

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Heidelberg

Fermenthistochemische Untersuchungen des Lymphknotens*

IV. Mitteilung**

Esterase in Schnitt und Ausstrich

Von

K. LENNERT, H. LÖFFLER und F. GRABNER

Mit 10 Textabbildungen, davon 1 farbigen

(Eingegangen am 19. Januar 1962)

In vorausgegangenen Arbeiten haben wir die Ergebnisse unserer Untersuchungen über die histochemische Verteilung der alkalischen Phosphatase (LENNERT, LÖFFLER u. LEDER), der Adenosintriphosphatase und 5-Nucleotidase (LENNERT und RINNEBERG, RINNEBERG und LENNERT) in Lymphknotenschnitt- und -ausstrich mitgeteilt. In der vorliegenden Studie soll über die histochemische Verteilung der unspezifischen Esterasen im Lymphknoten, wie sie mit den Substraten α -Naphthylacetat und Naphthol-AS-Acetate nachweisbar ist, berichtet werden. Ein Teil der hier vorgelegten Befunde wurde bereits kurz 1959 mitgeteilt (LENNERT und LÖFFLER).

Über den histochemischen Nachweis unspezifischer Esterasen und Lipasen in Lymphknoten haben bisher nur wenige Autoren berichtet (GOMORI 1946, NACHLAS und SELIGMAN 1949, ACKERMAN u. Mitarb. 1951, GÖSSNER 1955, 1958, BRAUNSTEIN u. Mitarb. 1957, 1958, BRAUNSTEIN 1960). Ein Teil dieser Untersuchungen wurde im Rahmen der Erprobung neuer Methoden durchgeführt oder erwähnt das lymphatische Gewebe nur am Rande.

Mit dem Gehalt an Esterasen in Zellen des reticulohistiocytären Systems befaßten sich die folgenden Autoren: CHESICK (1953), GOMORI (1953 b, 1955), PEARSE (1956), STEIGLEDER und LÖFFLER (1956), GEDIGK und BONTKE (1957), PEARSON und DEFENDI (1957), STEIGLEDER und SCHULTIS (1957 a und b), WELLS (1957, 1958) GÖSSNER (1958), GEDIGK und FISCHER (1960), LÖFFLER (1960 b, 1961), MOLONEY u. Mitarb. (1960), MITUS u. Mitarb. (1961).

Material und Methoden

Es wurden 75 lebensfrische Lymphknoten untersucht. Sie entstammten zum größten Teil dem Eingangsmaterial des Pathologischen Institutes der Universität Frankfurt a. M., einige wurden von Operationspräparaten sofort nach der Exstirpation entnommen. Die Diagnosen sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Die Lymphknoten wurden halbiert, von den Schnittflächen wurden Tupfpräparate angefertigt. Eine Hälfte wurde in der üblichen Weise histologisch weiter verarbeitet, die andere in 2—3 mm dicke Scheiben geschnitten und in neutralem Chloralhydrat-Formol 12—16 Std lang bei 4° C fixiert. Der Zusatz von 1‰ Chloralhydrat zur Formollösung (in unserem Falle 4 %ig) gewährleistet eine bessere Ferment- und Strukturerhaltung (FISHMAN und BAKER, BAKER und FISHMAN). Nach der Fixation wurden die Gewebsstücke etwa 1 Std unter fließendem Leitungswasser gespült. Gefrierschnitte wurden

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

** I. Mitteilung (Alkalische Phosphatase in Schnitt und Ausstrich): Virchows Arch. **334**, 399—418 (1961); II. Mitteilung (Adenosintriphosphatase und 5-Nucleotidase im Schnitt): Klin. Wschr. **1961**, 923—924; III. Mitteilung (Adenosintriphosphatase und 5-Nucleotidase im Ausstrich): Klin. Wschr. **1961**, 971.

etwa $10\ \mu$ dick geschnitten, auf entfettete Objektträger aufgezogen und luftgetrocknet, bevor sie weiter verarbeitet wurden. Einige Schnitte wurden flottierend durch die Lösungen geführt. Bei schlecht schneidbaren Geweben bewährte es sich, erst nach dem Schneiden zu wässern. Die luftgetrockneten Tupfpräparate fixierten wir 30 sec in der oben angegebenen Fixationslösung, spülten in Aqua dest. und trockneten erneut. Über die Art, wie wir die Ausstriche zahlenmäßig auswerteten, wurde in der I. Mitteilung von LENNERT u. Mitarb. (1961) berichtet.

