

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

## Über den histochemischen Nachweis oxydativer Enzyme in Onkocyten verschiedener Organe

Von

**ROBERT FISCHER**

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 27. Juni 1961)

Bei den von HAMPERL (1931 a) als Onkocyten bezeichneten Zellen in verschiedenen drüsigen Organen und deren Geschwülsten handelt es sich um epithiale Elemente, die sich von den entsprechenden Nachbarzellen durch eine starke Volumenzunahme ihres Zelleibes, eine mehr oder weniger ausgeprägte Acidophilie sowie eine gleichmäßige, feingranuläre Beschaffenheit ihres Cytoplasmas unterscheiden. In den einzelnen Organen haben diese Zellen eine unterschiedliche Bezeichnung erfahren, wie z. B. „Welshsche Zellen“ der Parathyreoida, „Askanazy-Zellen“ der Thyreoidea (Lit. bei WATZKA 1955, WEGELIN 1926). Die weitgehend übereinstimmenden morphologischen und färberischen Eigenschaften rechtfertigen jedoch eine Zusammenfassung aller dieser Zellen unter der von HAMPERL vorgeschlagenen Bezeichnung „Onkocyten“.

Die Frage, ob es sich bei der onkocytären Umwandlung epithelialer Zellen um einen Degenerationsvorgang handelt, der schließlich zum Untergang der Zellen führt, oder ob onkocytäre Zellen im Stoffwechselgeschehen des alternden Organismus — etwa im Sinne einer „Umdifferenzierung“ bzw. „Altersdifferenzierung“ (HAMPERL 1931 b) — bestimmte Aufgaben zu erfüllen haben, läßt sich auf Grund der bisherigen Befunde nicht mit Sicherheit beantworten. Zur weiteren Klärung dieser Frage waren unter anderem vergleichende Untersuchungen über die stoffliche Zusammensetzung und die Enzymausstattung dieser Zellen erwünscht, über die hier berichtet werden soll.

Enzymhistochemische Untersuchungen an Onkocyten sind erst in jüngster Zeit durchgeführt worden: TREMBLAY und PEARSE (1959) sowie BALOGH und COHEN (1961) konnten in den oxyphilen Zellen (Onkocyten) der Nebenschilddrüse eine starke Aktivität oxydativer Fermente nachweisen; FREIMAN und KAPLAN (1960) berichten über eine deutliche ATPase-Aktivität in diesen Zellen. Schließlich fanden TREMBLAY und PEARSE (1960) auch in den sog. Askanazy-Zellen, den Onkocyten der Schilddrüse, einen intensiven Reaktionsausfall beim histochemischen Nachweis verschiedener oxydatischer Fermentsysteme.

### Material und Methodik

Menschliches Untersuchungsmaterial wurde sowohl dem Einsendungsgut (Operationspräparate) entnommen als auch bei Obduktionen gewonnen, die kurze Zeit nach dem Tod durchgeführt werden konnten. Die enzymhistochemischen Nachweisverfahren kamen dabei an folgenden Organen zur Anwendung: Speicheldrüsen (Sublingualis, Submandibularis, weicher Gaumen), Schilddrüse, Parathyreoida; außerdem wurden in die Untersuchungen zwei operativ entfernte Onkocytome der Schilddrüse (sog. Hürthle-Zell-Tumoren) mit einbezogen.

Von den frisch entnommenen Gewebsstückchen wurden im Kryostaten (DITTES-DUSPIVA) 8—10  $\mu$  dicke Nativschnitte hergestellt, die ohne Aufklebemittel auf Objektträger bzw.

Deckgläschchen aufgezogen wurden. Die Schnitte kamen nach dem Auftauen direkt in die einzelnen Inkubationslösungen.

