrenzt werden (LENNERT 1957).

Sodann versuchten wir, in *karyometrischen Studien* (LENNERT und REMMELE 1958, 1959) die verschiedenen Zellformen des Lymphknotens nach ihrer Kerngröße zu ordnen und damit eine weitere Grundlage für eine genaue Zellbestimmung zu finden. Tatsächlich ergaben sich hierbei charakteristische Gesetzmäßigkeiten, die teils allgemeiner Natur sind, teils für die Nomenklatur der vielgestaltigen Einzel-elemente des Lymphknotens als Basis dienen können.

In den folgenden Mitteilungen machen wir den Versuch, die verschiedenen Lymphknotenzellen und -strukturen unter normalen und pathologischen Umständen *histo-* bzw. *cytochemisch* zu bestimmen. Wir möchten damit die bisher erarbeiteten cytomorphologischen und karyometrischen Ergebnisse weiter unterbauen und die Lymphknotenzellen noch schärfer definieren. Auch erhoffen wir uns dabei weitere Einblicke in genetische und funktionelle Zusammenhänge der einzelnen Lymphknotenelemente. Und schließlich sollen die histochemischen Befunde unsere Kenntnisse über einige Lymphknotenerkrankungen erweitern und vertiefen.

Wir führten die Untersuchungen an Schnitten und Ausstrichen durch; denn es konnte erwartet werden, daß man von gewissen Zellen des Ausstriches, deren Natur noch nicht eindeutig feststeht, auch die zugehörige Struktur im Zellverband findet. Wir denken z. B. an die Identifizierung von Gefäßendothelien. In der vorliegenden Arbeit soll über das Vorkommen der *alkalischen Phosphatase* in Schnitt und Ausstrich berichtet werden.

Seit der Mitteilung von WACHSTEIN (1946) haben zahlreiche Autoren die Aktivität der alkalischen Leukocytenphosphatase bei den verschiedensten Blutkrankheiten untersucht (Lit. u. a. bei MERKER und HEILMEYER 1960 sowie LAMBERS 1960). Über das Vorkommen der alkalischen Phosphatase in Knochenmarkspunktaten, im Lymphknoten und in der Milz haben nur relativ wenige Autoren berichtet.

Eingehendere Untersuchungen über die Aktivität der alkalischen Phosphatase in *menschlichen Lymphknoten* wurden bisher nur von ACKERMAN u. Mitarb. (Gomori-Technik),

MORITZ (Gomori-Technik) sowie BRAUNSTEIN u. Mitarb. (Gomori-Technik und Azofarbstoffmethode) durchgeführt. Einzelne Befunde haben KABATH und FURTH, GOMORI (1946), MANHEIMER und SELIGMAN, GÖSSNER (1955, 1958), WACHSTEIN (1955) sowie MONIS und RUTENBURG mitgeteilt. Übereinstimmend wird über eine deutliche Aktivität der Gefäßendothelien, speziell der Capillaren, berichtet, ja, KABATH und FURTH, BRAUNSTEIN u. Mitarb., TROWELL sowie MONIS und RUTENBURG geben an, daß keine weiteren Strukturen des Lymphknotens positiv seien. Demgegenüber soll nach ACKERMAN u. Mitarb. in zahlreichen Lymphknotenellen eine erhebliche alkalische Phosphataseaktivität nachweisbar sein, die in Kernen und Nucleolen stärker sei als im Plasma. Sie benutzten die Ca-Co-Methode nach Alkoholfixierung und Paraffineinbettung der Lymphknoten. Bei ihren Ergebnissen dürfte es sich wohl zumindest z.T. um Artefakte gehandelt haben (s. auch ACKERMAN 1960). Sie beschreiben eine positive Reaktion in Reticulumzellen, Plasmazellen, Lymphocyten und Lymphoblasten. Bei der Entwicklung von Sternbergschen Riesenzellen aus Reticulumzellen soll die Phosphataseaktivität stetig zunehmen. MANHEIMER und SELIGMAN fanden, daß neben Blutgefäßen auch fibröses Stroma Aktivität zeige. In einem leukämischen Lymphknoten waren gelegentlich kleine runde Zellen gefärbt, daneben Blutgefäße und Stroma. GÖSSNER (1955, 1958) sah in der Randzone von Epitheloidzelltuberkeln eine starke Reaktion, welche Fibroblasten und Bindegewebsfasern gleichermaßen betraf. Dagegen waren Epitheloidzellen, Langhanssche Riesenzellen und Verkäsungsbezirke ohne erkennbare Aktivität. Nach WACHSTEIN (1955) sollen im Lymphknotenausstrich mehr positive Lymphocyten vorkommen als im Blut, wo sie meist negativ seien. MORITZ untersuchte 50 Lymphknoten, die vorwiegend aus dem Mesenterialbereich stammten, mit der Gomori-Methode. Sie fand dabei neben einer starken Reaktion der Capillarendothelien einen Niederschlag im Bereich des Lymphocytenwalls der Sekundärknötchen. Die Reaktion sei stärker in „blühenden“ (großen) als in „abgeblühten“ Follikeln und ausgeprägter in entzündlich veränderten als in „normalen“ Lymphknoten. Die positive Reaktion wird im wesentlichen auf den Gehalt an Capillaren in der Follikelaußenzone zurückgeführt. Schließlich konnte MORITZ auch im neugebildeten Bindegewebe bei chronischer Entzündung alkalische Phosphatase nachweisen. Neuerdings erwähnt auch BRAUNSTEIN (1960), daß „proliferierende Fibroblasten“ in Entzündungsherden und bei Lymphogranulomatose eine starke alkalische Phosphataseaktivität zeigen.

## Eigene Untersuchungen

### *Material und Methodik*

Wir untersuchten 75 lebensfrische Lymphknoten, die aus diagnostischen Gründen in der Chirurgischen Universitätsklinik Frankfurt a.M. (Direktor: Prof. Dr. GEISSENDÖRFER) extirpiert worden waren. Die Diagnosen sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Die Lymphknoten wurden sofort nach der Operation halbiert. Von der Schnittfläche fertigten wir Tupfpräparate an. Die eine Hälfte des Lymphknotens wurde nach den üblichen Methoden in Paraffin eingebettet und histologisch im Hämatoxylin-Eosin-, Giemsa- und Bielschowsky-Gomori-Präparat untersucht. Die andere Hälfte wurde mit dem Rasiermesser in 2–3 mm dicke Scheiben zerschnitten und nicht länger als 16 Std in der von FISHMAN und BAKER angegebenen Chloralhydrat-Formalinlösung (0,1% Chloralhydrat in 8%iger neutraler Formalinlösung) bei +4° C fixiert. Diese Fixierung bietet gegenüber anderen Methoden, besonders gegenüber der Acetonfixierung, den Vorteil guter Strukturhaltung und führt auch nach länger dauernder Fixationszeit zu keiner nachweisbaren Aktivitätsverminderung verschiedener hydrolytischer Enzyme (Einzelheiten siehe bei BAKER und FISHMAN sowie LÖFFLER). Nach Wässerung wurden die etwa 10  $\mu$  dicken Gefrierschnitte auf saubere Objektträger aufgezogen und luftgetrocknet.

**Nachweis der alkalischen Phosphatase im Schnittpräparat.** Zum Nachweis der alkalischen Phosphatase bedienten wir uns verschiedener Modifikationen der Azofarbstoffkupplungsmethode (GOMORI 1951, GROGG und PEARSE, GÖSSNER 1958). Bei diesen Methoden wird das von GOMORI (1951) eingeführte  $\alpha$ -Naphthylphosphat als Substrat verwendet. GOMORI (1951) benutzte Boraxlösung zur Einstellung des pH und setzte den Aktivator  $MgCl_2$  zu. Die übrigen Autoren verwenden Veronalacetat- bzw. Veronal-HCl-Puffer und fügen keinen Aktivator zu.

Als Diazoniumsalze haben sich uns am besten konz. Echtblausalz BB (Diazoniumchlorid-Chlorzinkdoppelsalz des 4-Amino, 2,5-diäthoxy-benzanilid) sowie Echtrotsalz TR (Chlorzink-

doppelsalz des 5-Chlor-o-toluidin) bewährt. Echtrotsalz TR liefert den besten farbigen Kontrast zur Hämalaunfärbung (rotbraunes Reaktionsprodukt), zeichnet sich durch fast völliges Fehlen von Untergrundfärbung und nur geringe Zersetzung in der Inkubationslösung aus; mit Echtblausalz BB (konz.) erreicht man die schärfste Lokalisation im Schnitt. Von den verschiedenen *Inkubationslösungen* scheint uns die folgende, von GÖSSNER (1958) empfohlene Lösung am besten geeignet:

10 mg saures Na- $\alpha$ -Naphthylphosphat  
 40 cm<sup>3</sup> Veronal-HCl-Puffer, p<sub>H</sub> 9,2—9,4  
 80 mg Echtblausalz BB oder Echtrotsalz TR

Die zur Verfügung stehenden Schnitte wurden maximal 60 min inkubiert, da längere Inkubationszeiten zu keiner Darstellung vorher inaktiver Strukturen führten. Außerdem wurden einzelne Schnitte 10, 30 und 50 min in das Inkubationsmedium eingestellt. Damit erreichten wir eine scharfe Darstellung der stark positiven Elemente, konnten die schwach reagierenden Strukturen erfassen und hatten die Möglichkeit, einigermaßen quantitative Aussagen über die Aktivitätsstärke machen zu können. Ein ähnliches Verfahren hat TONNA für die Gomori-Methode zum Nachweis der alkalischen und sauren Phosphatase empfohlen.

Zur weiteren Absicherung unserer Ergebnisse untersuchten wir zusammen mit H. RINNEBERG in einigen Fällen die Schnitte mit der Ca-Co-Methode GOMORIS. Dabei ergab sich — bei gleicher Vorbehandlung des Materials — eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die mit der Azofarbstoffmethode erzielt worden waren.

Außerdem wurden die üblichen *Kontrollen* (Hitzeinaktivierung, Weglassen des Substrates) durchgeführt.

Nach der Inkubation wurden die Schnitte in fließendem Wasser gespült, 5 min in MAYERS Hämalaun gefärbt, gewässert und schließlich mit Gelatinol eingedeckt.