Histochemische Methoden. 1. Methode. Substrat: α -Naphthylacetat. Diazoniumsalze: Echtblausalz BB (extra conc.) (Diazoniumsalz des 4-Amino-2,5-diäthoxybenzanilid), Echt-

Tabelle 1. *Untersuchungsgut*

Diagnose	Zahl der untersuchten Fälle
„Unspezifische Lymphadenitis“	25
Piringersche Lymphadenitis	5
Lues I u. II	2
Tuberkulose	6
Sarkoidose	5
Paramyloidose	1
Lupus erythematodes	1
Lymphogranulomatose	10
Lymphosarkom und Leukosarkomatose	5
Paramyeloblastenleukämie	1
Monocytenleukämie	1 ¹
Morbus Brill-Symmers	2
Maligne Reticulose und Reticulosarkom	5
Carcinommetastase	6
Insgesamt	75

¹ Bioptisch und autoptisch untersucht.

rotsalz TR (Chlorzinkdoppelsalz des 5-Chlor-o-toluidin), Echtgranatsalz GBC (Diazoniumsalz des o-Aminoazotoluol). Inkubation: $pH\ 7,8-8,0$, $20^\circ C$, 3—15 min.

2. Methode. Substrat: Naphthol-AS-Acetat. Diazoniumsalze: Echtgranatsalz GBC, Echtblausalz BB (extra conc.). Inkubation: $pH\ 6,9$, $20^\circ C$, 20—60 min.

Die Kerne wurden 4 min mit Mayers Hämalaun gefärbt, die Präparate mit Gelatinol eingedeckt.

Kontrollen. Schnitte und Ausstriche wurden nach Hitzeinaktivierung (Wasser $100^\circ C$, 10 min) oder ohne Substrat inkubiert. In beiden Fällen erfolgte keine Reaktion.

Weitere Einzelheiten der von uns benutzten Technik sind an anderer Stelle veröffentlicht worden (LÖFFLER 1960a).

Bei den *Hemmversuchen* wurden die Schnitte und Ausstriche vor Durchführung der histochemischen Reaktion 1 Std lang in die wäßrige Lösung des Hemmstoffes eingestellt. Die reversiblen Inhibitoren Physostigmin und Natriumfluorid setzten wir dem Inkubationsgemisch zu; dagegen wurden der irreversible Hemmstoff E 600 und Silbernitrat, das wir mit PEPLER u. PEARSE ebenfalls als irreversiblen Hemmstoff ansehen, dem Inkubationsgemisch nicht beigelegt.

Benutzte Inhibitoren. E 600 (Diäthyl-p-nitrophenylphosphat) Konz. 10^{-6} M; NaF (Natriumfluorid) Konz. 2×10^{-3} M; Physostigminsalicylat Konz. 10^{-5} M; $AgNO_3$ Konz. 2×10^{-3} M; L-Cystein-hydrochlorid Konz. 10^{-3} M.

Während NaF und E 600 bei Benutzung von Naphthol-AS-Acetat zur Differenzierung der drei Gruppen der menschlichen Esterasen (GOMORI 1955) und Physostigmin zum Ausschluß der Cholinesterasen dienen sollten, hofften wir, mit $AgNO_3$ und Cystein einen Hinweis zu erhalten, ob sich unter den im menschlichen Lymphknoten aktiven Esterasen auch solche mit Peptidasenatur befänden.

Ag-Ionen hemmen Amino-peptidase, Dipeptidase und Prolinase (ABDERHALDEN und MERKEL). Cystein gilt als Aktivator für Cathepsin. PEPLER und PEARSE (1957a und b) benutzten es zusammen mit 5-Bromindoxyl-o-acetat. Setzten wir Cystein den von uns verwendeten Inkubationsmedien zu, so kam es zu einer grobflockigen Ausfällung und zur Farbänderung des Reaktionsgemisches, so daß wir auf eine Untersuchung mit dieser Substanz verzichteten.

Zur Kontrolle der Hemmwirkung wurden ein Schnitt und ein Ausstrich 1 Std lang in Aqua dest. gebracht und danach wie die übrigen Präparate weiterbehandelt.

Ergebnisse

Vorbemerkungen. Bei unseren Untersuchungen bewährte sich am besten die α -Naphthylacetat-Technik in Kombination mit den Kupplungspartnern Echtblausalz BB (extra conc.) und Echtrotsalz TR. Aber auch die Kombination mit Echtgranatsalz GBC liefert besonders im Tupfpräparat gute Bilder; die Kupplungsgeschwindigkeit ist mit diesem Salz etwas schneller, dafür ist die Untergrundfärbung stärker, was bei schwach positiven Strukturen zu Schwierigkeiten führen kann.

Die Naphthol-AS-Acetat-Technik in der Modifikation von PEARSE (1954) liefert bessere Resultate als die Originalmethode von GOMORI (1952) oder die Modifikation von BURSTONE (1956). Der am besten geeignete Kupplungspartner ist Echtblausalz BB (extra conc.); mit Echtgranatsalz GBC, das ursprünglich empfohlen worden war, entstehen recht grobe nadel-förmige Kristalle, die eine sichere Lokalisation der Enzymaktivität erschweren.