Angewandte histochemische Methoden zum Nachweis folgender oxydativer Enzyme:

1. Cytochromoxydase (BURSTONE 1959—1961);
2. Bernsteinsäure-Dehydrogenase (NACHLAS u. Mitarb. 1957);
3. DPN-Diaphorase (NACHLAS u. Mitarb. 1958);
4. DPNH-Diaphorase (SCARPELLI u. Mitarb. 1958);
5. TPNH-Diaphorase (SCARPELLI u. Mitarb. 1958).

(Über die Durchführung der einzelnen Reaktionen s. PEARSE 1960.)

Zur Prüfung der Spezifität der histochemischen Enzymreaktionen wurden außerdem entsprechende Kontrollversuche durchgeführt (s. PEARSE 1960, BURSTONE 1959—1961): Hitzeaktivierung oder Formalinfixierung der Gewebsschnitte vor der Inkubation; Zusatz von KCN (0,001 M) als Inhibitor zur Inkubationslösung beim Nachweis der Cytochromoxydase; Weglassen des Substrates im Inkubationsgemisch.

Beim Nachweis der Cytochromoxydase wurde weiterhin in Kontrollversuchen der Inkubationslösung Katalase (3—4 mg/100 ml) zugesetzt, um die Erfassung einer Peroxydaseaktivität mit dieser Reaktion auszuschließen (BURSTONE 1960).

### Ergebnisse

Beim histochemischen Nachweis der verschiedenen Oxydationsfermente (Cytochromoxydase, Bernsteinsäure-Dehydrogenase, DPN- und TPN-Diaphorase) wiesen die Onkocyten in Speicheldrüsen, Schilddrüse (Askanazy-Zellen) und Nebenschilddrüse (Welhsche Zellen) übereinstimmend eine starke Aktivität dieser Enzyme auf. Es zeigten sich nur gelegentlich geringgradige Unterschiede in der Fermentaktivität zwischen den Onkocyten eines Organs bzw. zwischen den onkocytären Zellen der verschiedenen drüsigen-epithelialen Gewebe. So ließ sich vor allem feststellen, daß die in den verschiedenen Abschnitten der Speicheldrüsen auftretenden Onkocyten eine starke Aktivität oxydativer Fermente aufwiesen, die durchaus der Enzymaktivität in den onkocytären Zellen der Parathyroidea bzw. der Schilddrüse entspricht (Abb. 1 und 4).

Im Bereich von Speicheldrüsen-Ausführungsgängen (besonders in mukösen Drüsen des weichen Gaumens) fanden sich gelegentlich die bereits von HAMPERL (1931 b) beschriebenen herdförmigen knotigen *Hyperplasien*, d. h. aus Onkocyten aufgebaute, solide oder mehr adenomatöse Zellhaufen. Auch die Zellen dieser geschwulstartigen Wucherungen wiesen eine starke histochemisch nachweisbare Aktivität oxydativer Fermente auf (Abb. 1 b).

In zwei operativ entfernten *Onkocytomen* der Schilddrüse (sog. Hürthle-Zell-Tumoren), von denen eines bereits histologisch die Zeichen der Malignität aufwies, war beim histochemischen Nachweis der Oxydationsfermente in den onkocytären Zellen des Tumorgewebes ebenfalls eine starke Enzymaktivität feststellbar (Abb. 2).

Bei den verschiedenen Nachweismethoden war das gefärbte Reaktionsprodukt (meist schon nach relativ kurzen Inkubationszeiten) in Form sehr dicht liegender feiner Granula gleichmäßig im aufgetriebenen Cytoplasma der onkocytären Zellen verteilt. Die Kerne blieben dabei ausgespart. Bei den untersuchten Enzymen zeigten die Nachweisreaktionen für Cytochromoxydase und Bernsteinsäure-Dehydrogenase in den onkocytären Zellen die stärkste Reaktion. Aber auch beim Nachweis der DPN- und TPN-Diaphorase war im Cytoplasma der Onkocyten eine deutlich ausgeprägte Fermentaktivität vorhanden.