**Nachweis der alkalischen Phosphatase im Ausstrich.** Die luftgetrockneten Ausstrichpräparate wurden wenige Stunden nach dem Abtupfen 30 sec lang in der gleichen Lösung wie die Schnitte fixiert oder 30 sec in der von KAPLOW angegebenen Methanol-Formalin-Lösung (absol. Methanol 90%, neutrales Formalin 10%) fixiert. Die Phosphataseaktivität ist nach Anwendung beider Fixierungsarten etwa gleich, hinsichtlich Strukturhaltung ist die Kaplow-Technik besser. Bei der Auswertung unserer Tupfpräparate haben wir deshalb den hiermit fixierten Ausstrichen den Vorzug gegeben.

Nach der Fixierung wurden die Präparate in fließendem Leitungswasser abgespült und erneut luftgetrocknet. Anschließend inkubierten wir 60 min lang in dem oben angegebenen Medium bei Zimmertemperatur. Nach kurzem Wässern wurden die Ausstriche 5 min in Hämalaun gefärbt, erneut gewässert und in Gelatinol eingedeckt. Die fertigen Präparate wurden mit der Ölimmersion betrachtet und cytologisch ausgewertet. Da alkalische Phosphatase in Lymphocyten nicht nachweisbar war, beschränkten wir uns auf die nichtlymphocytären Elemente des Lymphknotens und stellten in jedem Präparat fest, welche Formen unter 200 gezählten Zellen positiv reagierten. Außerdem schätzten wir die Stärke der Reaktion jeweils ab.

Tabelle 1. *Untersuchungsgut*

Diagnose	Zahl der Fälle
„Unspezifische Lymphadenitis“ . . . . .	31 (8)
Piringersehe Lymphadenitis . . . . .	3 (1)
Reticulocytäre abscedierende Lymphadenitis . . . . .	3 (0)
Lues II. . . . .	1 (0)
Tuberkulose . . . . .	6 (1)
Sarkoidose . . . . .	5 (2)
Paramyloidose . . . . .	1 (1)
M. Whipple . . . . .	1 (1)
Lymphogranulomatose . . . . .	11 (5)
Lymphosarkom und Leukosarkomatose . . . . .	6 (2)
Maligne Retikulose und Retikulosarkom . . . . .	4 (2)
M. Brill-Symmers . . . . .	1 (0)
Carcinommetastase . . . . .	2 (0)
Insgesamt	75 (23)

NB. Die Zahlen in Klammer geben die Zahl der Fälle an, von denen Tupfpräparate ausgezählt wurden. Mit dem Begriff „unspezifische Lymphadenitis“ sind alle jenen Lymphknotenveränderungen belegt, die auch als „chronische Lymphadenitis“ oder „reaktive Hyperplasie“ bezeichnet werden.

Als Grundlage der Zelldifferenzierung diene eine Klassifizierung, die sich seit einigen Jahren bei unseren Ausstrichbeurteilungen bewährt hat, und über die an anderer Stelle ausführlich berichtet wird (LENNERT 1961). Wir unterscheiden Germinoblasten (LENNERT 1957), basophile Stammzellen, die Plasmazellreihe, kleine und große Reticulumzellen, Epitheloidzellen, Kerntrümmerphagen, Gewebsmastzellen, neutrophile, eosinophile und basophile Granulocyten sowie eine Sammelgruppe von Zellen, die wir kurz als reticuläre Reizzellen zusammenfassen. Diese kommen in großen, mittleren und kleinen Formen vor. Die großen Reizzellen entsprechen zum überwiegenden Teil den basophilen Stammzellen des Schnittes, die mittleren Reizzellen sind zum Teil als Lymphoblasten, zum Teil wohl auch als histiocytäre Elemente anzusehen. Die kleinen Reizzellen stellen u. a. wohl lymphoide Reticulumzellen dar.

Es ist zwar zunächst nicht ganz einfach, in dem nur mit Hämalalaun gefärbten Präparat eine sichere Klassifizierung durchzuführen, doch gelingt es unter Berücksichtigung eines parallel gefärbten Pappenheim-Ausstriches in der Regel, die einzelnen Formen in das gegebene Schema einzuordnen.

Es stellte sich bald heraus, daß die Zellen, die wir nach den üblichen Kriterien als große Reticulumzellen einstufen, uneinheitlich sind und keinesfalls sämtlich die Bezeichnung „Reticulumzellen“ verdienen. Wir haben sie dessen ungeachtet in den Adenogrammen als Reticulumzellen aufgeführt und werden sie im Text näher analysieren. Die wenigen nicht differenzierbaren Zellen wurden nicht mitgezählt.

## Ergebnisse

**1. Die alkalische Phosphatase im Lymphknotenschnitt.** In *normalen und hyperplastischen Lymphknoten* („*unspezifische Lymphadenitis*“, „*chronische Lymphadenitis*“) reagieren die Blutgefäße, speziell die Blutcapillaren, am stärksten, so daß man — ähnlich wie in Injektionspräparaten — einen ausgezeichneten Eindruck von Gefäßgehalt und -architektur gewinnt (Abb. 1). Die Färbung der Capillaren war bereits nach 10 min dauernder Inkubation deutlich ausgeprägt und nahm bei 1 stündiger Inkubation nur relativ wenig zu. Zur Darstellung aller übrigen positiven Lymphknotenstrukturen war meist eine längere Inkubationszeit erforderlich.

Außer den Capillaren stellten sich auch die Arteriolen und gelegentlich ein Teil der Venolen (s. auch LÖFFLER) in gleicher oder wenig verminderter Farbintensität dar. Ob in den kleinen oder kleinsten Blutgefäßen außer dem Cytoplasma der Endothelien auch die Basalmembran positiv reagierte, ließ sich nicht sicher beurteilen. Die größeren Gefäße und die Lymphgefäße des Hilusbereiches zeigten ein wechselndes Bild. Ihr Endothel war oft gering bis mäßig stark gefärbt; ein Teil der Gefäße oder auch nur ein Teil der Endothelien eines Gefäßes blieben jedoch negativ.

Die Sinus zeigten immer eine negative Reaktion der Endothelien. Nur die neutrophilen Granulocyten, die manchmal hier lagen, ergaben mäßig starke Farbstoffniederschläge. Die Gewebsmastzellen blieben stets ungefärbt, desgleichen die eosinophilen Granulocyten.

Die Pulpa war weithin negativ, allein um die Sinus — speziell unter den Randsinus — und um die Sekundärknötchen herum sahen wir manchmal eine kräftige Anfärbung. Diese Reaktion schien die Fasern zu umschneiden; sie zeigte keine gesetzmäßige Beziehung zur Gefäßarchitektur. Manchmal konnte man in der Pulpa wenige einzeln liegende Zellen mit deutlicher Phosphatasereaktion ihres Plasmas beobachten. Möglicherweise handelte es sich hierbei um große Reticulumzellen.

Die Follikel waren stets phosphatasenegativ. Dies gilt für die Zellen der Primärknötchen ebenso wie für die der Sekundärknötchen mit ihren Keimzentren und dem dunklen Lymphocytenwall. Dagegen fand sich in den Lymphknoten, die Sekundärknötchen enthielten, eine verschieden starke Aktivität an Fasern in der Umgebung der Follikel. Diese schien dem Grad der Follikelhyperplasie parallel zu laufen und war bei starker Follikelhyperplasie so kräftig ausgeprägt, daß sich die negativen Sekundärknötchen, in denen nur Gefäße eine Reaktion zeigten, schon makro-

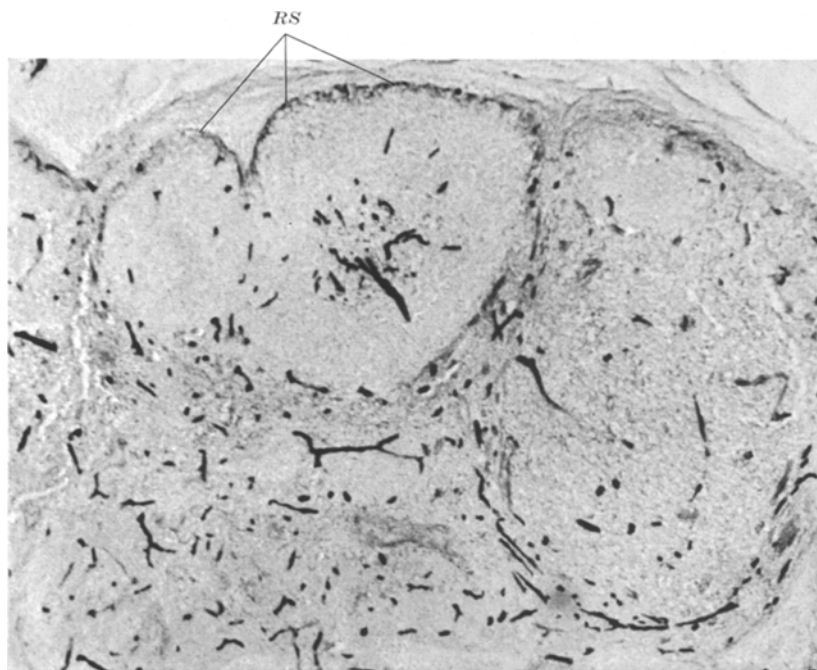


Abb. 1. Alkalische Phosphatase in einem hyperplastischen Lymphknoten. Übersicht. Die Gefäßverteilung tritt deutlich hervor. Unter dem Randsinus (RS) deutliche Phosphataseaktivität. Etwa 50  $\times$  vergr.

skopisch scharf von dem umgebenden positiven Netzwerk abhoben (Abb. 2). In einem Fall von hochgradiger Follikelhyperplasie bei chronischer Polyarthrits grenzten an die Sekundärknötchen erweiterte Sinus an, so daß nur ein schmaler Streifen lymphatischen Parenchyms verblieb, in dem die „Faserreaktion“ nachweisbar war.