Gelegentlich sahen wir bei der für die übrigen

Lymphknotenstrukturen günstigsten Inkubationszeit im Cytoplasma der neutrophilen und eosinophilen Granulocyten und der Lymphocyten einige Granula des Reaktionsproduktes. Da — besonders im Schnitt — nicht mit genügender Sicherheit Artefakte ausgeschlossen werden konnten, haben wir diese Zellen im Rahmen dieser Arbeit als esterasenegativ gewertet.

Tabelle 2. *Esterase im Lymphknotenschnitt bei Entzündungen und Lymphogranulomatose*

Lymphknotenstrukturen und Zelltypen	Substrate	
	α -Naphthylacetat	Naphthol-AS-Acetat
Primär- und Sekundärfollikel ¹		
Germinoblasten	0	0
Lymphocyten	0	0
Reticulumzellen und Kerntrümmerphagen	++	++
Pulpa		
RHS-Zellen	+ bis ++	(+) bis ++
Epitheloidzellherde	++	+ bis ++
Gewebsmastzellen	0 bis (+)	+
Restgewebe	0	0
Sinus		
Retothelien	+ bis ++	(+) bis ++
Unreife Histocyten	0	0
Leukocyten	0 bis (+)	0 bis (+)
Gewebsmastzellen	0 bis (+)	+
Gefäße	±	±
Fibroblasten	0 bis (+)	0 bis (+)
Tuberkel		
Epitheloidzellen	+ bis ++	(+) bis ++
Langhanssche Riesenzellen	++	++
Tuberkulöse Käseherde		
Epitheloidzellen	(+) bis ++	0 bis ++
Langhanssche Riesenzellen	++	++
Käse	0	0
Hodgkinzellen	0 bis +	0 bis (+)
Sternbergsche Riesenzellen	0 bis +	0 bis (+)

Zeichenerklärung: 0 = negativ; (+) = schwach positiv; ± = zum Teil positiv in wechselnder Stärke; + positiv; ++ = stark positiv.

¹ Häufig fand sich in den Keimzentren eine schwache bis deutliche *intercelluläre* Reaktion.

I. Esterasen im Lymphknotenschnitt (s. Tabelle 2)

Wir untersuchten 25 Lymphknoten, deren histologische Untersuchung die Diagnose „*unspezifische Lymphadenitis*“ ergeben hatte. Mit dem Substrat α -Naphthylacetat (fortan α -N) sahen wir in allen Fällen eine starke Aktivität im Cytoplasma der Sinusretothelien, so daß die Reaktion bei starkem Sinuskatarrh schon makroskopisch zu erkennen war. Auch im schmalen Cytoplasma der die Sinus auskleidenden Zellen war eine Anfärbung erkennbar; sehr eindrucksvoll stellte sich die Esteraseaktivität der abgelösten Sinusretothelien dar, welche bei dieser

Methode häufig ein scharf begrenztes, abgerundetes Cytoplasma zeigen, das vom Reaktionsprodukt vollständig ausgefüllt wird (Abb. 1 und 2). Dieser Befund gilt

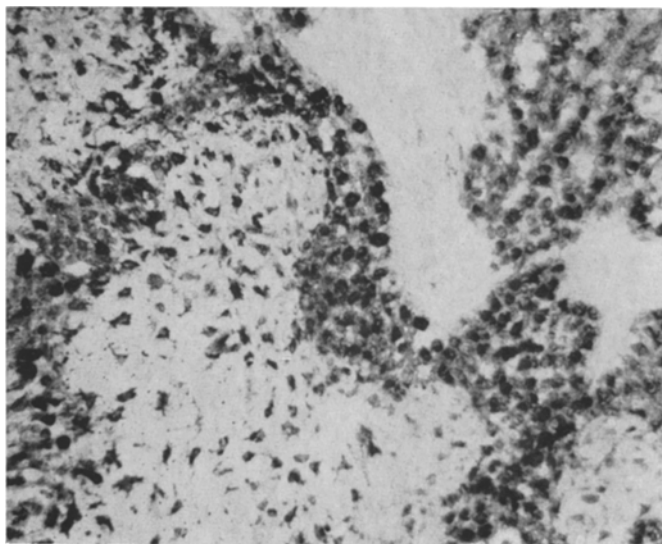


Abb. 1. Sinuskatarrh. Beachte den unterschiedlichen Esterasegehalt in den Retothelien der Sinus: Große abgerundete, tiefschwarze Retothelien neben grauschwarzen verzweigten Retothelien. Die Reticulumzellen der Pulpa sind gut in ihrer variablen Zellform erkennbar. Unspezifische Lymphadenitis. E 7180/60. α -N-Esterase. 125 \times