Beim Vergleich der Enzymaktivität der onkocytär umgewandelten Epithelzellen mit dem Reaktionsausfall in den entsprechenden „normalen“ Nachbarzellen zeigten die onkocytären Zellen eine deutlich stärkere Aktivität oxydativer

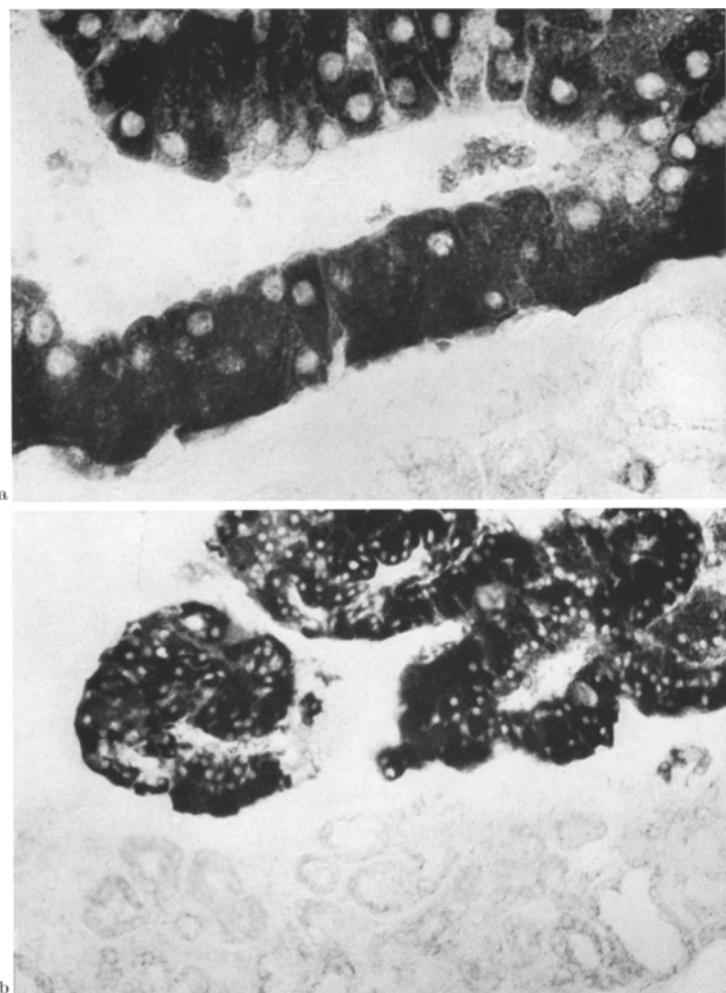


Abb. 1a u. b. Starke Aktivität oxydativer Enzyme in den Onkocyten der Speicheldrüsen des weichen Gaumens. a Onkocytäre Umwandlung des Epithels in einem Ausführungsgang. Cytochromoxydase, Ink. 15 min. Vergr. 450  $\times$ . b Aus Onkocyten aufgebaute herdförmige hyperplastische Wucherung in einer mukösen Drüse. Bernsteinsäure-Dehydrogenase, Ink. 30 min. Das übrige Drüsenparenchym zeigt bei dieser Inkubationszeit eine schwache Enzymaktivität. Vergr. 140  $\times$

Enzyme als die unveränderten epithelialen Elemente, so daß es bei der mikroskopischen Untersuchung schon bei schwacher Vergrößerung möglich war, die einzeln oder in Gruppen liegenden Onkocyten (z. B. der Parathyreoida) nachzuweisen und fast selektiv zur Darstellung zu bringen (Abb. 3). Aber auch in den verschiedenen Speicheldrüsen, in denen schon das normale Epithel der Ausführungsgänge eine starke Aktivität oxydativer Fermente aufweist (BURSTONE 1960), zeigten

die hier onkocytär umgewandelten Zellen einen dichteren und mehr gleichmäßig im gesamten Cytoplasma verteilten feingranulären Reaktionsausfall (Abb. 4).