Die Lymphknotenkapsel und -trabekel ergaben meist eine völlig negative Phosphatasereaktion, d.h. Fibrocyten und Bindegewebsfasern waren ungefärbt. Manchmal aber enthielten Kapsel und Trabekel etliche große langgestreckte oder geschwänzte Zellen mit deutlicher Reaktion ihres Plasmas. Es dürfte sich hierbei um Fibroblasten gehandelt haben.

In einem Leistenlymphknoten bei M. WHIPPLE waren außer den Gefäßen nur einige perisinuöse Pulpaabschnitte phosphatase-aktiv.

Ein Lymphknoten mit *Paramyloidose* zeigte ebenfalls nur eine starke Reaktion der Gefäße. Das Amyloid färbte sich mit dem Echtrotsalz TR intensiv

citronengelb. Auch das Hyalin verschiedener Lymphknoten nahm einen gelblichen Farbton an; es war im übrigen ebenfalls phosphatase-negativ.

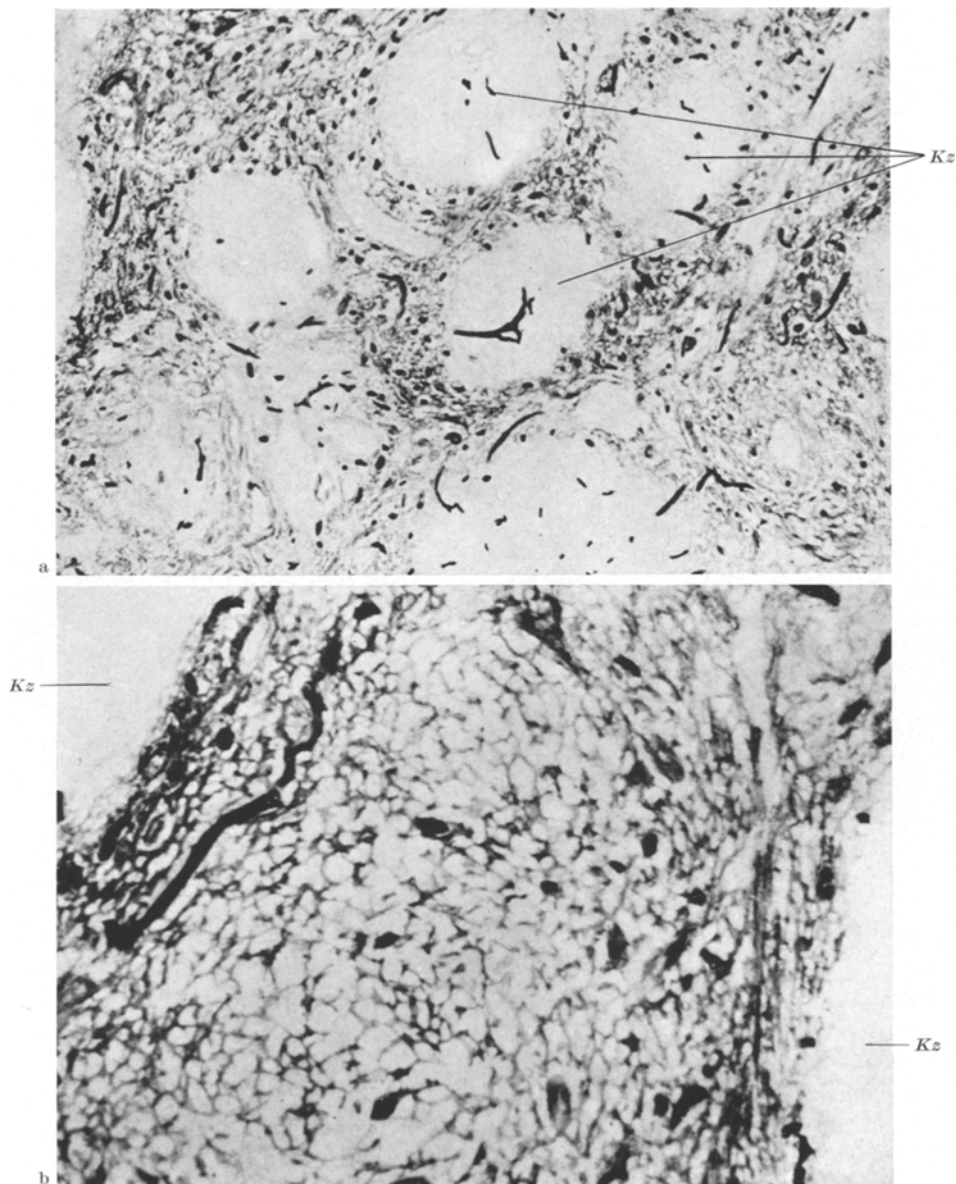


Abb. 2a u. b. Alkalische Phosphatase in der Umgebung von Keimzentren (Kz) bei folliculärer lymphatischer Hyperplasie. a etwa 50  $\times$ , b positive „Faserreaktion“ zwischen 2 Keimzentren (Kz) etwa 125  $\times$  vergr.

Drei Lymphknoten, die als *reticulocytäre abscedierende Lymphadenitis* (Katzenkratzkrankheit?) diagnostiziert wurden, enthielten stellenweise auffallend reich-

lich und kräftig gefärbte Strukturen, die als neugebildetes Granulationsgewebe mit zahlreichen Capillaren und Fibroblasten aufzufassen waren. Einige faserfreie Epitheloidzellherde innerhalb von Sekundärknötchen waren vollständig phosphatase-negativ. In der Umgebung von Sekundärfollikeln war auch hier eine „Faserreaktion“ nachweisbar.

Bei einem Fall, der histo- und serologisch als *Lues II* diagnostiziert wurde, bestand eine sehr stark ausgeprägte Follikelhyperplasie. Das sehr schmale interfolliculäre Gewebe ließ — analog zu den oben mitgeteilten Befunden — eine Aktivität, die Fasern angelagert erschien, erkennen. Die Gefäße reagierten wie bei „unspezifischer Lymphadenitis“. In der verdickten Kapsel lagen einige Riesenzellen vom Langhansstyp; sie zeigten keine alkalische Phosphataseaktivität.

Drei Lymphknoten, bei denen die Diagnose *Piringersche Lymphadenitis* gestellt wurde, ließen ebenfalls zwischen den vergrößerten Sekundärknötchen eine deutliche „Faserreaktion“ nachweisen. Außerdem fand sich eine starke Aktivität am Rande von Sinus, in denen eine ausgeprägte unreife *Sinushistiocytose* (LENNERT 1958) vorhanden war und die zwischen vergrößerten Sekundärfollikeln lagen. Kleine Epitheloidzellherde in phosphatase-negativen Keimzentren schienen häufig phosphatase-aktiven Capillaren anzuliegen.

In 5 Fällen von *Sarkoidose* und 1 Fall von *epitheloidzelliger-Tuberkulose* sahen wir ähnliche Bilder wie GÖSSNER (1955, 1958): In der Umgebung der Tuberkel fand sich eine positive Phosphatasereaktion, die sich gelegentlich etwas auf die äußersten Zonen der Tuberkel ausdehnte. Diese positiven Bezirke entsprechen im Bielschowsky-Präparat Gebieten von hohem Fasergehalt (Abb. 3a u. b). Die Reaktion war zum Teil diffus über Zellen und Fasern ausgebreitet, zum Teil erschienen die Fasern und das Plasma der „Fibroblasten“ von Farbstoffgranula imprägniert. Die faserarmen bis faserfreien inneren Bezirke der Tuberkel blieben stets ohne Reaktion. Auch Langhansche Riesenzellen und Verkäsungsbezirke waren phosphatase-negativ. Der Grad der Phosphatasereaktion schwankte in den verschiedenen Lymphknoten erheblich.

In den Tuberkeln waren im allgemeinen keine enzymaktiven Gefäße nachweisbar. Nur gelegentlich sahen wir im Inneren größerer Tuberkel eine Capillare, die sich jedoch in der Regel als Gefäß des lymphatischen Restgewebes ausweisen ließ, das von dem tuberkulösen Granulationsgewebe umwachsen wurde; sie war nämlich meistens von einigen Zellen der Lymphknotenpulpa, vorwiegend Lymphocyten, umgeben.

Die übrigen Lymphknotenstrukturen verhielten sich wie bei unspezifischer Lymphadenitis.

Bei den von uns untersuchten 5 Fällen von *verkäsender Lymphknotentuberkulose* fiel besonders die starke alkalische Phosphataseaktivität in der Käserandzone, peripher von den „dürren Epitheloidzellen“, ins Auge. Diese Reaktion war z. T. durch Capillaren, z. T. durch Fibroblasten und Fasern bedingt. Zwischen und vor den „dürren Epitheloidzellen“ der Käserandzone fanden wir phosphataseaktive Zellen, die morphologisch nicht von Epitheloidzellen zu unterscheiden waren. Im Restparenchym war häufig eine starke Gefäß- und Faserreaktion nachweisbar; die Umgebung einzelner epitheloidzelliger Tuberkel verhielt sich wie bei Sarkoidose oder epitheloidzelliger Tuberkulose.