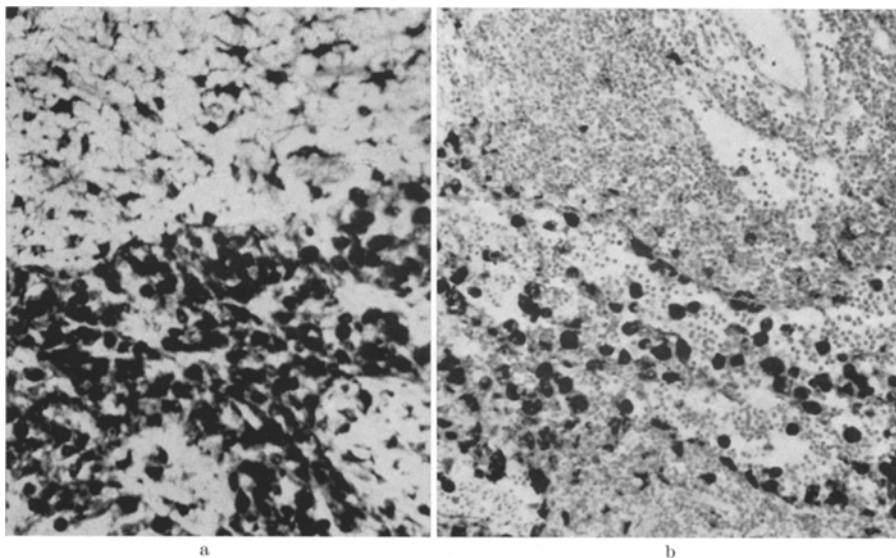


Abb. 2a u. b. Sinuskatarrh und Sinuslymphocytose („Ausschwemmung“). Jeweils unten Sinus, oben Pulpa. Bei a hochaktive abgerundete Retothelien in den Sinus. In der Pulpa zahlreiche große, dendritenartig verzweigte Reticulumzellen. Unspezifische Lymphadenitis E 149/60. Bei b zwischen den aktiven abgelösten Retothelien zahlreiche Lymphocyten. In der Pulpa nur vereinzelt relativ kleine Reticulumzellen. Paragranulom. E 6915/59. Jeweils α -N-Esterase, 125 \times

besonders für den akuten Sinuskatarrh, während die „syncytialen“ Retothelien bei chronischem Katarrh nicht immer derartig scharf abgegrenzt und gelegentlich

etwas schwächer angefärbt sind. Oft sind stark positive abgerundete und schwächer positive „syncytiale“ Retothelien im gleichen Sinus nebeneinander vorhanden. Dieses dürfte Ausdruck der unterschiedlichen Aktivität der Sinuszellen sein: Hochaktive Zellen runden sich ab und gehen schließlich zugrunde, weniger aktive Zellen behalten ihre „syncytiale“ Form bei (Abb. 1).

Sehr schön stellen sich die bei üblicher HE-Färbung kaum hervortretenden Reticulumzellen der Pulpa dar, deren sternförmige Gestalt und lange Plasmafortsätze häufig gut zu sehen sind (Abb. 2a). Ihre Form und ihr Verteilungsmuster sind recht einheitlich. Außerdem fanden wir kleine Zellen in der Größenordnung der Lymphocyten mit deutlicher Plasmaaktivität; bei den üblichen Färbungen sind sie nicht von Lymphocyten zu unterscheiden. In Primär- und besonders in Sekundärfollikeln fielen stark verzweigte Reticulumzellen und Kerntrümmerphagen durch ihre äußerst kräftige Reaktion auf. Die Germinoblasten waren stets negativ.

Ein weiteres Merkmal der Keimzentren ist eine häufig nachweisbare schwache bis mäßig starke *intercelluläre* Reaktion, die im Schnitt den Eindruck eines Netzes entstehen läßt. Diesen Befund konnten wir deutlicher an Schnitten von menschlichen Milzen erheben.

Vereinzelt gelang es, Gewebsmastzellen mit sehr schwacher Fermentaktivität zu identifizieren. Fibroblasten in der Kapsel und in den Trabekeln sowie Venolen ließen gelegentlich eine schwache Reaktion erkennen.

Mit der Naphthol-AS-Acetat-Technik (fortan NAS) fiel die Reaktion im ganzen schwächer aus als mit α -N. Am deutlichsten färbten sich einige verstreute Reticulumzellen und Kerntrümmerphagen an, die Sinusretothelien reagierten ebenfalls im Durchschnitt schwächer. Die Gewebsmastzellen zeigten im Verhältnis zu den anderen Zellformen eine stärkere Enzymaktivität als mit dem Substrat α -N.

Bei der *Piringerischen Lymphadenitis* fand sich eine sehr deutliche Esteraseaktivität mit α -N in den schon bei der unspezifischen Lymphadenitis beschriebenen Strukturen. Darüber hinaus fielen die kleinen Epitheloidzellherde durch starke Anfärbung auf. Die Sekundärknötchen wiesen dieselben Veränderungen auf wie bei Follikelhyperplasie aus anderer Ursache; waren in ihnen Epitheloidzellherde vorhanden, so reagierten sie kräftig (Abb. 3b).