### Diskussion

Die vorliegenden Befunde bestätigen zunächst die Ergebnisse enzymhistochemischer Untersuchungen, bei denen ebenfalls in den Onkocyten der Parathyreoidea (TREMBLAY u. PEARSE 1959, BALOGH u. COHEN 1961) und der Schilddrüse (TREMBLAY u. PEARSE 1960) eine starke Aktivität verschiedener oxydativer Fermentsysteme nachgewiesen wurde. Darüberhinaus konnte gezeigt werden,

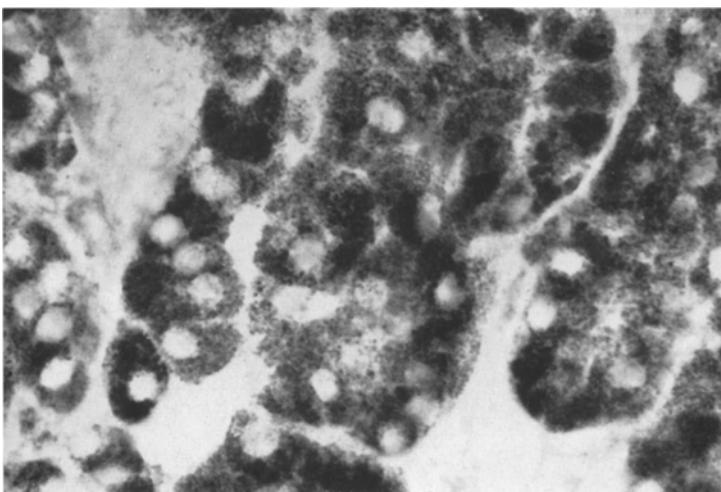


Abb. 2. Malignes Onkocytom der Schilddrüse. A 3918/61. Histochemischer Nachweis der Cytochromoxydase, Ink. 45 min. Die onkocytären Geschwulstzellen weisen eine sehr starke Cytochromoxydaseaktivität auf. Vergr. 530 ×

daß auch die Onkocyten der Speicheldrüsen dieselbe starke Aktivität oxydativer Enzyme aufweisen. Ein entsprechendes enzymhistochemisches Verhalten fand sich weiterhin in den onkocytären Zellen der von HAMPERL (1931 b) beschriebenen herdförmigen Hyperplasien in Speicheldrüsen sowie in den Geschwulstzellen der beiden untersuchten Onkocytome der Schilddrüse (Hürthle-Zell-Tumoren). Bei den durchgeführten histochemischen Fermentnachweisen ließ sich — neben den bereits früher angewandten Methoden — jetzt auch mit dem von BURSTONE (1959—1961) angegebenen Verfahren zur Darstellung der Cytochromoxydase in den Onkocyten übereinstimmend eine starke Aktivität nachweisen.

Der weitgehenden morphologischen Übereinstimmung der Onkocyten verschiedener Lokalisation entspricht also in den untersuchten Organen eine ebenso solche hinsichtlich der Aktivität oxydativer Enzyme. Es ist zu erwarten, daß weitere Untersuchungen ein entsprechendes enzymhistochemisches Verhalten auch an onkocytären Zellen anderer epithelialer Gewebe aufdecken werden. So waren z. B. in vorläufigen Untersuchungen beim histochemischen Nachweis der Cytochromoxydase auch in der Hypophyse gelegentlich kleine Ansammlungen von großen Zellen nachzuweisen, die sich durch eine den Onkocyten entsprechende starke Enzymaktivität auszeichneten.

