

Aus dem Pathologischen Institut der Universität München
(Direktor: Prof. Dr. W. BÜNGELER)

Die Entwicklung von Mucopolysacchariden und Bildung histochemisch nachweisbarer Enzyme während der Mastzellreifung

Von

A. SCHAUER und M. EDER

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 13. Oktober 1961)

Durch systematische fermenthistochemische Untersuchungen konnten wir kürzlich zeigen, daß die Mastzellen (MZ) verschiedener Tierklassen und des Menschen neben der Heparin- und Histaminbildung und Speicherung (JORGES, HOLMGREN und WILANDER 1937, RILEY 1953, RILEY und WEST 1953) mit zahlreichen Enzymsystemen ausgestattet sind (SCHAUER und EDER 1961, EDER und SCHAUER 1961).

Der Nachweis von Leucylaminopeptidase, Adenosintriphosphatase, saurer und zum Teil auch alkalischer Phosphatasen wies auf einen hohen Eiweiß- und Phosphatstoffwechsel hin und ließ die MZ im normalen ruhenden Bindegewebe als besonders spezialisierte Zellen erscheinen, die sowohl im Stoffwechsel des Bindegewebes (MAXIMOW 1904, BRODERSEN 1928, HIGGINBOTHAM, DOUGHERTY und JEE 1956) als auch bei akuten Schädigungen des Gefäß-Bindegewebes (STAEMMLER 1921, EDER und SCHAUER 1961) Bedeutung haben. Wir stellten früher bereits die Frage, ob die Enzymbildung in den MZ auf einen äußeren oder stoffwechselbedingten Reiz erfolgt, ähnlich wie dies bei den phagozytierenden Histio- und Fibrocyten der Fall ist (GEDIGK und BONTKE 1957) oder ob diese Enzyme mit der physiologischen Zellreifung nachweisbar werden, also von vorneherein zur Ausstattung der Zelle gehören. In Untersuchungen über das Verhalten der MZ bei der akuten Entzündung konnten wir für eine durch einen äußeren Reiz verursachte Enzymbildung keinen Anhalt gewinnen.

Kürzlich von KORN (1959) mitgeteilte Untersuchungen haben gezeigt, daß für die Sulfatierung des Heparins Adenosintriphosphorsäure (ATP) erforderlich ist. Dadurch war ein Hinweis gegeben, daß zwischen dem Mucopolysaccharid- und Phosphatstoffwechsel enge Beziehungen bestehen müssen. Wir stellten deshalb am Tier Paralleluntersuchungen über den Mucopolysaccharid (MPS)- und Phosphatstoffwechsel zum Zeitpunkt der MZ-Entwicklung am Ende der Schwangerschaft und in der Neugeborenenperiode an, zumal sich durch den Nachweis einer Bindungsmöglichkeit zwischen ATP und anderen Phosphaten mit Histamin ein Anhalt für Zusammenhänge im Zellstoffwechsel ergab (SCHAUER und EDER 1961).

Ferner wurde die Frage gestellt, ob sich Hinweise für die Lokalisation der histochemisch nachgewiesenen Enzyme und die Natur der Granula ergeben, und welche Beziehungen zwischen der Reifung der sauren MPS und der Histamineinlagerung bestehen.

Untersuchungsgut und Methodik

Rattenfeten wurden operativ aus schwangeren Tieren gewonnen. Hierzu wurde jeweils das Ende eines schwangeren Uterushornes mit einem oder zwei Feten abgetragen und der Stumpf wieder verschlossen. Das Alter wurde nach der Berechnung der Geburt der belassenen Feten festgestellt. Es wurden hauptsächlich Gewebstücke der Acren (Haut und Unterhautgewebe von Schnauze, Ohren und Pfoten) verwendet. Untersucht wurden Feten vom 10. Schwangerschaftstag ab bis zur Geburt und neugeborene Tiere bis zum 20. Lebenstag in lückenloser Reihenfolge. Untersuchungen über die MPS-Entwicklung und Reifung wurden mit metachromatischen Färbungen, Astrablaufärbungen und kombinierten Astrablau-PAS-Färbungen angestellt.

a) *Toluidinblau-pH-Reihe*. Das Gewebe wurde in Formol fixiert und in Paraffin eingebettet. Zur Anwendung kam die von MONTAGNA u. Mitarb. (1954), MOORE u. Mitarb. (1957) sowie SCHUBERT (1955) beschriebene Methode. Die Färbelösungen enthielten 0,1% Toluidinblau. Sie wurden mit 0,1 m Veronalacetatpuffer auf pH 2,6, 3,2, 3,6, 4,1 und 4,9 eingestellt. Die Färbezeit betrug 5 min. Der überschüssige Farbstoff wurde dann mit 0,1 m Veronalacetatpufferlösung des Farbe-pH ausgewaschen. Reaktion bei 20° C. Zum Entwässern wurden die Schnitte 2 min in 96%iges Äthanol und 2 min in einmal gewechselten Isopropylalkohol gestellt. Das Trocknen der Schnitte erfolgte zwischen Filtrierpapier. Eindecken mit reinem Cedernholzöl. Zählung der Zellzahl der gesamten Präparatfläche. Nach Entfernung des Deckglases und kurzem Einbringen in Xylol und die absteigende Alkoholreihe Färbung mit der Toluidinblaulösung des nächst höheren pH und erneute Zählung.

Da aus den Ergebnissen der Toluidinblau-pH-Reihe eventuell mit Strukturänderungen der sauren MPS zu rechnen war, prüften wir die Ergebnisse mit einem Citronensäure-Phosphat-Puffergemisch nach McILVAINE bei den gleichen pH-Einstellungen.

b) *Kombinierte Astrablau-PAS-Reaktion*. Die Astrablau-PAS-Reaktion wurde am gleichen Material durchgeführt. 0,5% Astrablau in 1%iger Essigsäure (pH 3). Färbung der entparaffinierten Schnitte für 10 min. Kurzes Abspülen in Aqua dest. Anschließend Färbung mit PAS.

c) *Fermenthistochemische Untersuchungen* wurden bei den gleichen Versuchsreihen an Kryostatschnitten durchgeführt.