Die von LENNERT (1958, 1961) bei dieser Erkrankung beschriebene *unreife Sinushistiocytose* unterscheidet sich auch histochemisch deutlich vom Sinuskatarrh: die unreifen Histiocyten lassen keine Esteraseaktivität erkennen; lediglich die Sinuswandzellen und abgelösten, zwischen den Histiocyten gelegenen Retothelien zeigen die übliche kräftige Aktivität (Abb. 4).

Die Untersuchung mit dem Substrat NAS ergab keine signifikanten Abweichungen von den eben mitgeteilten Befunden. Die Reaktion war am stärksten in einigen in der Pulpa verstreuten Reticulumzellen, in den Keimzentren und in den (saftigen!) Epitheloidzellen.

Bei *epitheloidzelliger Tuberkulose* zeigten die Epitheloidzellen und besonders die Langhansschen Riesenzellen der Tuberkel die stärkste Aktivität. Die „saftigen“ Epitheloidzellen mit plump-ovalem Kern und breitem Plasma zeigten eine viel stärkere Reaktion als die lang ausgezogenen „dürren“ Epitheloidzellen mit katzenzungenantigem schlankem Kern. Reticulumzellen, Retothelien, Venolen

und gelegentlich Fibroblasten unterschieden sich nicht von den gleichen Zellen bei anderen Entzündungen.

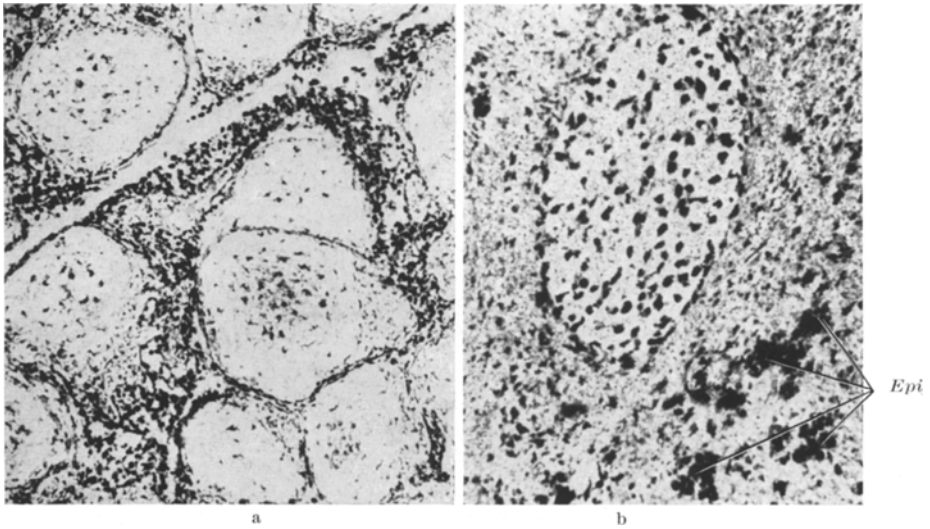


Abb. 3a u. b. Lymphknoten bei primär chronischer Polyarthrit (a) und Toxoplasmose (b). Bei a starke Reticulumzellvermehrung in der Pulpa und spärliche Reticulumzellen in den Keimzentren. Hier außerdem schwache intercelluläre Reaktion. E 10614/59. α -N-Esterase. 40 \times . Bei b Vermehrung großer Reticulumzellen in dem scharf begrenzten „nackten“ Keimzentrum. Kleine Epitheloidzellgruppen in der Pulpa (*Epi*). E 14304/58. α -N-Esterase. 50 \times

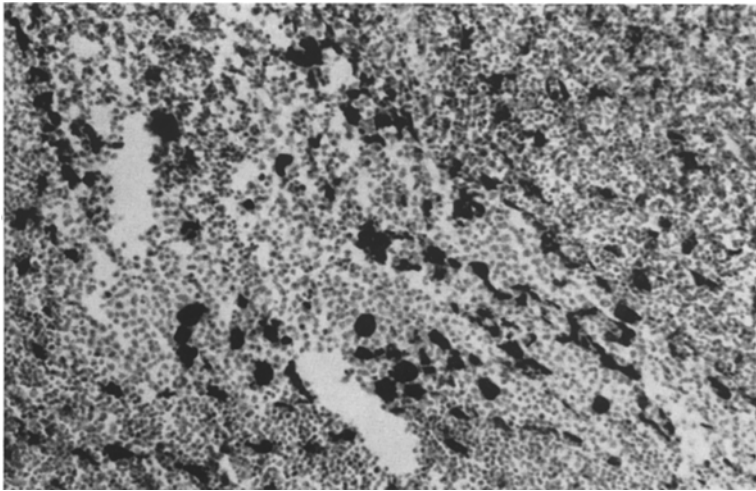


Abb. 4. Unreife Sinushistiocytose bei Píringerscher Lymphadenitis (Toxoplasmose). Die unreifen Histiocyten sind esterase-negativ. Dazwischen liegen aber einige große, stark aktive Retothelien (s. Abb. 2b). E 1504/59. α -N-Esterase. 125 \times