Sowohl biochemische als auch histochemische bzw. elektronenmikroskopisch-histochemische Untersuchungen (Lit. bei PEARSE u. SCARPELLI 1959) haben ergeben, daß die hier nachgewiesenen Oxydationsfermente in den Mitochondrien lokalisiert sind. Es ist daher zu erwarten, daß der starken Aktivität oxydativer

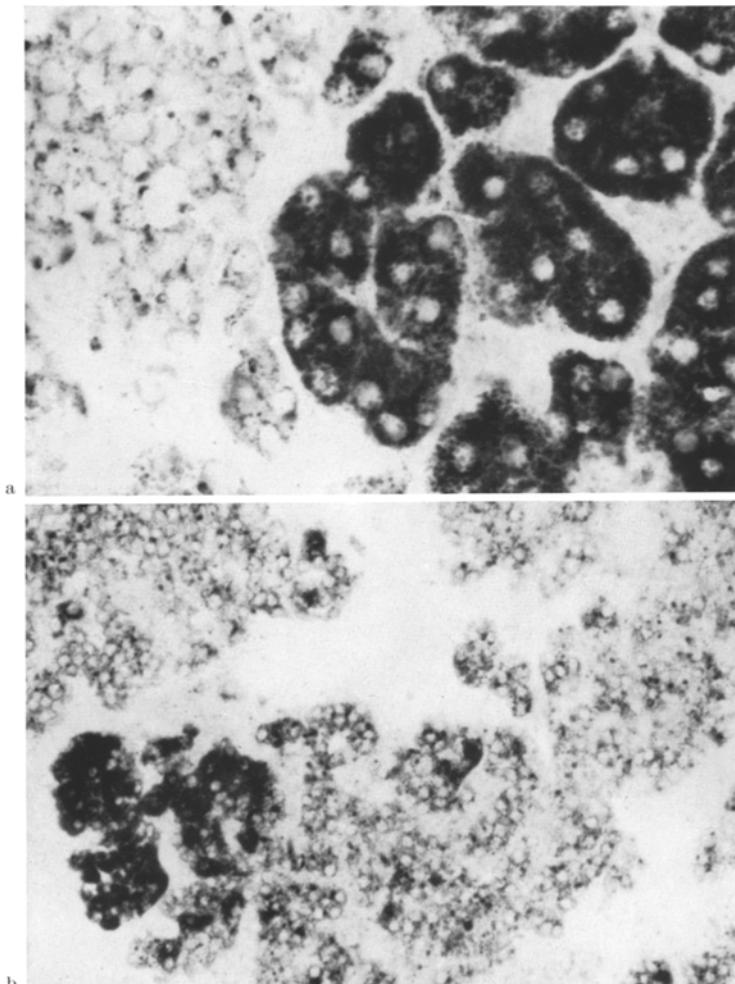


Abb. 3a u. b. Starke Aktivität oxydativer Enzyme in Onkocyten der Parathyreoidea (oxyphile Zellen von WELSH) im Vergleich zu den Hauptzellen. a Cytochromoxydase, Ink. 15 min. Das Cytoplasma der Onkocyten ist von feinen, dichtliegenden fermentpositiven Granula erfüllt. Vergr. 530×. b Bernsteinsäure-Dehydrogenase, Ink. 30 min. Die einzeln oder in Gruppen liegenden oxyphilen Zellen werden infolge ihrer vergleichsweise starken Enzymaktivität fast selektiv dargestellt. Vergr. 210×

Enzyme in den Onkocyten auch ein entsprechender Reichtum an Mitochondrien zugrunde liegt. In der Tat haben schon BAKER (1942) und DONLACH (1960) auf die große Zahl von Mitochondrien in den Onkocyten der Parathyreoidea bzw. der Schilddrüse hingewiesen. Die Angaben wurden bestätigt durch elektronenmikroskopische Untersuchungen von TRIER (1958) an den oxyphilen Zellen der Parathyreoidea beim Affen, die der Autor geradezu als „sacs stuffed with mitochondria“

bezeichnet. Die Mitochondrien der oxyphilen Zellen erschienen dabei größer und meist plumper als die der Hauptzellen, sie zeigten jedoch im übrigen eine nahezu typische Feinstruktur.

Der Mitochondrienreichtum in Onkocyten sowie die starke Aktivität der dort nachgewiesenen oxydativen Enzyme sprechen bis zu einem gewissen Grade gegen die Annahme, bei den Onkocyten handele es sich um Zellen mit herabgesetzter Lebensfähigkeit. Die Diskussion um die Bedeutung und Funktion der Onkocyten wird dadurch in ein neues Licht gerückt.