Im Schnitt wurden 10 Fälle von *Lymphogranulomatose* untersucht. Die Lymphknoten zeigten verschiedene Entwicklungsphasen der Erkrankung: ein Lymph-

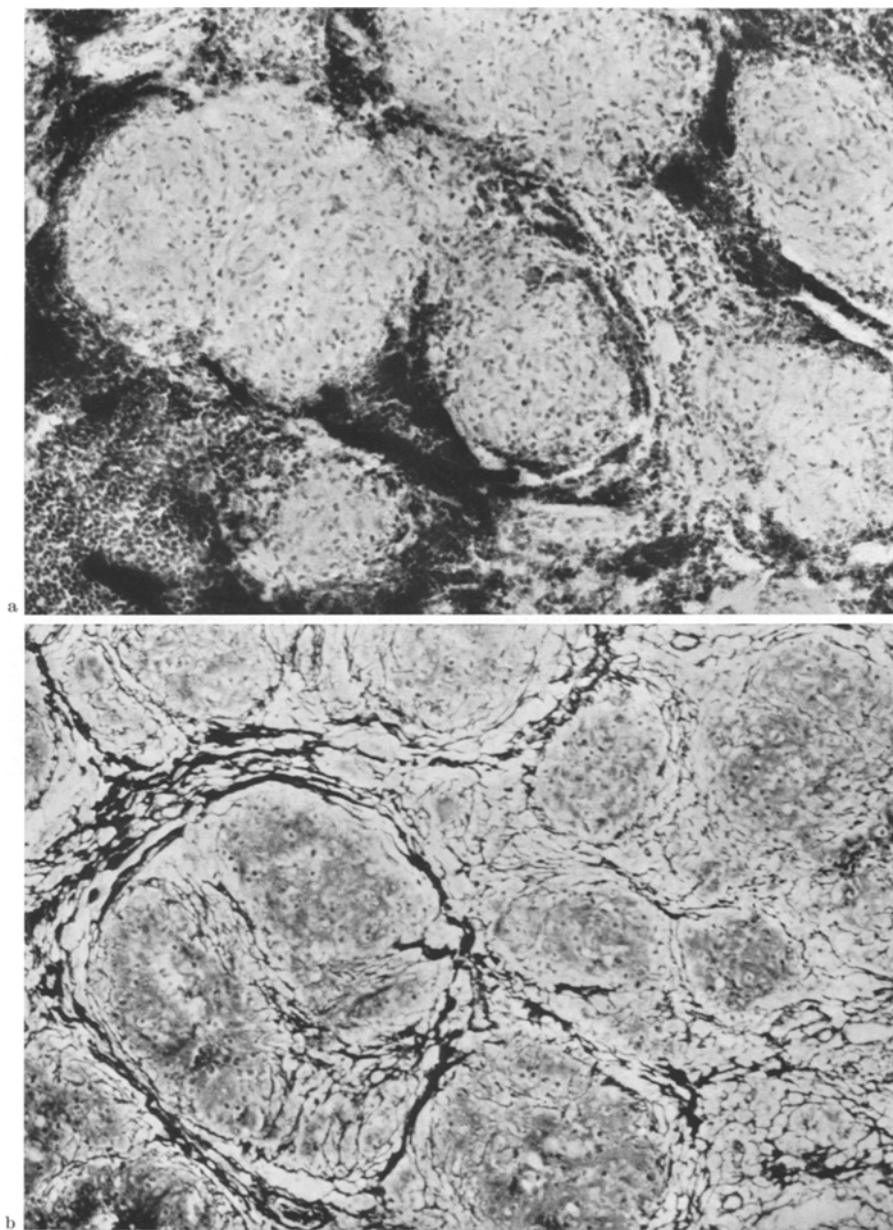


Abb. 3 a u. b. Lymphknoten bei Sarkoidose (M. BESNIER-BOECK-SCHAUMANN). a Alkalische Phosphatase. Nur die Randzone und Umgebung der Tuberkel sind positiv. b Entsprechendes Präparat bei Faserdarstellung nach BIELSCHOWSKY-GOMORI, je  $125 \times$  vergr.

knoten war ganz frisch befallen, die übrigen waren mehr oder weniger stark mit fibrösem Narbengewebe durchsetzt. Die alkalische Phosphataseaktivität entsprach



den histologischen Stadien der Erkrankung insofern, als bei frischem Befall nur die Gefäßendothelien des Lymphknotengewebes dargestellt waren, während bei fortschreitender Vernarbung an den Orten der Bindegewebsneubildung eine erhebliche Phosphataseaktivität bestand. Alte Vernarbungsbezirke zeigten nur geringe Aktivität. Bei einem Fall war nur in einem Abschnitt des Lymphknotens eine Faservermehrung nachweisbar, der eine hochgradige Phosphatasereaktion entsprach, während der übrige Anteil des Lymphknotens nur positive Gefäße zeigte.

Die starke Phosphatasereaktion lymphogranulomatöser Lymphknoten ist also an die Vernarbungsbezirke des M. Hodgkin geknüpft. Sie ist am stärksten an der Grenze zwischen floridem und fibrosiertem Lymphogranulomgewebe (Abb. 4a u. b). Sie betrifft hier Fibroblasten und Fasern gleichermaßen.

Auffällig war bei allen Lymphogranulomfällen die starke Aktivität neutrophiler Granulocyten, während in den Eosinophilen kein Reaktionsprodukt nachweisbar war. Sternbergsche Riesenzellen und Hodgkinzellen waren phosphatase-negativ.

Die untersuchten *malignen Lymphknotenerkrankungen* umfaßten ein großfollikuläres Lymphoblastom (M. Brill-Symmers), 3 Lymphosarkome (davon 4 Lymphknoten untersucht), 2 Leukosarkomatosen, 1 maligne Reticulose, 3 Reticulosarkome und 2 Carcinommetastasen.

Bei dem *großfollikulären Lymphoblastom* trat die Knötchenstruktur im Phosphatasepräparat besonders deutlich hervor. Die negativen Follikel wurden von diffus angefärbtem Gewebe umsäumt. Die zahlreichen Capillaren in der Follikelumgebung verstärkten weiter den knötchenförmigen Eindruck.

Ein interessantes Verhalten ließen die *Lymphosarkomfälle* erkennen. Bei 2 Lymphknoten, die im Abstand von mehreren Wochen von demselben Patienten exstirpiert worden waren, zeigte ein Teil der Sarkomzellen — vorwiegend die größeren Formen — eine deutliche Phosphatasereaktion (Abb. 5). Daneben war Enzymaktivität nur in Gefäßen nachweisbar. Bei einem weiteren Fall waren die Sarkomzellen schwach angefärbt und bei einem 3. Fall waren die Sarkomzellen negativ. Neben den positiven Gefäßen waren vereinzelt enzymaktive Reticulumzellen eingestreut. Der Befund, daß Zellen des Lymphosarkoms Phosphataseaktivität zeigen, ist um so bemerkenswerter, als normale Lymphocyten niemals positiv reagierten.

Bei den Fällen von *Reticulosarkom* und *Leukosarkomatose* blieben die Tumorzellen stets ungefärbt. Die Zerstörung der Lymphknotenstruktur wurde aber nach dem Gefäßbild augenfällig.

Ein Lymphknoten, bei dem eine *maligne Reticulose* diagnostiziert worden war, ließ neben positiven Gefäßen eine Faserreaktion erkennen, die regellos den ganzen Schnitt durchsetzte. Histologisch konnte in diesem Fall das Initialbild einer Lymphogranulomatose nicht sicher ausgeschlossen werden. Auch das Verhalten der alkalischen Phosphatase entsprach eher dem der Lymphogranulomatose als des Reticulosarkoms.

In den *Metastasen zweier solider Carcinome* zeigten nur die Gefäße Phosphataseaktivität.

**2. Die alkalische Phosphatase im Lymphknotenausstrich.** (Tabelle 2.) Alkalische Phosphatase konnte im Cytoplasma von neutrophilen Granulocyten, in

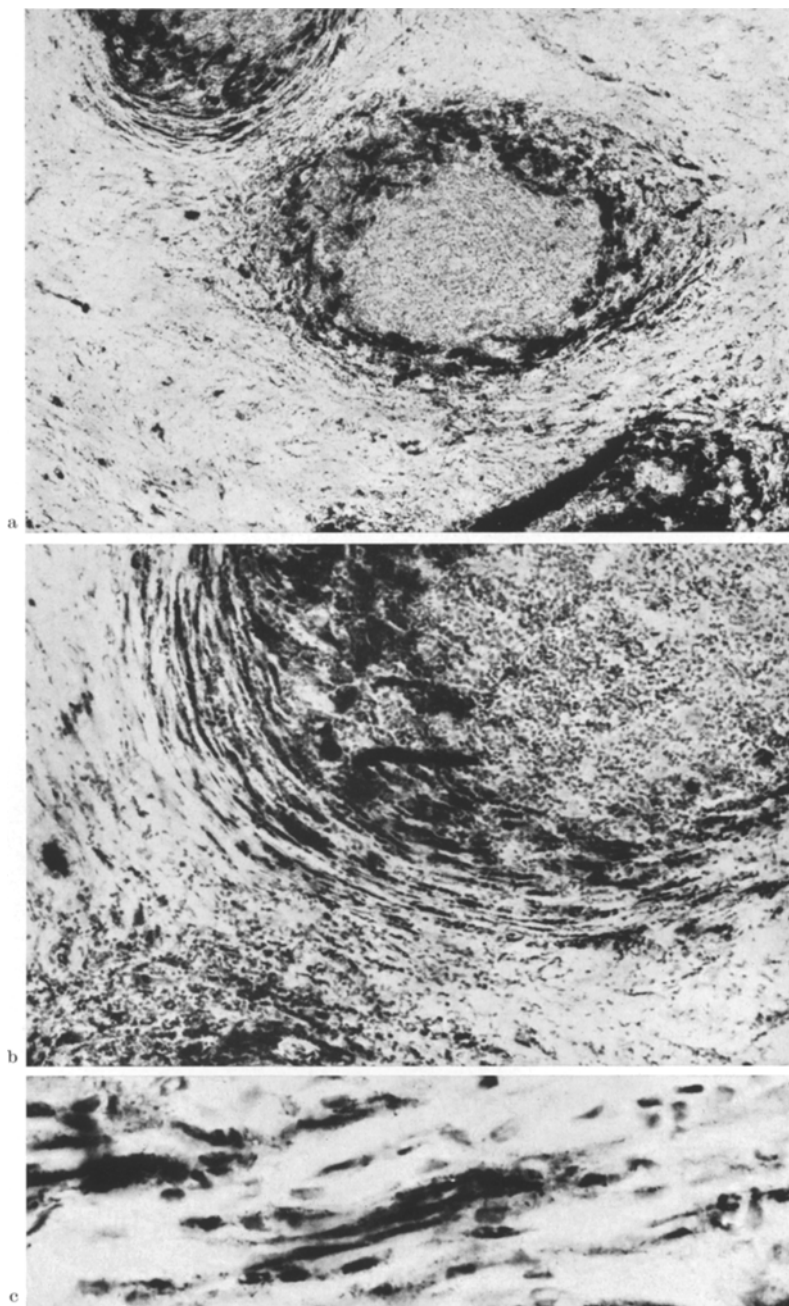


Abb. 4a—c. Alkalische Phosphatase bei stark vernarbter Lymphogranulomatose. Starke Aktivität in Fibroblasten und Capillaren am Übergang von floridem zu vernarbtem Granulationsgewebe. a 50  $\times$ , b 125  $\times$ , c 500  $\times$  vergr.