1. Leucylaminopeptidasereaktion (LAP) nach NACHLAS, CRAWFORD und SELIGMAN, Inkubationszeit 1 Std.

2. Saure Phosphatase nach GOMORI, Inkubationszeit 2 Std. Azofarbstoffmethode nach PEARSE, Inkubationszeit 45 min.

3. Alkalische Phosphatase nach GOMORI, Inkubationszeit 2 Std. Azofarbstoffmethode nach PEARSE, Inkubationszeit 45 min.

4. Adenosintriphosphatase (ATPase) nach WACHSTEIN und MEISEL, Inkubationszeit 2 Std.

5. β -Glucuronidase nach BURTON und PEARSE, Inkubationszeit 12 Std.

Ergebnisse

I. Die Mucopolysaccharidreifung

In allen untersuchten Gewebsabschnitten (Haut und Unterhautbindegewebe aus den Bereichen der Pfoten, Schnauze und Ohren) werden bei Rattenfeten am 16.—17. Schwangerschaftstag, also etwa zu Beginn des letzten Viertels der Schwangerschaft im lockeren Bindegewebe in der Toluidinblaufärbung MZ nachweisbar. Sie gehen, wie auch schon MAXIMOW (1910) und ALFEJEV (1924) zeigen konnten, aus rundlichen bis ovalen reticulären Zellen hervor und enthalten zunächst nur wenige metachromatische Granula, die meist in der Zellperipherie lokalisiert sind, also häufig in Kreis- oder Hufeisenform erscheinen. Die Frühphase der Entwicklung ändert sich nicht wesentlich bis kurz vor der Geburt (Abb. 1a).

Alle MZ sind in den Frühphasen bereits deutlich PAS-positiv, wobei das PAS-positive Material teils in homogener, teils in feinkörniger Form ebenfalls

hauptsächlich in den äußeren Zellabschnitten lokalisiert ist. Gleichzeitig mit dem Auftreten der Metachromasie in der Toluidinblaufärbung wird auch die Astrablaufärbung (PICH 1957) positiv, die zwar das Vorhandensein stark saurer Gruppen (SO_3H -Gruppen) voraussetzt, jedoch nicht eine entsprechend dichte Anordnung, wie sie für das Zustandekommen der Meta-

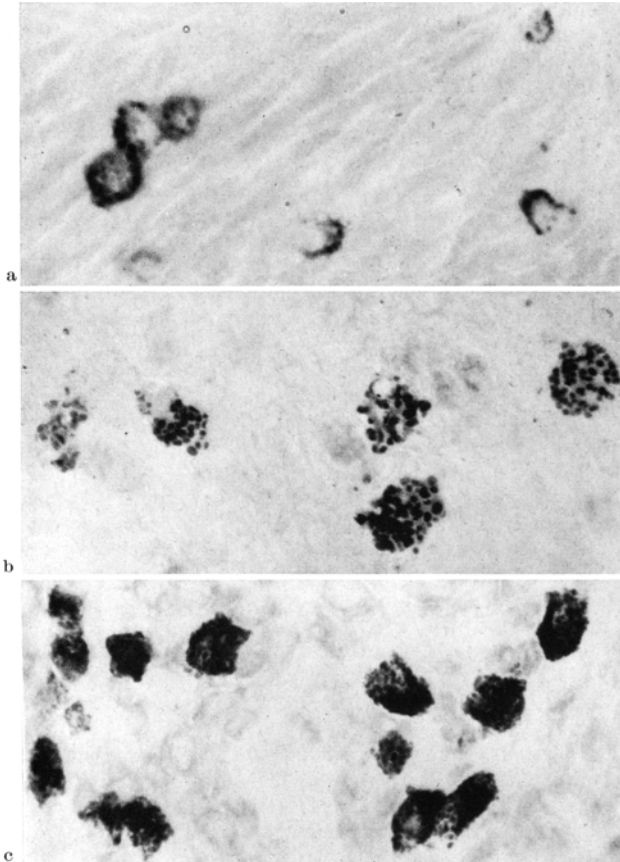


Abb. 1a—c. Reifungsstadien der Mastzellen durch Nachweis der metachromatischen Granula. Vergr. 750fach. a Bei einem 20 Tage alten Rattenfeten. Die Granula sind hauptsächlich in der Peripherie der Zellen lokalisiert. b Bei einer neugeborenen Ratte. Die Zahl der Granula hat bereits stark zugenommen. c Bei einer 5 Tage alten Ratte. Die Granula sind sehr dicht in den Zellen gelagert. Daneben finden sich einzelne jüngere Mastzellen mit etwas geringerer Anzahl von Granula

chromasie erforderlich ist. Ebenso wie die metachromatisch färbbare Substanz ist auch das mit Astrablau anfärbbare Material besonders in den äußeren Zellabschnitten zu finden und reicht in die Zellfortsätze hinein. In diesen frühen Entwicklungsstadien ist keine sichere granuläre Anordnung erkennbar. Erst kurz vor der Geburt finden sich astrablaupositive neben PAS-positiven Granula in den Zellen. Bei mehreren Tagen alten Tieren und bei erwachsenen Tieren sind die Granula der meisten Zellen stark astrablaupositiv. Kombinierte Toluidinblau - Astrablaufärbungen in den perinatalen und postnatalen Entwicklungsstadien ergeben eine deutlich metachromatische Anfärbung der Granula mit Toluidinblau in der üblichen Weise. Daneben finden

sich bei den neugeborenen Tieren in den Zellen aber auch Granula, die mit der typischen leuchtendblauen Farbe des Astrablau, nicht aber mit Toluidinblau angefärbt sind. Die Zahl der erkennbaren MZ ist zunächst in allen Geweben außerordentlich gering. Sie nimmt vom Zeitpunkt des ersten Nachweises bis wenige Tage nach der Geburt kontinuierlich zu. Ebenso sind die MZ in den späteren Entwicklungsstadien wesentlich stärker granuliert (Abb. 1b und c).