Quantitative Veränderungen des Chondrioms im Sinne einer Vermehrung der Mitochondrien sind aus der allgemeinen Pathologie bekannt (vgl. ALTMANN 1955). Allerdings muß hierbei jeweils geprüft werden, ob sich das normale Verhältnis zur Cytoplasmagröße verschoben hat, oder ob es sich nur um eine entsprechende Vermehrung der Mitochondrien mit den übrigen Strukturen des Cytoplasmas handelt. So diskutieren BALOGH u. COHEN (1961) die Frage, ob die hohe Enzymaktivität in den oxyphilen Zellen der Parathyreoida nur einfach mit der vermehrten cytoplasmatischen Proteinkonzentration in Beziehung zu setzen ist, oder ob diese Zellen tatsächlich mehr Enzym pro Proteineinheit besitzen als die Hauptzellen.

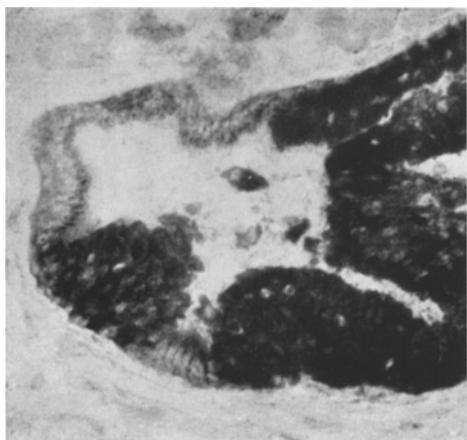


Abb. 4. Partielle onkocytäre Umwandlung des Epithels in einem Speicheldrüsenausführungsgang (weicher Gaumen). Cytochromoxydase, Ink. 15 min. Die onkocytär umgewandelten Epithelzellen zeigen eine deutlich verstärkte Enzymreaktion im Vergleich zu den „normalen“ Nachbarzellen. Vergr. 180 ×

hungen zwischen der Mitochondrienzahl einer Seite und der Atmungs- und Stoffwechselintensität andererseits bestehen (vgl. ALTMANN 1955).

Trotzdem darf wohl aus der Mitochondrienvermehrung sowie der hohen Aktivität der Oxydationsfermente nicht zwangsläufig auf eine größere Funktion der betreffenden Zellen geschlossen werden. So ziehen auch TREMBLAY u. PEARSE (1959) in ihren Untersuchungen die Möglichkeit in Erwägung, daß die oxyphilen Zellen unter Umständen einen größeren Enzymbedarf hätten, um ihre Funktion auszuüben.

Von Bedeutung sind in diesem Zusammenhang auch die Untersuchungen über die sog. „Entkoppelung“ von Atmung und oxydativer Phosphorylierung, die gezeigt haben, daß eine gesteigerte Atmung nicht ohne weiteres als Zeichen eines energetisch ausgeglichenen Zellstoffwechsels bzw. als Ausdruck einer Leistungssteigerung gewertet werden dürfen. AEBI und ABELIN (1953) sehen hierin vielmehr eine sekundäre Anpassung an die Entkoppelung von Atmung und oxydativer Phosphorylierung. Es handelt sich also offenbar um den Versuch, die sinkende Leistung der einzelnen energieliefernden Strukturen durch deren Vermehrung wieder auszugleichen (ALTMANN 1955).

ALTMANN (1955) weist schließlich mit Recht auf die Schwierigkeit und Unsicherheit hin, auf Grund eines „Momentbildes“ zwischen einer primären

Wie die elektronenmikroskopischen Untersuchungen von TRIER (1958) ergeben haben, besteht jedoch in den oxyphilen Zellen im Vergleich zu den Hauptzellen eine erhöhte Mitochondrienkonzentration. Es würde hier demnach eine echte Verschiebung des Quotienten „Mitochondrienoberfläche zu Zellvolumen“ (COWDRY u. COHEL 1927) vorliegen.