„kleinen“ und „großen Reticulumzellen“ und in abgetupften Capillaren nachgewiesen werden. Außerdem zeigte ein Teil der abgetupften Lymphosarkomzellen eine positive Reaktion.

Die Plasmazellen und deren Vorstufen, die reticulären Reizzellen, Kerntrümmerphagen, Histiocyten, Epitheloidzellen, eosinophilen Granulocyten, Gewebsmastzellen, Hodgkinzellen, Sternbergschen Riesenzellen und Reticulosarkomzellen waren negativ.

Der Prozentsatz phosphatase-positiver neutrophiler Granulocyten im Lymphknotenausstrich ist bei der „unspezifischen Lymphadenitis“ im Vergleich zu den von verschiedenen Autoren mitgeteilten Normalwerten des peripheren Blutes

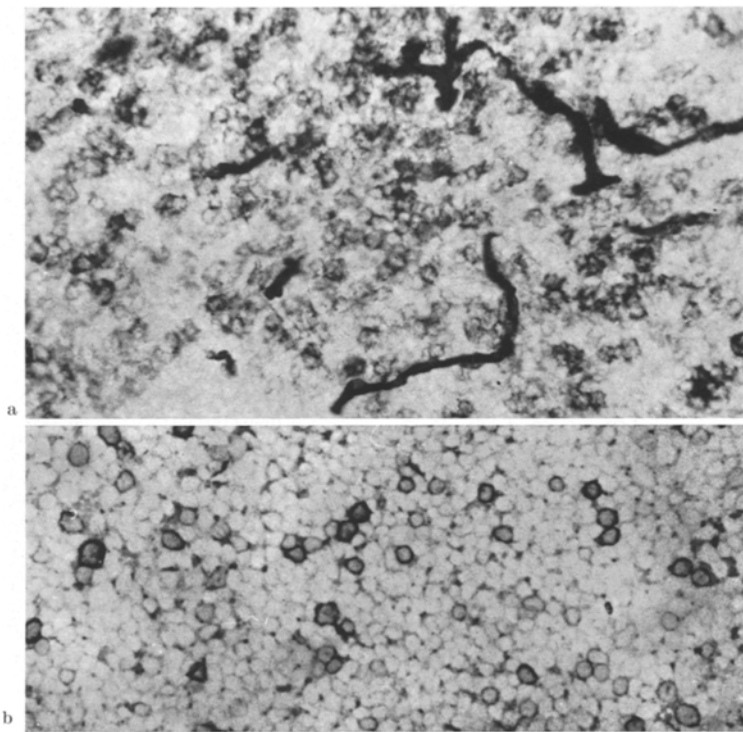


Abb. 5 a u. b. Alkalische Phosphatase bei Lymphosarkom. a Schnitt, b Ausstrich; je etwa 250  $\times$  vergr.

leicht erhöht. Er beträgt im Durchschnitt 47,2%. Auffallend ist die starke Phosphatasereaktion bei der Lymphogranulomatose: 92,7% der Neutrophilen zeigen eine meist kräftige Reaktion. Bei den übrigen Lymphknotenerkrankungen ist die Zahl der ausgezählten Neutrophilen zu klein, um Aussagen machen zu können.

Die als „kleine Reticulumzellen“ (Abb. 6a) angesprochenen Elemente besaßen kleine rundliche Kerne mit relativ kräftiger Membran und klumpigem Chromatin. Das Plasma war meistens mäßig breit und unscharf begrenzt. Die Phosphatasereaktion erschien im allgemeinen nur gering bis mäßig stark. Über die Natur dieser Zellen sind wir noch nicht im klaren, da wir die entsprechenden Elemente im Schnitt nicht identifizieren konnten. Am ehesten handelt es sich um kleine lymphoide Reticulumzellen im Sinne von ROHR.

Der hohe Prozentsatz (100%) an positiven „kleinen Reticulumzellen“ rührt daher, daß diese Zellen von den Lymphocyten im Hämalaun-gefärbten Präparat

kaum unterschieden werden können und daher zu den Lymphocyten gezählt werden, wenn das Plasma nicht phosphatase-aktiv ist.

Die „großen Reticulumzellen“ stellen eine heterogene Gruppe von Zellen dar: Zunächst ist eine meist stark positive, manchmal in kleinen Gruppen zusammen-

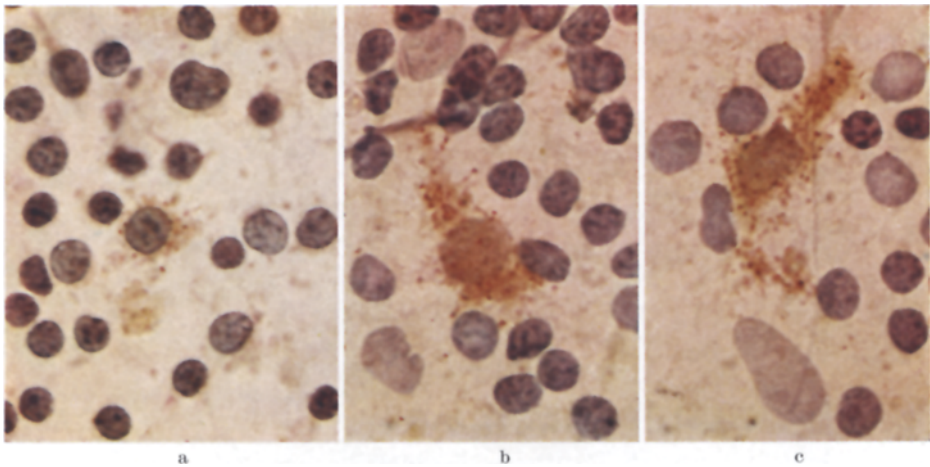


Abb. 6 a—c. „Kleine lymphoide Reticulumzelle“ (a) und 2 „große Reticulumzellen“ (b, c) mit positiver Reaktion im Plasma. Sarkoidose, etwa 1000  $\times$  vergr.

Tabelle 2. *Alkalische Phosphatase im Lymphknotenausstrich bei „unspezifischer Lymphadenitis“, diversen Lymphadenitiden und Lymphogranulomatose*

Zellart	Unspezifische Lymphadenitis			Diverse Lymphadenitiden			Lymphogranulomatose		
	ge- zählte Zellen	davon positiv	posi- tive Zellen %	ge- zählte Zellen	davon positiv	posi- tive Zellen %	ge- zählte Zellen	davon positiv	posi- tive Zellen %
Basophile Stammzellen	15	—	—	5	—	—	—	—	—
Germinoblasten . . . .	347	—	—	21	—	—	—	—	—
Plasmazellreihe . . . .	57	—	—	28	—	—	31	—	—
Reticuläre Reizzellen .	265	—	—	67	—	—	88	—	—
Histiocyten . . . . .	292	—	—	137	—	—	63	—	—
Große Reticulumzellen	347	40	11,5	592	75	12,7	263	71	27,0
Kleine Reticulumzellen .	12	12	100	3	3	100	4	4	100
Epitheloidzellen . . . .	27	—	—	144	—	—	18	—	—
Kerntrümmerphagen .	43	—	—	13	—	—	—	—	—
Neutrophile . . . . .	180	85	47,2	178	48	26,9	259	240	92,7
Eosinophile . . . . .	13	—	—	10	—	—	138	—	—
Gewebsmastzellen . . .	2	—	—	2	—	—	—	—	—
Hodgkinzellen . . . . .	—	—	—	—	—	—	105	—	—
Sternbergsche Riesen- zellen . . . . .	—	—	—	—	—	—	10	—	—

liegende Zellart zu nennen, deren Plasma breit und oft geschwänzt ist und den länglich-ovalen Kern meist weitgehend verdeckt (Abb. 6 b u. c). Es dürften hierbei echte Gefäßendothelien vorliegen. Abgetupfte Capillaren und Capillarstücke sind auch im Ausstrich leicht zu erkennen (Abb. 7). Wir fanden fast in allen untersuchten Ausstrichen Teile phosphatase-positiver Capillaren.

Sodann sieht man Zellen mit schwacher bis mäßig starker Reaktion des Plasmas und mit vielgestaltigem mittelgroßem bis großem Kern. Dieser besitzt oft eine

kräftige Kernmembran und ein relativ grobes Chromatin. Seine Form ist unregelmäßig eckig bis oval, die größeren Kerne erscheinen plumpoval. Nukleolen sind in der Regel nicht zu erkennen. Das Plasma ist mäßig breit bis breit und oft geschwänzt. Einmal beobachteten wir eine zweikernige Zelle dieser Art mit positiver Reaktion. Die Identifizierung dieser Zellen ist schwierig. Wir glauben, daß es sich in der Hauptsache um Fibroblasten bzw. Reticulumzellen handelt, die sich zu Fibroblasten weiterentwickelt haben, wir können aber nicht ausschließen, daß sich auch abgelöste Gefäßendothelien darunter befinden.

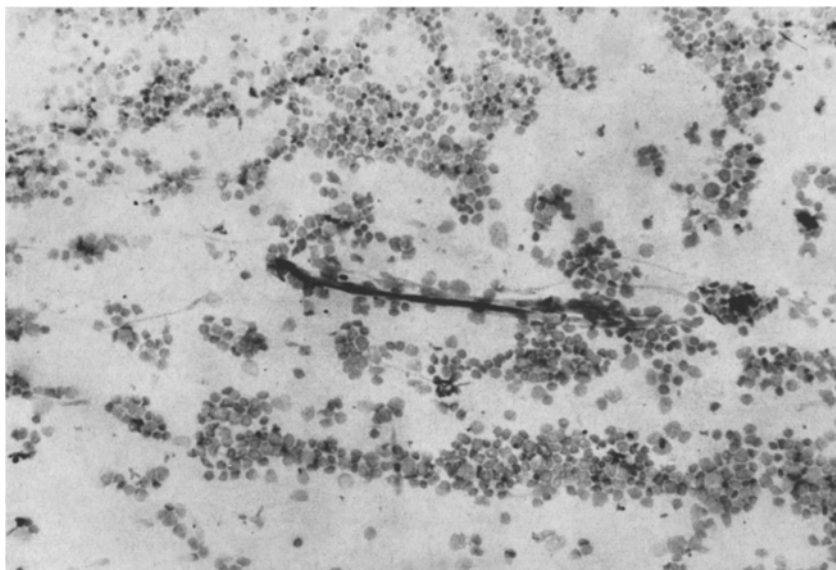


Abb. 7. Stark positive Capillare im Lymphknotentupfpräparat. Lucs II, 125  $\times$  vergr.