In den ersten Tagen nach der Geburt ist die Zellzahl, bezogen auf die Fläche, in vielen Gewebsabschnitten größer als beim erwachsenen Tier. Die Zellreifung und Zunahme vollzieht sich offenbar schubweise in Korrelation zum örtlichen

Gewebswachstum. Da somit der Zeitpunkt des ersten Auftretens der sauren MPS festgelegt war und durch die Anwendung verschiedener Färbungen Aufschlüsse über die MPS-Reifung in den MZ erhalten wurden, wurde versucht, in weiteren Untersuchungen zusätzliche Anhaltspunkte über die MPS-Reifung während der fetalen Zeit und nach der Geburt zu erhalten. Ein Einblick in die perinatale MPS-Entwicklung und den Verlauf der Sulfurierung schien uns besonders wichtig im Vergleich mit der Enzymentwicklung und dem Ansteigen des Histamingehaltes. Wir prüften deshalb vom Zeitpunkt des ersten Nachweises der MZ an, bis zum 20. Tag der Neugeborenenperiode das Verhalten der MZ in Toluidinblaulösungen mit abgestuftem p_H (Abb. 2a—c). Dabei ergab sich bei den Feten des 18.—20. Schwangerschaftstages bei Abnahme der Wasserstoffionenkonzentration von p_H 2,6 auf 3,2—3,6 eine Zunahme der zählbaren MZ. In den auf p_H 3,2 bzw. 3,6 folgenden Einstellungen mit höherem p_H trat regelmäßig eine deutliche Verminderung der zählbaren Zellzahl ein. Wir führen diesen bei den Feten der erwähnten Entwicklungszeit erhobenen Befund darauf zurück, daß in den Färbungen bei niedriger Wasserstoffionenkonzentration auch eine stärkere orthochromatische Anfärbung der MZ eintritt, die die anfangs schwache Metachromasie überdecken kann. Der Einwand, daß durch die wiederholte Färbung bei den fetalen Zellen Stücke des Schnittes oder auch nur einzelne Zellen verlorengehen, etwa beim Abtrocknen mit Fließpapier oder durch die wiederholte Tinkturierung mit Farbstofflösungen oder Lösungsmitteln wurde durch die Auszählung an Serienschritten widerlegt, wobei die aufeinanderfolgenden Schnitte einer Serie jeweils bei dem um eine Stufe höheren p_H gefärbt wurde. Auch hier ergab sich nach einem Anstieg der zählbaren MZ-Zahl nach der 2.—3. p_H -Stufe eine Abnahme der metachromatischen Zellen unter die Ausgangszahl, die bei p_H 2,6 gezählt wurde. Daß dieser nur schwer erklärbare Befund nicht durch eine Substanz des Puffers verursacht wird, konnte durch Paralleluntersuchungen mit einem Citronensäure-Phosphatpuffergemisch (McILVAINE) bewiesen werden. Auch hier nahm die zählbare MZ-Zahl in der p_H -Reihe nach der 2.—3. p_H -Stufe deutlich ab, meist sogar unter den bei p_H 2,6 gezählten Ausgangswert.

Kurz vor der Geburt steigt die Zahl der zählbaren MZ bei den niedrigen Wasserstoffionenkonzentrationen, also bei höheren p_H -Stufen, stark an. Dieser steile Anstieg bedeutet, daß in zunehmendem Maße MPS mit steigender Anzahl saurer Valenzen vorliegen.

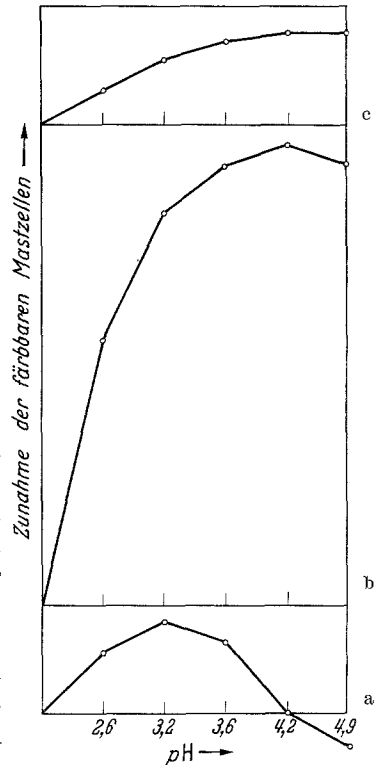


Abb. 2a—c. Relative Zunahme der Mastzellen verschiedener Entwicklungsstufen von Ratten bei Färbung mit abgestuften Toluidinblau- p_H -Lösungen. a Mittelwert der Ergebnisse an frühfetalen Mastzellen. b Mittelwert der Ergebnisse an Mastzellen kurz vor und nach der Geburt. c Mittelwert der Ergebnisse bei Ratten vom 5.—20. Lebenstag

Unmittelbar vor der Geburt und in der Folgezeit verändern sich die Verhältnisse schlagartig. Bei den Färbungen in Toluidinblaulösungen von ansteigendem p_H (Stufen s. Toluidinblau- p_H -Reihe) tritt jetzt entsprechend der Steigerung des p_H eine zwar nicht sehr starke, aber gleichmäßige Zunahme der zähl-