Untersuchungen der letzten Jahre haben ergeben, daß korrelative Beziehungen und Fermentaktivität auf der einen

Funktionssteigerung, der Kompensation einer Schädigung und einer beginnenden Überbeanspruchung zu unterscheiden.

Bei der Frage nach der Bedeutung und Funktion onkocytärer Zellen stehen wir vor einem ähnlichen Problem. So wäre es nach dem oben Gesagten denkbar, daß die Vermehrung der Mitochondrien in Onkocyten und die damit verknüpfte erhöhte Aktivität oxydativer Enzyme nur als Anpassungsvorgang an eine Zellschädigung aufzufassen ist. Man müßte in diesem Fall jedoch annehmen, daß bei Weiterbestehen der Schädigung die Zeichen einer fortschreitenden Alteration der Zelle sichtbar werden und schließlich der Zelltod eintritt.

Auf der anderen Seite kann es jedoch nicht von der Hand gewiesen werden, daß onkocytäre Zellen im Rahmen einer „Umdifferenzierung“ besondere Funktionen im Stoffwechselgeschehen des alternden Organismus zu erfüllen haben.

Die Frage nach der Bedeutung onkocytärer Zellen muß daher vorerst offen bleiben. Es werden noch weitere histochemische, elektronenmikroskopische und nach Möglichkeit auch tierexperimentelle Untersuchungen zur Prüfung der Frage notwendig sein, ob es sich bei den nachgewiesenen enzymhistochemischen Eigenschaften der Onkocyten um die Zeichen einer echten Funktionssteigerung (im Rahmen einer „Umdifferenzierung“?) handelt, oder ob sie nur als Ausdruck der Kompensation einer irgendwie gearteten Schädigung epithelialer Zellen zu werten sind.

### Zusammenfassung

In den Onkocyten verschiedener drüsiger-epithelialer Organe des Menschen [Speicheldrüsen, Schilddrüse (Askanazy-Zellen), Parathyreoidea (Welshsche Zellen)] wurde histochemisch eine starke Aktivität der Cytochromoxydase, der Bernsteinsäure-Dehydrogenase sowie der DPN- und TPN-Diaphorase nachgewiesen. Ein entsprechendes enzymhistochemisches Verhalten zeigten auch die Onkocyten in herdförmigen Hyperplasien im Bereich der Speicheldrüsen sowie die Tumorzellen von zwei Onkocytomen der Schilddrüse (sog. Hürthle-Zell-Tumoren). Die onkocytär umgewandelten Epithelzellen wiesen stets eine bedeutend stärkere Enzymaktivität auf als die entsprechenden „normalen“ Nachbarzellen.

Es bleibt noch unentschieden, ob es sich bei dieser starken Aktivität oxydativer Fermente in den Onkocyten um die Zeichen einer echten Funktionssteigerung (im Rahmen einer „Umdifferenzierung“?) handelt, oder nur um den Ausdruck der Kompensation einer Schädigung.

### Summary

The oncocytes of various organs of man [salivary glands, thyroid (Askanazy-cells), parathyroid (Welsh-cells)] showed a strong activity of histochemically demonstrable cytochrome oxidase, succinic dehydrogenase, DPN- and TPN-dia-phorase. The same was the case with the oncocytes of focal hyperplasia in salivary glands as well as in the tumor cells of two oncocyromas of the thyroid gland (so called Hürthle-cell tumors). The epithelial cells transformed into onco-cytes showed regularly a considerably stronger enzymatic activity than the corresponding "normal" cells.

It still remains undecided whether this strong activity of oxidative enzymes represents a true increase in function, to be regarded as a functional transformation („Umdifferenzierung“) or only a compensation to cellular damage.