Zählt man die als „große Reticulumzellen“ zusammengefaßten Elemente aus, so findet man insgesamt 16,2% positive Zellen. Die Menge der phosphataseaktiven „Reticulumzellen“ zeigt bei den einzelnen Krankheiten deutliche Unterschiede. Bei der „unspezifischen Lymphadenitis“ ergibt sich ein Durchschnittswert von 11,5% enzymaktiver Zellen. Dieser Wert liegt bei der Lymphogranulomatose mit 27% positiver Zellen mehr als doppelt so hoch.

Bei den übrigen Lymphknotenreaktionen ist die Zahl der untersuchten Fälle zu klein, um verbindliche Aussagen machen zu können. Immerhin zeigt auch die Sarkoidose einen Durchschnittswert von 15,1% positiver „Reticulumzellen“. Diese Zahl ist sicher zu niedrig, da offensichtlich im cytochemischen Präparat ein Teil der abgetupften Epitheloidzellen nicht erkannt und als „Reticulumzellen“ eingestuft wurde.

Zwei der vier untersuchten Lymphosarkom-Fälle, die im Schnitt eine positive Phosphatasereaktion in einem Teil der Zellen zeigten, konnten wir auch im Ausstrich untersuchen. Wir fanden dabei, daß 9,8% der Sarkomzellen alkalische Phosphataseaktivität aufwiesen. Bei den positiven Zellen handelte es sich in der Mehrzahl um solche mit größeren, z.T. ovalen Kernen, die in der Literatur vielfach als „Lymphoblasten“ oder „Lymphosarkomzellen“ bezeichnet werden (Abb. 5b).

### Diskussion

Was bedeuten die vorliegenden Ergebnisse für die Histologie des normalen und pathologisch veränderten Lymphknotens und für die Lymphknotencytologie?

*Histologisch* war eine Phosphataseaktivität in Gefäßendothelien, an Orten stärkerer Faserbildung, an Fasern in der Umgebung von Sekundärknötchen und Sinus, sowie in einzelnen Reticulumzellen der Pulpa nachweisbar. Lymphfollikel und Sinus blieben stets phosphatase-negativ.

Die stärkste Reaktion zeigte das *Endothel* der Capillaren und Arteriolen, schwächer reagierte ein Teil der Venolen, wogegen die Sinus-, Endothelien“ niemals alkalische Phosphataseaktivität erkennen ließen. Dies unterstreicht erneut die lange behauptete und auf verschiedene Weise erhärtete Feststellung (FRESEN, Lit.), daß Sinusendothel und Gefäßendothel funktionell verschiedenen Zellsystemen angehören. GÖSSNER (1958) vermutet, daß die *alkalische Phosphatase beim aktiven Transport durch Grenzflächen große Bedeutung habe* und daß damit die starke Phosphataseaktivität der Capillaren erklärbar sei (s. a. BRACHET). Damit wäre die geringere und nur unregelmäßig vorhandene Reaktion der Endothelien von Lymphgefäßen und größeren Blutgefäßen (s. a. HORT und HORT) ebenfalls verständlich zu machen.

Wenn wir die Ergebnisse bei unspezifischer Lymphadenitis, Tuberkulose und Lymphogranulomatose vergleichen, so wird das Vorkommen von alkalischer Phosphatase in *faserreichen Bezirken* evident: Schon in Kapsel und Trabekeln der hyperplastischen Lymphknoten kommen oft einige phosphatase-positive Fibroblasten vor. In den Randzonen der Tuberkel, die immer eine lebhaft Faserbildung zeigen, und in den Randzonen der Verkäsung ist stets eine deutliche, oft eine starke Phosphataseaktivität nachweisbar. Endlich sieht man bei vernarbender Lymphogranulomatose eine erhebliche alkalische Phosphatasereaktion, die teils im Cytoplasma von Fibroblasten, teils an Fasern lokalisiert zu sein scheint. Die Reaktion ist am stärksten in den Randgebieten von noch floriden Lymphogranulomherden, wo die Vernarbung des zellreichen Gewebes eben einsetzt.

Alle diese Befunde deuten darauf hin, daß die alkalische Phosphatase eine Beziehung zu den Faserbildungszellen und den Fasern hat. Welcher Art diese Beziehung ist, wurde in zahlreichen experimentellen Arbeiten der Literatur verschieden beantwortet (BRADFIELD; JEENER; ROBERTSON u. Mitarb.; GOMORI 1954; HUSEBY und THOMAS; GOLD und GOULD; VORBRÖDT; DANIELLI u. Mitarb.; WASSERMANN). VORBRÖDT nimmt an, daß die alkalische Phosphatase bei der Reifung von Präkollagen zu Kollagen beteiligt ist. Auch BRADFIELD vermutet, daß die Synthese gewisser Faserproteine an eine starke Phosphataseaktivität geknüpft ist. Nach GROSS sollen junge Kollagenfasern das Enzym stark adsorbieren und festhalten. In den neueren Arbeiten wird immer wieder die Frage aufgeworfen, ob die alkalische Phosphatase zur Faserbildung selbst erforderlich ist oder ob sie aus anderen, noch unbekannten Gründen an Orten der Fibrillogenese auftritt. Sicher sind die widersprüchlichen Ansichten über diese Frage zum Teil Folge unzureichender Untersuchungstechnik. Eine Überprüfung der bisherigen Tierexperimente mit der Azofarbstoffmethode dürfte vielleicht zu einem einheitlicheren Bild führen.

Die manchmal vorhandene deutliche Phosphatasereaktion in der Umgebung der Sinus und Lymphfollikel erscheint Fasern angelagert. Die stärkste An-

färbung sieht man bei hochgradiger Follikelhyperplasie und gelegentlich unter den Randsinus. Eine schlüssige Deutung dieser Befunde ist noch nicht möglich, vielleicht hat aber die perifolliculäre und perisinuöse Phosphatasereaktion einen gemeinsamen Grund: An beiden Stellen trifft Lymph- bzw. Blutflüssigkeit auf das lymphatische Parenchym; von den Sinus, speziell den Randsinus aus, strömt Lymphe in die benachbarte Pulpa ein; von dem Capillargebiet der Follikel, besonders der Sekundärknötchen, trifft Blutflüssigkeit auf die umgebende Pulpa. Es besteht die Möglichkeit, daß hier die alkalische Phosphatase eine ähnliche Funktion ausübt wie bei dem Transport durch Grenzflächen (Capillaren), und daß die Phosphatase den Fasern von der umgebenden Gewebsflüssigkeit angelagert wird.

Aus den bisherigen Befunden an malignen Lymphomen lassen sich keine wesentlichen Schlüsse, insbesondere keine diagnostischen Konsequenzen ziehen. Allenfalls ist die Zerstörung der Gefäßarchitektur ein gewisser Hinweis auf Malignität. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob eine Beziehung zwischen Phosphataseaktivität, Fasergehalt und Zelltyp — zum Beispiel beim Reticulosarkom — bestehen.

Bei 2 von 3 Lymphosarkomen beobachteten wir eine positive alkalische Phosphatasereaktion in einem Teil der Sarkomzellen. Wir lassen die Frage nach der diagnostischen Bedeutung wegen der geringen Zahl der untersuchten Fälle offen. Einen Hinweis, der eine mögliche Beziehung aufzeigt, möchten wir jedoch geben: Aus der Literatur ist bekannt, daß „Lymphoblasten“ oder „Lymphosarkomzellen“, d.h. größere und unreifer erscheinende Zellen bei Lymphosarkom und lymphatischer Leukämie, signifikant mehr Polysaccharide enthalten (ASTALDI und VERGA) oder häufig, wenn auch nicht immer, eine sehr starke PAS-Reaktion zeigen (QUAGLINO und HAYHOE). Es erhebt sich die Frage, ob hier ein Zusammenhang zwischen der Phosphataseaktivität und der Vermehrung von Polysacchariden besteht. Ein gleichsinniges Verhalten von PAS-Reaktion und alkalischer Leukocytenphosphatase konnten MERKER und CHUN YIU HUI aufzeigen.

Vergleichen wir die *cytologischen* Befunde von Schnitt und Ausstrich, so sind — bei der angewandten Technik — folgende Zellen als phosphatase-positiv anzusehen: Alle Endothelien der Capillaren, Arteriolen, ein Teil der Endothelien von Venolen, Arterien, Venen und Lymphgefäßen, ein Teil der Fibroblasten und neutrophilen Granulocyten und vielleicht auch ein Teil der großen Reticulumzellen. Über die Menge der positiven „kleinen Reticulumzellen“ des Ausstriches können wir nichts Sicheres sagen, da wir negative lymphoide Reticulumzellen nicht von Lymphocyten abgrenzen können, also nicht wissen, ob alle vorhandenen oder nur die phosphatase-positiven Zellen ausgewertet wurden.

Demgegenüber bleiben folgende Zellen phosphatase-negativ: Lymphocyten und Vorstufen (Ausnahme: ein Teil der Zellen von 3 Lymphosarkomen), Germinalblasten, Plasmazellen und Vorstufen, der größte Teil oder alle großen Reticulumzellen, die Sinusendothelien, Gewebsmastzellen, eosinophile Granulocyten, Epitheloidzellen, Langhanssche Riesenzellen, Hodgkinzellen, Sternbergsche Riesenzellen, sowie reticuläre Reizzellen und Histioocyten.

Die „großen Reticulumzellen“ unserer Ausstrichpräparate stellen zum Teil Gefäßendothelien, zum Teil Fibroblasten dar. Die Endothelien sind im allgemeinen

stärker positiv als die Fibroblasten. Es bleibt aber die Frage, ob sich nicht auch echte Reticulumzellen in dieser Gruppe befinden.