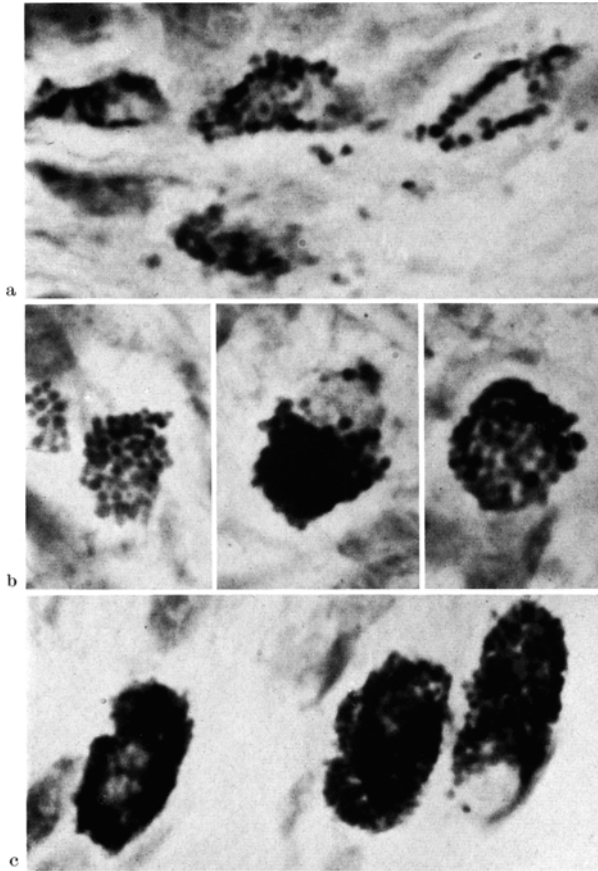


Abb. 3a—c. Leucylaminopeptidasereaktion bei verschiedenen Entwicklungsstufen der Mastzellen. Vergr. 1500fach. a Bei einem 19 Tage alten Rattenfeten. Der Reaktionsniederschlag ist an den häufig peripher angeordneten Granula lokalisiert. b Bei einer 2 Tage alten Ratte. Parallel zur Zunahme der Granula hat die Intensität des Reaktionsniederschlags in der Zelle zugenommen. c Bei einer 9 Tage alten Ratte. Weitere Zunahme der Granulazahl und der Stärke des Reaktionsniederschlags

baren MZ-Zahl ein. Die höchste Zellzahl ist in den meisten Fällen bei der dritten p_H -Stufe (3,6) erreicht. In den allerersten Tagen nach der Geburt steigt die Zellzahl auf bis zu 50—60% des Ausgangswertes an, überschreitet aber wenige Tage später den Ausgangswert nur mehr um 30%. Diese Befunde bedeuten, daß zwar schon einige Zeit vor dem Partus, aber ganz besonders kurz vor und nach der Geburt ein stärkerer Reifungsprozeß der sauren MPS einsetzt, so daß bereits in den ersten Lebenstagen eine gewisse Konstanz erreicht ist. Da jetzt die meisten Granula reich an dicht gelagerten SO_3H -Gruppen sind, werden bereits bei niedrigster p_H -Stufe fast alle Zellen dargestellt.

Die durch die Toluidinblau-Astrablau- und PAS-Färbungen erhaltenen Befunde stehen im Einklang mit den Ergebnissen der Toluidinblau- p_H -Reihe.

II. Die Enzyymbildung

Die ersten positiven Enzymreaktionen finden sich zwischen dem 17. und 18. Schwangerschaftstag, während in den metachromatischen Reaktionen diffuse Anfärbungen bereits am 16. Schwangerschaftstag beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt fällt die Leucylaminopeptidasereaktion bereits stark positiv aus. Wie bei den erwachsenen Tieren stimmt auch bei den Feten die Verteilung des Reaktionsniederschlags in den MZ mit der Verteilung der Granula überein. Ebenso wie bei den metachromatischen Färbungen tritt die Fermentreaktion zunächst

in Form einzelner Granula häufig in der Zellperipherie auf (s. Abb. 3a). Entsprechend der mit der Zellreifung fortschreitenden Zunahme der metachromatischen Granula in der Einzelzelle nimmt auch die granuläre Leucylaminopeptidase-reaktion kontinuierlich zu. Die Bilder der Fermentreaktion entsprechen in allen Phasen der Entwicklung in der Deutlichkeit der Darstellung einer Toluidinblaufärbung (Abb. 3b und c). Um darüber hinaus Einblicke in den jeweiligen Substratumsatz bei der Leucylaminopeptidasereaktion zu gewinnen, wurden in den verschiedenen Entwicklungsstadien Reaktionen mit kurzen Bebrütungszeiten (5 und 10 min) untereinander verglichen. Dabei ergab sich, daß die MZ wenige Tage vor der Geburt einen verhältnismäßig geringen Substratumsatz aufweisen, während MZ neugeborener Tiere anscheinend einen etwa gleich hohen wie die erwachsener Tiere zeigen. Daraus ist zu folgern, daß parallel zur Ausbreitung der Enzymreaktion mit der zunehmenden Zellgranulierung auch der Substratumsatz steigt.

Etwa zum gleichen Zeitpunkt wie die Leucylaminopeptidasereaktion werden bei der Entwicklung der MZ auch saure Phosphomonoesterasen nachweisbar.

Positive Reaktionen treten sowohl bei Anwendung der Diazoniummethode, als auch bei Anwendung der Gomori-Methode mit dem Nachweis der ersten toluidinblaupositiven Granula auf. Es finden sich zunächst nur wenige enzympositive Granula, die gelegentlich ebenfalls in der Zellperipherie lokalisiert sind (Abb. 4a). Parallel zur zunehmenden Zellgranulierung nimmt auch der Niederschlag des Reaktionsproduktes an den Granula zu, so daß zum Zeitpunkt der Geburt oder kurz darauf die Aktivität bereits so stark wie beim erwachsenen Tier ist (Abb. 4b und c). Sehr deutlich ist dieser Befund bei Anwendung der Diazoniummethode. Besonders im sauren Phosphatasenachweis mit der Diazoniummethode ist auffällig, daß in den frühen Entwicklungsstadien der MZ relativ große Granula sich darstellen, eine Beobachtung, die auch gelegentlich in der Toluidinblaufärbung gemacht wurde. Etwa gleichzeitig mit dem ersten Nachweis dieser Enzyme tritt auch eine relativ starke ATPase-Reaktion bei Anwendung der