## Literatur

- AEBI, H., and I. ABELIN: Elektrolyt- und Fermenthaushalt der hyperthyreotischen Leber. *Biochem. Z.* **324**, 364 (1953).
- ALTMANN, A. W.: Allgemeine morphologische Pathologie des Cytoplasmas. In *Handbuch der allgemeinen Pathologie*, Bd. II/1. Berlin: Springer 1955.
- BAKER, B. L.: Anat. Rec. **83**, 47 (1942). Zit. in TREMBLAY u. PEARSE, *J. Path. Bact.* **80**, 353—358 (1960).
- BALOGH, K., and R. B. COHEN: Oxidative enzymes in the epithelial cells of normal and pathological human parathyroid glands. *Lab. Invest.* **10**, 354—360 (1961).
- BURSTONE, M. S.: New histochemical techniques for the demonstration of tissue oxidase (cytochrome oxidase). *J. Histochem. Cytochem.* **7**, 112—122 (1959).
- Histochemical demonstration of cytochrome oxidase with new amine reagents. *J. Histochem. Cytochem.* **8**, 63—70 (1960).
- Modifications of histochemical techniques for the demonstration of cytochrome oxidase. *J. Histochem. Cytochem.* **9**, 59—65 (1961).
- COWDRY, E. V., and W. P. COVELL: Quantitative cytologic studies on the renal tubules. II. Mitochondria-cytoplasmic ratio. *Anat. Rec.* **36**, 349 (1927).
- DONIACH, I.: Diseases of endocrine organs. In *Recent Advanc. Path.* **7**, 197—270 (1960).
- FREIMAN, D. G., and N. KAPLAN: Studies on the histochemical differentiation of enzymes hydrolyzing adenosine triphosphate. *J. Histochem. Cytochem.* **8**, 159—170 (1960).
- HAMPERL, H.: Beiträge zur normalen und pathologischen Histologie menschlicher Speicheldrüsen. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **27**, 1—55 (1931 a).
- Onkocyten und Geschwülste der Speicheldrüsen. *Virchows Arch. path. Anat.* **282**, 724—736 (1931 b).
- Über das Vorkommen von Onkocyten in verschiedenen Organen und ihren Geschwülsten. *Virchows Arch. path. Anat.* **298**, 327—375 (1936).
- NACHLAS, M. M., K. C. TSOU, E. DE SOUZA, C. S. CHENG and A. M. SELIGMAN: Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-Nitrophenyl substituted ditetrazole. *J. Histochem. Cytochem.* **5**, 420—436 (1957).
- , D. G. WALKER and A. M. SELIGMAN: A histochemical method for the demonstration of diphosphopyridine nucleotide diaphorase. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 29—38 (1958).
- PEARSE, A. G. E.: *Histochemistry. Theoretical and applied*, 2nd edit. London: Churchill 1960.
- , and D. G. SCARPELLI: Intramitochondrial localization of oxidative enzyme systems. *Exp. Cell Res.*, Suppl. **7**, 50—64 (1959).
- SCARPELLI, D. G., R. HESS and A. G. E. PEARSE: The cytochemical localization of oxidative enzymes. I. Diphosphopyridine nucleotide diaphorase and triphosphopyridine nucleotide diaphorase. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 747 (1958).
- TREMBLAY, G., and A. G. E. PEARSE: A cytochemical study of oxidative enzymes in the parathyroid oxyphil cell and their functional significance. *Brit. J. exp. Path.* **40**, 66—70 (1959).
- Histochemistry of oxidative enzyme systems in the human thyroid, with special reference to Askanazy cells. *J. Path. Bact.* **80**, 353—358 (1960).
- TRIER, J. S.: The fine structure of the parathyroid gland. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 13—22 (1958).
- WATZKA, M.: Die Onkocyten. In *Handbuch der allgemeinen Pathologie*, Bd. II/1. Berlin: Springer 1955.
- WEGELIN, C.: Die Schilddrüse. *Handbuch der speziellen pathologischen und histologischen Anatomie und Histologie*, Bd. VIII. Berlin: Springer 1926.