Ein Vergleich der Ausstrichpräparate mit den Schnitten lehrt, daß die Reticulumzellen im allgemeinen keine alkalische Phosphataseaktivität zeigen. Nur hier und da fanden wir große einzeln liegende Zellen in der Pulpa, die möglicherweise Reticulumzellen, eher aber Endothelzellen kollabierter Capillaren darstellen. Dagegen waren in den Randzonen von Tuberkeln und bei Lymphogranulomatose stets größere Mengen phosphataseaktiver Zellen im Schnitt nachweisbar, die in der Literatur meist als Fibroblasten gedeutet werden (z. B. von GÖSSNER 1955, 1958), zumal sie stets in faserreichen Bezirken liegen. Wir dürfen annehmen, daß sie sich aus reticulären Elementen entwickelt haben. Insofern ist es möglich, daß ein Teil dieser phosphatase-positiven Zellen, speziell die schwächer reagierenden, Reticulumzellen mit fibroblastischer Differenzierungsrichtung darstellen. Die Hauptmasse der großen Reticulumzellen im Lymphknoten ist aber phosphatase-negativ. Findet man im Lymphknotenausstrich vermehrt Reticulumzellen mit Phosphataseaktivität, so kann dies als Hinweis auf einen fibrosierenden Prozeß gelten.

Die negative Phosphatasereaktion der *Gewebsmastzellen* steht in Widerspruch zu zahlreichen Angaben der Literatur, wonach bei Mensch und vielen Tierarten mit der Calcium-Cobalt-Methode alkalische Phosphatase nachgewiesen wurde (WISLOCKI und DEMPSEY; MONTAGNA und NOBACK 1946, 1948; PAFF, MONTAGNA und BLOOM; WISLOCKI, BUNTING und DEMPSEY; WISLOCKI und FAWCETT; FADEM; LINDNER u. a.). RILEY und DRENNAN dagegen fanden nur bei Maus und Ratte, dagegen nicht bei anderen Tierarten und auch nicht beim Menschen, eine positive Gomori-Reaktion eines Teiles der Gewebsmastzellen. Wir sahen nur einmal im Schnitt einzelne Körnchen des Reaktionsproduktes im Cytoplasma einer Gewebsmastzelle, die zwischen den Granula zu liegen schienen. Da wir hierbei einen Diffusionsartefakt vermuteten, haben wir diesen Befund nicht mit berücksichtigt. Auf alle Fälle dürfen wir die mit der Ca-Co-Methode gewonnenen Ergebnisse nur mit großer Vorsicht verwerten; denn wir wissen heute, daß Calciumphosphat von verschiedenen sauren Gewebssorten, z. B. von Kernen oder Mastzellengranula, adsorbiert wird, wodurch eine unspezifische Anfärbung solcher Strukturen entsteht (GOMORI 1951; HERMAN und DEANE; FEIGIN u. WOLF). Aus diesem Grunde dürften die mit der Azofarbstoffmethode erhobenen Befunde zuverlässiger sein und zu der Aussage berechtigen, daß die Gewebsmastzelle des Menschen zumindest in den Granula keine cytochemisch nachweisbare alkalische Phosphatase enthält.

Nach VERCAUTEREN sowie CESARO u. Mitarb. sollen die *eosinophilen Granulocyten* phosphatase-positiv sein. Dies kann nach unseren Untersuchungen jedoch nicht bestätigt werden und wurde schon früher von zahlreichen Autoren (u. a. WACHSTEIN, KAPLOW, FRIEDERICI, MERKER und HEILMEYER) bestritten. Schwache diffuse Anfärbung des Cytoplasmas mit der Azofarbstoffmethode (HAYHOE und QUAGLINO; PLENERT) könnte auf einer unspezifischen Untergrundfärbung durch das benutzte Diazoniumsalz beruhen, da sich die von den genannten Autoren verwandten Kupplungsfarbstoffe (Echtgranatsalz GBC und Echtblausalz BB), vor allem im alkalischen Milieu, durch eine ziemlich intensive Eigenfarbe (GÖSSNER 1958) auszeichnen.



### Zusammenfassung

Mit der Azofarbstoffmethode wurde das Vorkommen von alkalischer Phosphatase in Lymphknotenschnitt und -ausstrich untersucht.

Im normalen oder hyperplastischen Lymphknoten sind am stärksten und regelmäßig die Capillaren und die Arteriolen positiv, unregelmäßig ist die Phosphataseaktivität in den Endothelien der Venolen, der größeren Blutgefäße und der Lymphgefäße. Sodann findet man in Kapsel und Trabekeln oft einige positive Fibroblasten. Weiterhin zeigt die Pulpa manchmal eine Reaktion in der Umgebung der Sinus (besonders unter den Randsinus!) und der Keimzentren, welche Fasern angelagert erscheint. Die Aktivität in der Umgebung der Keimzentren ist bei hochgradiger follikulärer lymphatischer Hyperplasie am stärksten ausgeprägt. Am Rande von Tuberkeln, tuberkulösen Käseherden und in den Vernarbungsbezirken von Lymphogranulomatosen ist eine erhebliche alkalische Phosphataseaktivität festzustellen.

In Lymphknotenausstrichen waren von den als große Reticulumzellen eingestuft Elementen etwa 16% phosphatase-aktiv. Sie stellen sicher zum Teil Gefäßendothelien und Fibroblasten dar. Weiterhin fanden sich im Ausstrich kleine „lymphoide“ Reticulumzellen mit deutlicher Phosphatasereaktion. Die Gewebemastzellen lassen — zumindest in den Granula — keine alkalische Phosphatase nachweisen.

Der Anteil phosphatase-positiver neutrophiler Granulocyten ist bei „unspezifischer Lymphadenitis“ gegenüber den Normalwerten des peripheren Blutes leicht, bei Lymphogranulomatose stark erhöht.

Ein Teil der Zellen von 2 Lymphosarkomen ließ sowohl im Schnitt als auch im Ausstrich deutliche Phosphataseaktivität erkennen.

### Summary

The presence of alkaline phosphatase was investigated in slide preparations and smears of lymph nodes with the azo dye method.

In the case of normal or hyperplastic lymph nodes, capillaries and arterioles are regularly and most strongly positive; the phosphatase activity in the endothelium of the venules, the larger blood vessels and the lymph vessels is irregular. One occasionally finds a few positive fibroblasts in the capsule and trabeculae. In addition, the pulpa sometimes shows a reaction in the region of the sinus, especially of the marginal sinus, and in the region of the germinal centers which appears to be associated with fibers. The activity in the region of the germinal centers is most fully developed with severe follicular lymphatic hyperplasia.

A considerable degree of alkaline phosphatase activity can be noted at the edge of tubercles and tubercular caseous foci and in the scarified areas of the lymphogranulomatosis.

In lymph node smears, elements interpreted as large reticulum cells were found to be about 16% phosphatase active; in part these cells are for certain vascular endothelium and fibroblasts.

In the smears, we also found small lymphoid reticulum cells which gave a clear cut phosphatase reaction. No alkaline phosphatase activity could be demonstrated in the tissue mast cells, at least, that is, in their granula.

Phosphatase activity could be clearly demonstrated in slide preparations as in smears in a part of the cells from 2 lymphosarcomas.

### Literatur

- ACKERMAN, G. A.: Cytochemistry of the lymphocytes: Phase microscope studies. In: *The lymphocyte and lymphocytic tissue*, edit. by J. W. REBUCK. New York: Paul B. Hoeber 1960.
- G. A., R. A. KNOUFF and H. A. HOSTER: Cytochemistry and morphology of neoplastic and nonneoplastic human lymph node cells with special reference to Hodgkin's disease. *J. nat. Cancer Inst.* **12**, 465—489 (1951).
- ASTALDI, G., and L. VERGA: The glycogen content of the cells of lymphatic leukaemia. *Acta haemat. (Basel)* **17**, 129—135 (1957).
- BAKER, J. R., and W. H. FISHMAN: Effects of chloral-formol fixation on preservation and localization of five enzymes. *J. Histochem. Cytochem.* **6**, 85—86 (1958).
- BRACHET, J.: *Biochemical cytology*. New York: Acad. Press Inc. 1957.
- BRADFELD, J. R. G.: Alkaline phosphatase in intervertebrate sites of protein secretion. *Nature (Lond.)* **157**, 876—877 (1946).
- BRAUNSTEIN, H.: Histochemistry of lymphocytic tissue in the malignant lymphomas. In: *The lymphocyte and lymphocytic tissue*, edit. by J. W. REBUCK. New York: Paul B. Hoeber 1960.
- H., D. G. FREIMAN and E. A. GALL: Histochemical study of the distribution of enzymatic activity in malignant lymphoma. (Abstr.). *Amer. J. Path.* **33**, 603—604 (1957).
- H., D. G. FREIMAN and E. A. GALL: A histochemical study of the enzymatic activity of lymph nodes. *Cancer (Philad.)* **11**, 829—837 (1958).
- CESARO, A. N., G. SALTITA and S. D'URSO: L'istochimica dell'acido ascorbico negli elementi figurati del sangue periferico dell'uomo normale, adulto. *Acta histochem. (Jena)* **5**, 146—155 (1958).
- DANIELLI, J. F., H. B. FELL and E. KODICEK: Enzymes of healing wounds. *Brit. J. exp. Path.* **26**, 367—376 (1945).
- FADEN, R. S.: Tissue mast cells in human bone marrow. *Blood* **6**, 614—630 (1951).
- FEIGIN, I., and A. WOLF: Artfactual nuclear staining in the Gomori-method for demonstrating alkaline phosphatase. *Lab. Invest.* **2**, 115—123 (1953).
- FISHMAN, W. H., and J. R. BAKER: Cellular localization of  $\beta$ -glucuronidase in rat tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **4**, 570—588 (1956).
- FRESEN, O.: *Zur normalen und pathologischen Histologie des Reticuloendothelialen Systems, Retikulose-Monocytenleukämie*. Habil.-Schr. Düsseldorf 1945.
- FRIEDERICI, L.: Histochemische Methoden in der Hämatologie. *Klin. Wschr.* **1955**, 1020 bis 1026.
- GÖSSNER, W.: Histoenzymatische Untersuchungen zur Tuberkulose. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **39**, 152—155 (1955).
- Histochemischer Nachweis hydrolytischer Enzyme mit Hilfe der Azofarbstoffmethode. Untersuchungen zur Methodik und vergleichenden Histotopik der Esterasen und Phosphatasen bei Wirbeltieren. *Histochemie* **1**, 48—96 (1958).
- GOLD, N. J., and B. S. GOULD: Collagen fiber formation and alkaline phosphatase. *Arch. Biochem.* **33**, 155—164 (1955).
- GOMORI, G.: The study of enzymes in tissue sections. *Amer. J. clin. Path.* **16**, 347—352 (1946).
- Alkaline phosphatase of cell nuclei. *J. Lab. clin. Med.* **37**, 526—531 (1951).
- Diskussion zu W. L. DOYLE Distribution of peptidase, esterase and phosphatases within lymphatic tissue. *J. Histochem. Cytochem.* **2**, 435—437 (1954).
- GROGG, E., and A. G. E. PEARSE: Coupling azo dye methods for histochemical demonstration of alkaline phosphatase. *Nature (Lond.)* **170**, 578—579 (1952).
- GROSS: Diskussion zu A. M. RUTENBERG, R. J. BARNETT, K.-C. TSOV, B. MONIS and R. TEAGUE, Histochemical demonstration of alkaline phosphatase activity by a simultaneous coupling technique using naphthol AS phosphate. *J. Histochem. Cytochem.* **6**, 90—91 (1958).
- HAYHOE, F. G. J., and D. QUAGLINO: Cytochemical demonstration and measurement of leucocyte alkaline phosphatase activity in normal and pathological states by a modified azo-dye coupling technique. *Brit. J. Haemat.* **4**, 375—389 (1958).