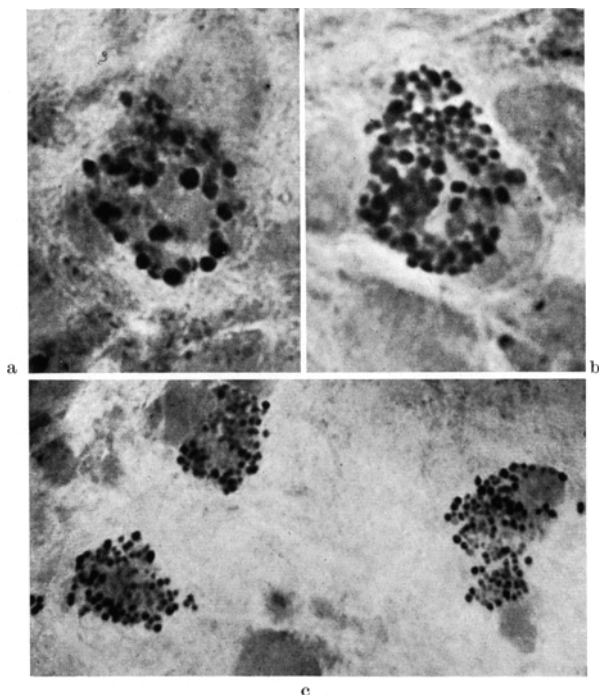


Abb. 4a—c. Saure Phosphomonoesterasereaktion (Diazoniummethode). a u. b Vergr. 1800fach, c Vergr. 1000fach. a Bei einem 20 Tage alten Feten. b Bei einer 2 Tage alten Ratte. c Bei einer 6 Tage alten Ratte. Der Reaktionsniederschlag verhält sich entsprechend der Zunahme und Lokalisation der Granula

Methode nach WACHSTEIN und MEISEL auf. Das Reaktionsprodukt scheint wie bei der Leucylaminopeptidasereaktion oder der sauren Phosphatase an den Granula lokalisiert (Abb. 5). Mit der MZ-Reifung findet auch hier eine Zunahme des Reaktionsniederschlags an den Granula statt.

Wie bei erwachsenen Ratten, so ist auch beim Feten der Nachweis von alkalischer Phosphatase sehr schwierig. Da auch hier nur mit der Gomori-Methode, nicht aber mit der Diazoniummethode eine positive Reaktion erhalten wurde, bestanden berechtigte Zweifel, ob es sich hier wirklich um eine Enzymreaktion handelt, oder ob hier unspezifische Niederschläge eine positive Reaktion vortäuschen. Bei Kontrollversuchen zeigte sich, daß auch ohne Substrat teils feingranuläre, teils amorphe Niederschläge auftreten. Sie sind auch bei Behandlung

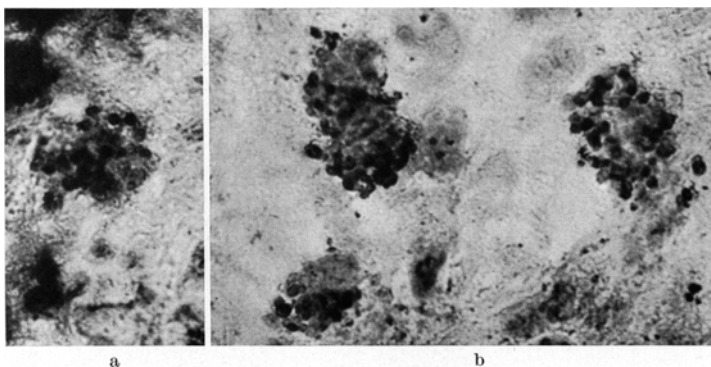


Abb. 5a u. b. ATP-ase-Reaktion nach WACHSTEIN und MEISEL. a Bei einem 20 Tage alten Rattenfeten. Der Reaktionsniederschlag ist entsprechend der Zahl der Granula gering. b Bei einer 1 Tag alten Ratte. Vergr. 1000fach

der Präparate lediglich mit Cobaltnitrat und Ammonsulfid zu beobachten, so daß es sich hier nicht um eine enzymatische, sondern rein chemische Bindungsreaktion mit sauren Gruppen handelt. Darüber hinaus findet sich aber in den MZ eine hitzeinhibierbare enzymatische Reaktion für alkalische Phosphatase mit deutlichem an die Granula gebundenem Niederschlag. Diese Unterschiede sind an MZ neugeborener Ratten deutlich ausgeprägt.

Da mit der Diazoniummethode für alkalische Phosphatase bei den erwachsenen Tieren keine oder nur eine zweifelhafte Reaktion erhalten wurde, prüften wir die Diazoniumreaktion noch an fetalen und neugeborenen Ratten unter Verwendung anderer Diazoniumsalze (Variaminblau B, Echtviolettsalz B, Echtrotsalz ITR, Fast Garnet GBC, Echtgranatblau GBC). Dabei ergab sich an einzelnen Zellen ein geringer granulärer Niederschlag. Bei Nachfärbung der gleichen Stellen mit wäßriger Toluidinblaulösung zeigte sich jedoch, daß diese positiven Zellen keine metachromatischen Granula enthielten. An den zahlreichen mit Toluidinblau nachträglich angefärbten MZ fand sich niemals eine positive Enzymreaktion. Somit erhalten die MZ der Feten und neugeborenen Ratten nur eine sehr geringe alkalische Phosphataseaktivität, die nur mit der Gomori-Methode zum Ausdruck kommt.

Mit der histochemischen β -Glucuronidasereaktion konnten zwar nicht regelmäßig, jedoch mehrfach positive Reaktionen in den MZ nachgewiesen werden. Während der Entwicklung der MZ fanden sich am 19. Schwangerschaftstag erst-

malig positive Reaktionen. Die Anordnung des Reaktionsniederschlags entspricht auch hier der Verteilung der Granula.