Fünf Lymphknoten, bei denen die Diagnose *Sarkoidose* gestellt worden war, konnten wir nur mit NAS untersuchen. Bei diesen Fällen waren keine enzym-aktiven Retothelien erkennbar. In 4 Fällen fanden sich positive Reticulumzellen in der Pulpa. Gefäße und Fibroblasten blieben ungefärbt. Die Epitheloid-

zellen der Tuberkel zeigten deutliche Aktivität, die aber von jener der Langhansschen Riesenzellen noch übertroffen wurde.

Bei 5 Fällen von *verkäsender Lymphknotentuberkulose* (Abb. 5) reagierten die Reticulumzellen im Restparenchym sehr deutlich. Die Langhansschen Riesenzellen am Rande der Verkäsung zeigten — wie bei epitheloidzelliger Tuberkulose und bei Sarkoidose — sehr starke Aktivität. Der Aktivitätsgrad der Epitheloidzellen am Rande der Verkäsungszonen war nicht einheitlich: Im Durchschnitt färbten sich die „dürren“ Zellen schwächer an, einzelne erschienen

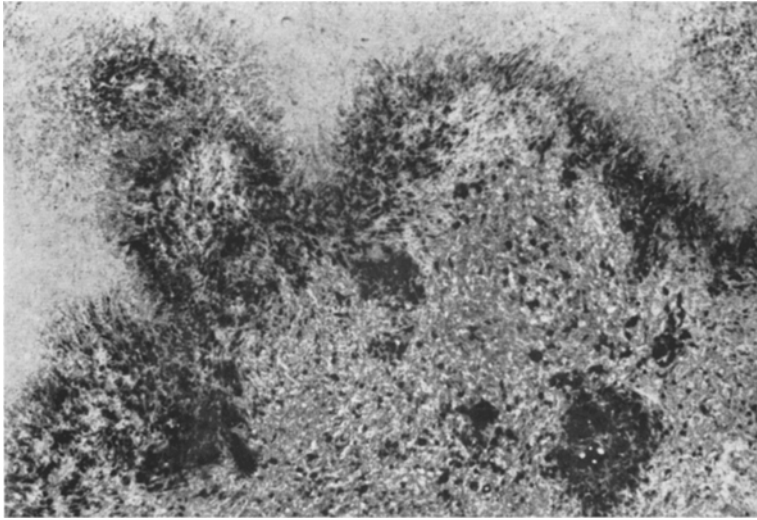


Abb. 5. Käsiges Lymphknotentuberkulose. Der Verkäsungsrand zeigt zahlreiche mäßig positive, geschwänzte Epitheloidzellen in Palisadenstellung. Die abgerundeten Epitheloidzellen der folgenden Zone und des unten rechts gelegenen Tuberkels zeigen eine stärkere Esteraseaktivität.

E 723/59. α -N-Esterase. 50 \times

sogar negativ. Der Käse selbst ließ keine Anfärbung erkennen; lediglich am Käserand war im Bereich von Kerntrümmern noch eine schwache Reaktion nachweisbar. An einigen Stellen fanden sich Inseln erhaltenen Gewebes im Käse, in denen die Reticulum- und Epitheloidzellen eine gleiche Esteraseaktivität zeigten wie im erhaltenen Gewebe. Signifikante Unterschiede zwischen der Reaktion, die mit den beiden benutzten Substraten erzielt wurde, waren nicht erkennbar. Es fiel lediglich auf, daß die Zahl der positiven Epitheloidzellen bei der Anwendung von NAS geringer war.

Bei je einem Fall von *Lues I und II* verhielten sich die Strukturen so wie bei der unspezifischen oder der Piringerschen Lymphadenitis.

Ein Lymphknoten mit *Paramyloidablagerung* ließ nur einige schwach positive Reticulumzellen in der Pulpa erkennen. Ein Lymphknoten mit Veränderungen im Sinne des *Lupus erythematodes* wies eine diffuse Anfärbung im Bereich einer großen Nekrose auf.

Die zehn untersuchten Lymphknoten mit den histologischen Veränderungen der *Lymphogranulomatose* zeigten verschiedene histologische Formen bzw. Stadien der Erkrankung: zwei Fälle waren als Paragranulom einzustufen, ein Lymphknoten wies ganz frische Veränderungen auf, drei Fälle waren gering vernalbt und bei vier Lymphknoten konnte man eine starke Fibrosierung erkennen.