- HERMAN, E., and H. W. DEANE: A comparison of the localization of alkaline glycerophosphatase as demonstrated by the Gomori-Takamatsu-method, in frozen and paraffin sections. *J. cell. comp. Physiol.* **41**, 201—224 (1953).
- HORT, W., u. H. HORT: Beiträge zur Histochemie der Blutgefäßendothelien und der Capillargrundhäutchen. *Virchows Arch. path. Anat.* **331**, 591—615 (1958).
- HUSEBY, R. A., and L. B. THOMAS: Histological and histochemical alterations in the normal breast tissues of patients with advanced breast cancer being treated with estrogenic hormones. *Cancer (Philad.)* **7**, 54—74 (1954).
- JEENER, R.: Cytochemical effects of oestradiol. *Nature (Lond.)* **159**, 578 (1947).
- KABAT, E. A., and J. FURTH: A histochemical study of the distribution of alkaline phosphatase in various normal and neoplastic tissues. *Amer. J. Path.* **17**, 303—318 (1941).
- KAPLOW, L. S.: A histochemical procedure for localizing and evaluating leucocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow. *Blood* **10**, 1023—1029 (1955).
- LAMBERS, K.: Die alkalische Phosphataseaktivität der Blutzellen bei Leukosen und anderen pathologischen Zuständen. *Z. klin. Med.* **155**, 176—190 (1958).
- Cytochemische Untersuchungen an Blutzellen und ihre Bedeutung für die Klinik der Blutkrankheiten. *Internist* **1**, 269—278 (1960).
- LENNERT, K.: Zur Praxis der pathologisch-anatomischen Knochenmarksuntersuchung. *Frankfurt. Z. Path.* **63**, 267—299 (1952).
- Histologische Studien zur Lymphogranulomatose. I. Die Cytologie der Lymphogranulomzellen. *Frankfurt. Z. Path.* **64**, 209—234 (1953).
- II. Die diagnostische Bedeutung der einzelnen Zellelemente in lymphogranulomatösen Lymphknoten. *Frankfurt. Z. Path.* **64**, 343—356 (1953).
- Über die Erkennung von Keimzentrumzellen im Lymphknotenausstrich. *Klin. Wschr.* **1957**, 1130—1132.
- Die Frühveränderungen der Lymphogranulomatose. *Frankfurt. Z. Path.* **69**, 103—122 (1958).
- Lymphknoten. Diagnostik in Schnitt und Ausstrich. In *Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie*, Bd. I/3. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1961.
- , u. W. REMMELE: Karyometrische Untersuchungen an Lymphknotenzellen des Menschen. I. Germinoblasten, Lymphoblasten und Lymphocyten. *Acta haemat. (Basel)* **19**, 99—113 (1958).
- — II. Reticulum- und Endothelzellen. *Acta haemat. (Basel)* **20**, 301—317 (1958).
- — III. Basophile Stammzellen, Plasmazellen und Gewebsmastzellen. *Acta haemat. (Basel)* **21**, 139—156 (1959).
- LINDNER, H.: Experimentelle Untersuchungen zum Abbau von Polysacchariden in Lymphknoten. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **37**, 197—202 u. Disk. 211—214 (1954).
- LÖFFLER, H.: Kombinationsmöglichkeiten der Nachweismethoden für hydrolytische Enzyme mit der Azofarbstoffmethode. *Histochemie* **2**, 23—31 (1960).
- MANHEIMER, L. H., and A. M. SELIGMAN: Improvement in the method for the histochemical demonstration of alkaline phosphatase and its use in a study of normal and neoplastic tissues. *J. nat. Cancer Instit.* **9**, 181—199 (1948/49).
- MENTEN, M. L., J. JUNGE and M. H. GREEN: A coupling histochemical azo dye test for alkaline phosphatase in the kidney. *J. biol. Chem.* **153**, 471—477 (1944).
- MERKER, H., u. L. HEILMEYER: Die alkalische Phosphatase neutrophiler Leukocyten. Cytoenzymatischer Nachweis und Aktivität bei Erkrankungen und Reaktionen des blutbildenden Systems. *Dtsch. med. Wschr.* **85**, 253—258 (1960).
- , u. CHUN YIU HUI: Alkalische Phosphatase und Glykogengehalt der reifen Neutrophilen im Verlauf von idiopathischen myeloproliferativen Erkrankungen. *Verh. dtsch. Ges. inn. Med.* **66**, 1050—1056 (1960).
- MONIS, B., and A. M. RUTENBURG: Alkaline phosphatase activity in neoplastic and inflammatory tissues of man. *Cancer (Philad.)* **13**, 538—544 (1960).
- MONTAGNA, W., and C. R. NOBACK: The histochemistry of the preputial gland of the rat. *Anat. Rec.* **96**, 111—127 (1946).
- — Localization of lipids and other chemical substances in the mast cells of man and laboratory animals. *Anat. Rec.* **100**, 535—545 (1948).

- MORITZ, V.: Über den histochemischen Nachweis alkalischer Phosphatase in menschlichen Lymphknoten. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **97**, 457—465 (1958).
- PAFF, G. H., W. MONTAGNA and F. BLOOM: Cytochemical studies of normal and tumour mast cells in tissues and in vitro. *Cancer Res.* **7**, 798—801 (1947).
- PLENERT, W.: Das Verhalten der alkalischen Leukocytenphosphatase bei der Leukämie im Vergleich zu anderen Krankheiten im Kindesalter. *Verh. des 6. Kongr. der Europ. Ges. für Hämatologie*, S. 244—248, Kopenhagen 1957, Part 2.
- QUAGLINO, D., and F. G. J. HAYHOE: Observations on the periodic acid-schiff reaction in lymphoproliferative diseases. *J. Path. Bact.* **78**, 521—532 (1959).
- RILEY, J. F., and J. M. DRENNAN: The presence and significance of alkaline phosphatase in the cytoplasm of mast cells. *J. Path. Bact.* **61**, 245—251 (1949).
- ROBERTSON, W. V. B., F. W. DUNIHUE and A. B. NOVIKOFF: The metabolism of connective tissue: Absence of alkaline phosphatase in collagen fibers during formation. *Brit. J. exp. Path.* **31**, 545—549 (1950).
- ROHR, K.: *Das menschliche Knochenmark*, 3. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme 1960.
- TAKAMATSU, H.: Histologische und biochemische Studien über die Phosphatase; histochemische Untersuchungsmethodik der Phosphatase und deren Verteilung in verschiedenen Organen und Geweben. *Trans. Soc. path. jap.* **29**, 492—498 (1939).
- TONNA, E. A.: Histochemical evaluation of the activity of phosphatase by means of a minimal staining technic. *Amer. J. clin. Path.* **28**, 171—173 (1939).
- TROWELL, O. A.: The lymphocyte. *Int. Rev. Cytol.* **7**, 235—293 (1958).
- VERCAUTEREN, R.: The intracellular distribution of alkaline and acid phosphatase in leukocytes. *Naturwissenschaften* **2**, 532 (1954).
- VORBRÖDT, A.: Histochemically demonstrable phosphatases and protein syntheses. *Exp. Cell Res.* **15**, 1—20 (1958).
- WACHSTEIN, M.: Alkaline phosphatase activity in normal and abnormal human blood and bone marrow cells. *J. Lab. clin. Med.* **31**, 1—17 (1946).
- Histochemistry of leukocytes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **59**, 1052—1065 (1955).
- WASSERMANN, F.: The intercellular components of connective tissue: Origin, structure and interrelationship of fibers and ground substance. *Ergebn. Anat. Entwickl.-Gesch.* **35**, 240—333 (1956).
- WISLOCKI, G. B., H. BUNTING and E. W. DEMPSEY: Further observations on the chemical cytology of megakaryocytes and other cells of hemopoietic tissues. *Anat. Rec.* **98**, 527—537 (1947).
- , and E. W. DEMPSEY: Observations on the chemical cytology of normal blood and hemopoietic tissues. *Anat. Rec.* **96**, 249—278 (1946).
- , and D. W. FAWCETT: Some histochemical properties of mast cells and tissue eosinophils in stained spreads of normal rat mesentery. *J. nat. Cancer Inst.* **12**, 258 (1951).

Professor Dr. K. LENNERT  
 Pathologisches Institut der Universität Heidelberg, Voßstr. 2  
 Dr. H. LÖFFLER  
 Medizinische Universitätsklinik Heidelberg