Besprechung der Ergebnisse

Über die Bindung von sauren MPS, insbesondere von Heparinen an Strukturen der MZ-Granula besteht nach eingehenden Untersuchungen zahlreicher Autoren (HOLMGREN und WILANDER 1937, JORPES, HOLMGREN und WILANDER 1937, OLIVER u. Mitarb. 1947, EHRICH 1949) kein Zweifel mehr. BENDITT (1958) errechnete die Heparinmenge der Ratten-MZ mit 2,7—4,6% des MZ-Volumens. Andererseits tauchen in der Literatur nur kurze Angaben über den Nachweis neutraler MPS in den MZ auf. Nach JORPES, WERNER und ÅBERG (1948) ist das PAS-positive Material in den Granula lokalisiert. Ohne daraus Folgerungen zu ziehen, sind sich die Autoren (PEARSE 1953, RILEY und WEST 1953, GLEGG, CLERMONT und LEBLOND 1952, BRAUN-FALCO 1955, NIEBAUER und WIEDMANN 1958) darüber einig, daß nicht alle MZ mit der PAS-Reaktion anfärbbar sind. RILEY (1953) glaubt, daß besonders die gefäßnahen MZ stärker PAS-positiv sind. Aus diesen Befunden lassen sich hinsichtlich des MPS-Stoffwechsels und der MPS-Reifung nur wenig Aussagen machen, um so mehr als die Möglichkeit besteht, daß die positive PAS-Färbung durch andere Substanzen als MPS, etwa Phospholipide bedingt ist. So glaubten wir durch systematische MPS-Färbungen während der Entwicklung der MZ an Rattenfeten und neugeborenen Ratten über die Orte und Vorgänge der MPS-Entwicklung Aufschluß zu bekommen. Unsere zur Klärung dieser Fragen angestellten Untersuchungen haben gezeigt, daß bei der Entwicklung der MZ noch bevor in nachweisbarer Menge metachromatische Substanzen auftreten, diese zunächst eine positive PAS-Färbung ergeben, die nach unserer Meinung wahrscheinlich auf neutrale MPS zurückzuführen ist. Die in Entwicklung begriffenen Zellen unterscheiden sich in Größe, Form und Intensität der PAS-Färbung anfangs nur wenig, später jedoch deutlich von den Reticulumzellen. In bei wenige Tage alten und erwachsenen Tieren angestellten PAS-Färbungen waren neben dem PAS-positiven Cytoplasma auch PAS-positive Granula zu erkennen. Es tritt also in den späteren Stadien keine grundsätzliche Änderung mehr ein.

Verglichen mit den Toluidinblaufärbungen ist die Zahl der erkennbaren MZ in der PAS-Färbung in den ganz frühen Entwicklungsstadien deutlich niedriger. Dies liegt zum Teil daran, daß sich in vielen Zellen hauptsächlich das Cytoplasma färbt, während die granuläre Struktur dadurch weitgehend überdeckt wird. Die Zellen sind in der PAS-Färbung dann oft nicht als MZ erkennbar.

Nach den Ergebnissen der PAS-Reaktion war die Entwicklung der sauren MPS von besonderem Interesse. Hierbei schien sowohl die Frage nach dem Zeitpunkt des Auftretens der sauren MPS wichtig, als auch die Frage, ob diese von Anfang an an die Granula lokalisiert sind. Die in den ersten Entwicklungsphasen angestellten Astrablau- und Toluidinblaufärbungen ergaben, daß die Astrablaufärbung zu dem gleichen Zeitpunkt positiv wird wie die Toluidinblaufärbung. Dabei setzt die Färbung mit Astrablau keine geordnete Anordnung der SO_3H -Gruppen voraus, während die Metachromasie nur eintritt, wenn die SO_3H -Gruppen zumindest in Teilen des Heparinmoleküles dicht angeordnet sind. Die

Beobachtung, daß die Astrablaufärbung zum gleichen Zeitpunkt positiv wird wie die Toluidinblaufärbung, obwohl verschiedene Mechanismen der Farbstoffbindung vorliegen, läßt sich nur so erklären, daß anscheinend von Anfang an eine geordnete Sulfurierung erfolgt. Sowohl in der Astrablaufärbung als auch in der Toluidinblaufärbung liegt in den ersten Entwicklungsstadien das saure Gruppen tragende metachromasiegebende Material auch außerhalb der Granula. Es ist bis jetzt nicht zu entscheiden, ob in diesen ersten Stadien die Granula so verletzlich sind, daß sie bei der Fixierung bereits zerstört werden, oder ob diese sauren MPS anfangs ebenfalls intergranulär lokalisiert sind. In diesem Zusammenhang schien uns von besonderem Interesse die bei der MPS-Entwicklung an den MZ erhaltenen Befunde mit dem Verhalten des Histamin- und 5-Hydroxytryptamingehaltes MZ-reicher Gewebe während der MZ-Entwicklung zu vergleichen.

Untersuchungen, durch die das Verhältnis des aus MZ-reichen Geweben extrahierbaren Heparins und Histamins festgestellt wurde, haben gezeigt, daß dieses mit dem Bindungsverhältnis der *in vitro*-Versuche übereinstimmt (WERLE und AMANN 1956). PARRAT und WEST haben festgestellt, daß bei Rattenfeten bereits mehrere Tage vor der Geburt in der Haut von Ohren, Bauch und Pfoten Histamin (10—25 γ /g Gewebe) und 5-Hydroxytryptamin (0—5 γ /g Gewebe) vorhanden ist. Kurz vor und nach der Geburt steigt der Histaminspiegel bis zu knapp 60 γ /g Gewebe und der 5-Hydroxytryptaminspiegel auf bis zu rund 30 γ /g Gewebe an. Bereits wenige Tage nach der Geburt nimmt der Gehalt der Gewebe an beiden Aminen aber wieder auf etwa die Hälfte der Höchstwerte (60 γ bzw. 30 γ) ab und stellt sich in der Folgezeit konstant auf dieses Niveau ein. Vergleicht man mit diesen Angaben die vorstehenden Befunde über die MPS-Entwicklung in den MZ, so zeigt sich, daß abgesehen von sehr geringen Aminmengen, die vor der MPS-Entwicklung schon vorhanden sind, mit dem von uns festgestellten Zeitpunkt der MZ-Entwicklung die Zunahme der Aminmengen gut mit der Reifung der sauren MPS übereinstimmt.