Die histochemischen Veränderungen waren auch hier wieder am besten bei Anwendung der α -N-Technik nachweisbar. Während bei den Entzündungen und reaktiven Veränderungen des Lymphknotens ein relativ gleichförmiges Muster der fermentaktiven Reticulumzellen erkennbar war, fand sich bei den fortgeschrittenen Stadien der Lymphogranulomatose eine Zerstörung dieses Verteilungsmusters der Reticulumzellen. Bei den vernarbten Formen fielen die Herde des spezifischen Gewebes zwischen den fibrosierten Partien durch die oft bizarre Gestalt der esteraseaktiven Zellen auf, die hier z. T. plump, z. T. mit vielen kurzen und langen Fortsätzen versehen waren und dicht zusammenlagen. Bei stark vernarbten Fällen waren weniger fermentpositive Zellen zu finden als bei den übrigen histologischen Bildern.

Die Hodgkinzellen reagierten im Durchschnitt etwas schwächer als die Reticulumzellen und die Epitheloidzellen, es fanden sich aber auch Formen mit sehr starker Reaktion (Übergangsformen?). Die Enzymaktivität der meisten Sternbergschen Riesenzellen, die wir fanden, war gegenüber jener der Reticulum- und Hodgkinzellen vermindert, z. T. ließen sie keine Esteraseaktivität nachweisen. In den Venolen-Endothelien und gelegentlich auch in den Endothelien der Capillaren schien die Reaktion etwas stärker als bei den anderen Erkrankungen. In den Vernarbungsbezirken fand sich häufig eine schwache Anfärbung der Fibroblasten.

Die Aktivität der beiden Esterasen zeigte keine qualitativen Unterschiede. Die Sternbergschen Riesenzellen waren aber bei Anwendung von NAS in höherem Prozentsatz esterase-negativ als bei Verwendung von α -N.

Mit α -N wurden vier *Carcinom-Metastasen* (zwei Metastasen von Magen-carcinomen, je eine Metastase eines Bronchialcarcinoms und eines Adenocarcinoms unklarer Herkunft) untersucht. Die Tumorzellen der beiden Magen-carcinome ließen deutliche Esteraseaktivität erkennen, jene des Bronchialcarcinoms und des Adenocarcinoms färbten sich nur gering an. Mit dem Substrat NAS wurde noch die Metastase eines soliden Carcinoms unklarer Herkunft untersucht, wobei eine positive Reaktion der Tumorzellen erzielt wurde. Die lymphknoteneigenen Zellen verhielten sich in sämtlichen Fällen wie bei der unspezifischen Lymphadenitis.

Bei einem „sarkomatös entarteten“, *großfollikulären Lymphoblastom*, bei dem die gewucherten Zellen nur vereinzelt in Form von an Lymphfollikel erinnernden Knötchen wuchsen, war in den Tumorzellen mit α -N keine Esteraseaktivität nachweisbar. Zwischen den Tumorzellkomplexen waren positive Reticulumzellen eingestreut. Ein weiterer Fall von großfollikulärem Lymphoblastom wurde mit der NAS-Methode untersucht. Eine Anfärbung der follikulären Strukturen wurde hierbei nicht erzielt.

Die drei untersuchten *Reticulosarkome* zeigten bei der α -N-Methode ein unterschiedliches Verhalten. In zwei Fällen waren die Tumorzellen wenig ausdifferenziert und ließen keine oder nur ganz spärliche Anfärbung erkennen. Bei einem weiteren Fall, einem ausgesprochen großzelligen Reticulosarkom, fanden sich alle Übergangsformen von „normalen“ Reticulumzellen bis zu den typischen Sarkomzellen mit deutlichem basophilem Nucleolus und Cytoplasmabasophilie. In den „normalen“, ausgereiften Reticulumzellen war eine deutliche bis sehr starke Esteraseaktivität zu erkennen, welche mit zunehmender „Unreife“ der Zellen abnahm.

Dieser Unterschied war im Schnitt nicht so deutlich zu erkennen wie im Ausstrich. Immerhin war im Schnitt der größere Teil der Zellen stark angefärbt. Meist lagen ganze Areale enzymaktiver Zellen zusammen; daneben blieben schmälere Bezirke ohne Aktivität oder wurden nur durch einzelne positive Zellen unterbrochen.