Dies gilt auch noch für das Verhalten innerhalb der ersten Lebenstage der Ratten. Während dagegen nach PARRAT und WEST innerhalb 15 Tagen nach der Geburt der Histaminspiegel wieder auf die Hälfte des höchsten Wertes abfällt, nimmt die Zahl der MZ gering zu oder bleibt zumindest konstant, wobei nach unseren Beobachtungen das Verhältnis der MZ-Zahl zur Umgebung des wachsenden Bindegewebes erst im späteren Verlauf im Sinne einer relativen Abnahme sich verschiebt. Auch die Ergebnisse der Toluidinblaureihenuntersuchungen stimmen hiermit überein. Möglicherweise deutet das unterschiedliche Verhalten zwischen Histamingehalt und MZ-Zahl bzw. Gehalt an sauren MPS in den späteren Entwicklungsphasen darauf hin, daß bei der entwickelten MZ nicht alle sauren Gruppen des Heparins mit Histamin besetzt sind.

In unseren früheren Untersuchungen konnten wir zeigen, daß die MZ verschiedener Tierspecies gewisse Unterschiede in der Ausstattung der histochemisch nachweisbaren Enzyme zeigen. Obwohl sich auch hierbei gewisse Anhaltspunkte über die Bedeutung der histochemisch nachweisbaren Fermente und ihre genauere Lokalisation fanden, ergab sich bei der Untersuchung der Enzyme bei der MZ-Entwicklung die Möglichkeit, hierfür weitere Befunde zu gewinnen. Als wesentliches Ergebnis möchten wir die Tatsache in den Vordergrund stellen, daß die

bei der ausgereiften MZ der Ratte nachweisbaren Enzyme schon in den frühen Entwicklungsstadien der MZ feststellbar sind. Im Vergleich zur Entwicklung der Granula zeigt sich, daß diese Fermente etwa zu dem Zeitpunkt positiv werden, wo in der MZ die Granula entwickelt werden. Das bedeutet, daß zwischen beiden Vorgängen ein enger Zusammenhang bestehen muß. Da diese Granulaentwicklung nicht gleichmäßig im gesamten Cytoplasma stattfindet, sondern zuerst nur einzelne Granula an der Zellperipherie auftreten, konnte untersucht werden, in welchem topographischen Zusammenhang Enzymlokalisierung und Granula stehen. Es ergab sich, daß die Enzyme genau der Menge und Lokalisation der Granula entsprechen. Damit bestätigt sich unsere frühere bei der Granulaausschüttung gemachte Feststellung, daß die Fermente direkt an den Granula lokalisiert sind. Diese bestehen somit nicht nur aus sauren MPS und den biogenen Aminen, sondern auch aus enzymatisch wirksamen Proteinen. Dieser Befund ist im Hinblick auf die elektronenmikroskopischen Untersuchungen von GUSEK über die Entwicklung der MZ-Granula von besonderem Interesse.

Unsere Untersuchungen über die Entwicklung der MZ bestätigen damit unsere frühere Auffassung, daß diese Fermente neben den sauren MPS und dem Histamin zu den speziellen Leistungen der MZ gehören.

Bei der Bedeutung, die den MZ bei der akuten und chronischen Entzündung zukommt, liegt nahe, zwischen den unterschiedlichen Entzündungsabläufen während der Fetalzeit und nach der Geburt Zusammenhänge zu sehen.

Zusammenfassung

Am 16.—17. Schwangerschaftstag werden bei Ratten in den Mastzellen (MZ) erstmals saure Mucopolysaccharide (MPS) nachweisbar. 1—2 Tage vorher zeigen die MZ bereits eine diffuse positive PAS-Reaktion. Die sauren MPS sind in den ersten Entwicklungsstadien diffus im Cytoplasma lokalisiert, später findet sich zunehmend eine Bindung an die Granula.

Parallel hierzu zeigt die Auszählung der mit Toluidinblau in abgestuften pH-Lösungen gefärbten MZ, daß im Frühstadium der Entwicklung nur wenige MZ stark saure MPS aufweisen. Die Zahl der bei höherem pH färbbaren MZ nimmt vor der Geburt rasch zu. Kurz nach der Geburt ist die Zunahme nur mehr gering. Die MZ zeigen also bereits einen hohen Gehalt an sauren MPS.

Die Bildung und Reifung der sauren MPS geht der von PARRAT und WEST gefundenen Histamineinlagerung in MZ-reichen Geweben parallel. Dieser Befund stellt die Voraussetzung für eine intracelluläre salzartige Heparin-Histaminbindung dar.

Alle bei erwachsenen Tieren in den MZ histochemisch nachweisbaren Fermente treten bei der MZ-Entwicklung bereits mit der Bildung der Granula in Erscheinung.

Summary

Acid mucopolysaccharides (MPS) are first demonstrable in the mast cells (MZ) in rats on the 16th—17th day of pregnancy. One to two days before this, the mast cells give a diffuse, positive PAS reaction. In the first stages of development the acid MPS are diffusely distributed in the cytoplasm; later they localize in increasing amounts at the granules. Parallel to this, in studies in which the

number of mast cells staining with toluidine blue in solutions of graduated pH are counted, in the early stage of development only few mast cells show a strong acid MPS reaction. The number of mast cells staining at higher pH rapidly increases before birth. Shortly after birth the increase is only slight. The mast cells show an increased content of acid MPS. The formation and maturation of the acid MPS parallels the deposition of histamine, as found by PARRAT and WEST in mast-cell-rich tissues. These results represent the conditions for an intracellular salt-like heparin-histamine union. In adult animals all of the histochemically demonstrable enzymes in the mast cells appear with the formation of granules.

Literatur

- ALFEJEV, S.: Die embryonale Histogenese der Zellformen des lockeren Bindegewebes der Säugetiere. *Folia haemat.* (Lpz.) **30**, 111 (1924).
- BENDITT, E. P.: Morphology, chemistry and function of mast cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **73**, 204 (1958).
- BRAUN-FALCO, O.: Morphologische und pharmakologische Untersuchungen zur Frage der Histaminabgabe durch Mastzellen. *Arch. Derm. Syph.* (Berl.) **199**, 197 (1955).
- BRODERSEN, J.: Die Zellen des Unterhautbindegewebes der weißen Maus. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **14**, 60 (1928).
- EDER, M., u. A. SCHAUER: Fermenthistochemische und experimentelle Untersuchungen an Gewebsmastzellen. *Beitr. path. Anat.* **124**, 251 (1961).
- GEDIGK, P., u. E. BONTKE: Über die Enzymaktivität im Fremdkörpergranulationsgewebe. *Virchows Arch. path. Anat.* **330**, 538 (1957).
- GLEGG, R. E., Y. CLERMONT and C. P. LEBLOND: Use of lead tetraacetate, benzidine, o-dianisidine and "film test" in investigation periodic-acid-Schiff-technic. *Stain Technol.* **27**, 277 (1952).
- GUSEK, W.: Zur Ultrastruktur und Genese von Mastzellen und Mastzellengranula. *Proc. Eur. Reg. Conf. on Electron Microscopy Delft*, vol. II, p. 912. 1960.
- HIGGINBOTHAM, R. D., T. F. DOUGHERTY and W. S. S. JEE: Fate of shed mast cell granules. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **92**, 256 (1956).
- HOLMGREN, H.: Beitrag zur Frage der Genese der Ehrlichschen Mastzellen. *Acta anat. (Basel)* **2**, 40 (1946).
- , u. O. WILANDER: Beitrag zur Kenntnis der Chemie und Funktion der Ehrlichschen Mastzellen. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **42**, 242 (1937).
- JORPES, E., H. HOLMGREN u. O. WILANDER: Über das Vorkommen von Heparin in den Gefäßwänden und in den Augen. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **42**, 279 (1937).
- B. WERNER and B. ÅBERG: The fuchsin sulphurous acid test after periodate oxidation of heparin and allied polysaccharides. *J. biol. Chem.* **176**, 277 (1948).
- KORN, E. D.: The enzymatic sulfation of heparin. *J. biol. Chem.* **234**, 1647 (1959).
- MAXIMOW, A.: Über entzündliche Bindegewebsneubildung bei der weißen Ratte und die dabei auftretenden Veränderungen an Mastzellen und Fettzellen. *Beitr. path. Anat.* **35**, 93 (1904).
- Untersuchungen über Blut und Bindegewebe. III. Die embryonale Histogenese des Knochenmarks der Säugetiere. Entstehung der Mastzellen. *Arch. mikr. Anat.* **76**, 63 (1910).
- MONTAGNA, W., A. Z. EISEN and A. S. GOLDMAN: The tinctorial behaviour of human mast-cells. *Quart. J. micr. Sci.* **95**, 1 (1954).
- MOORE, R. D., and P. D. SCHOENBERG: Studies on connective tissue. *Arch. Path. (Chicago)* **64**, 39 (1957).
- NACHLAS, M. M., D. T. CRAWFORD and A. M. SELIGMAN: The histochemical demonstration of leucine-aminopeptidase. *J. Histochem. Cytochem.* **5**, 264 (1957).
- NIEBAUER, G., u. A. WIEDMANN: Zur Histochemie des neurovegetativen Systems der Haut. *Acta neuroveg. (Wien)* **18**, 280 (1958).

- OLIVER, J., F. BLOOM and C. MAGNIERI: On the origin of heparin, an examination of the heparin content and the specific cytoplasmic particles of the neoplastic mastcells. *J. exp. Med.* **86**, 107 (1947).
- PARRATT, J. R., and G. B. WEST: Influence of age on tissue histamine and 5-hydroxytryptamine. *J. Physiol. (Lond.)* **133**, 71 (1957).
- PEARSE, A. G. E.: *Histochemistry*, 2. Aufl. London: Churchill 1960.
- PIOCH, W.: Über die Darstellung saurer Mucopolysaccharide mit dem Kupferphthalocyaninfarbstoff Astrablau. *Virchows Arch. path. Anat.* **330**, 337 (1957).
- RILEY, J. F.: Histamine in tissue mast cells. *Science* **118**, 332 (1953).
- The mastcells. Edinburgh and London: E. and S. Livingstone 1959.
- , and G. B. WEST: The presence of histamine in tissue mastcells. *J. Physiol. (Lond.)* **120**, 528 (1953).
- SCHAUER, A., u. M. EDER: Nachweis und Bedeutung der Bindung von Histamin an Adenosin-5'-Triphosphorsäure und andere Phosphatverbindungen. *Klin. Wschr.* **39**, 76 (1961).
- STAEMMLER, M.: Untersuchung über Vorkommen und Bedeutung der histiogenen Mastzellen im menschlichen Körper unter normalen und pathologischen Verhältnissen. *Frankf. Z. Path.* **25**, 391 (1921).
- SCHOENBERG, W. D. v.: Über die Bildung und Rückbildung des subepithelial abgelagerten Amyloids der menschlichen Bläschendrüsen. *Frankfurt. Z. Path.* **59**, 477 (1948).
- SCHUBERT, J. C. F.: Differenzierungsmethode metachromatischer Zellen nach ihrem Säuregrad. *Experientia (Basel)* **12**, 346 (1955).
- WACHSTEIN, M., and E. MEISEL: The histochemical distribution of 5-nucleotidase and unspecific alkaline phosphatase in the testicle of various species and in two human seminomas. *J. Histochem. Cytochem.* **2**, 137 (1954).
- WERLE, E., u. R. AMANN: Zur Physiologie der Mastzellen als Träger des Heparins und Histamins. *Klin. Wschr.* **34**, 624 (1957).

Dr. A. SCHAUER und Priv.-Doz. Dr. MAX EDER,
Pathologisches Institut der Universität, München 15, Thalkirchner Straße 36