Drei *Lymphosarkome* wurden mit α -N untersucht. Die Sarkomzellen waren esterasenegativ. In lockerer Verteilung fanden sich positive Reticulumzellen über den Schnitt verteilt. Die Zahl dieser Reticulumzellen mit Esteraseaktivität

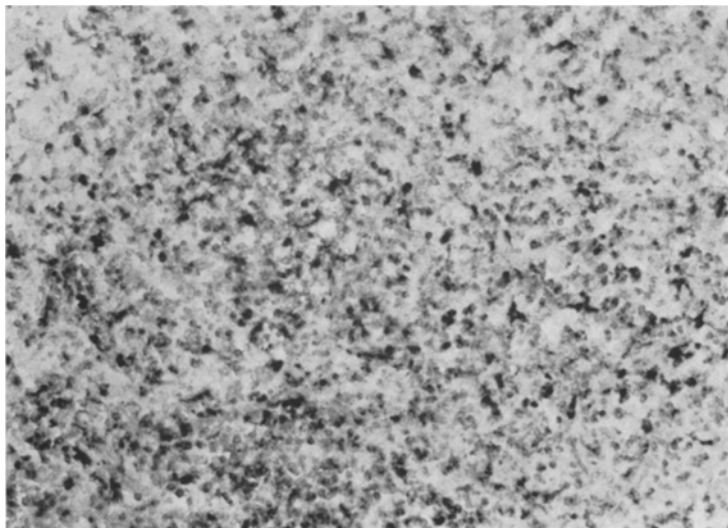


Abb. 6. Monocytenleukämie. Lymphknotenschnitt. S 58/62. α -N-Esterase ohne Kerntärbung. 125 \times

war im Durchschnitt niedriger als bei den übrigen Lymphknotenerkrankungen. Je ein Fall von Leukosarkomatose und unreifzelliger Leukose zeigte mit NAS als Substrat keine Reaktion der neoplastischen Zellen.

In einem Fall von *Monocytenleukämie* (Abb. 6) waren die meisten leukämischen Zellen des Lymphknotens mäßig stark esteraseaktiv. Dazwischen lagen zahlreiche stark positive Zellen, die zum geringen Teil als verzweigte große Reticulumzellen imponierten, zumeist aber kleiner als diese erschienen und z. T. sicher als Monocyten anzusprechen waren. Die in diesem Falle beobachtete Esteraseaktivität war die stärkste, die wir, bezogen auf die Gesamtzahl der esterasepositiven Zellen, jemals in einem Lymphknoten beobachteten.

II. Esterasen im Lymphknotenausstrich (s. Tabelle 3 und 4).

Esteraseaktivität konnte in wechselnder Stärke im Cytoplasma von mittleren reticulären Reizzellen, Histiocyten, großen Reticulumzellen, kleinen Reticulumzellen, Epitheloidzellen, Kerntrümmerphagen, Gewebsmastzellen, Hodgkinzellen, Sternbergschen Riesenzellen und Langhansschen Riesenzellen nachgewiesen werden. Gelegentlich sahen wir einige Zellen, die wir nicht sicher einstufen konnten. In dem nach PAPPENHEIM gefärbten Tupfpräparat desselben Lymphknotens fanden sich in diesen Fällen vermehrt Blutmastzellen; auch rein

morphologisch erinnerten diese Zellen an Blutmastzellen. Auch auf Grund anderer Untersuchungen, die wir durchführten (LÖFFLER und SCHUBERT, LENNERT

Tabelle 3. Zusammenfassung der quantitativen Ergebnisse im Lymphknoten-Ausstrich bei der Esterase-Reaktion mit α -Naphthylacetat

Zellart	Gezählte Zellen insgesamt	Gezählte positive Zellen	Prozent der positiven Zellen
Germinoblasten	184	—	—
Plasmazellreihe	159	—	—
Reticuläre Reizzellen . . .	840	257	30,6
Histiocyten	720	380	52,8
Große Reticulumzellen . .	867	713	82,2
Kleine Reticulumzellen . .	359	359	100
Epitheloidzellen	264	255	96,6
Kerntrümmerphagen . . .	124	124	100
Neutrophile ¹	592	—	—
Eosinophile ¹	189	—	—
Gewebsmastzellen ² . . .	—	—	—
Basophile Stammzellen . .	24	—	—
Hodgkinzellen	82	52	63,4
Sternbergsche Riesenzellen.	—	—	—

¹ In den neutro- und eosinophilen Granulocyten sahen wir häufig einige Körnchen des Reaktionsproduktes. In der Tabelle wurde dies nicht berücksichtigt.

² Ein Teil der Zellen zeigte schwache bis mäßig starke Esteraseaktivität. Die Zahl der ausgezählten Zellen war zu klein, um Prozente angeben zu können.

Tabelle 4. Zusammenfassung der quantitativen Ergebnisse im Lymphknoten-Ausstrich bei der Esterase-Reaktion mit Naphthol-AS-Acetat

Zellart	Gezählte Zellen insgesamt	Gezählte positive Zellen	Prozent der positiven Zellen
Germinoblasten	100	—	—
Plasmazellreihe	118	—	—
Reticuläre Reizzellen . . .	1043	88	8,4
Histiocyten	854	581	68,0
Große Reticulumzellen . .	1855	737	39,7
Kleine Reticulumzellen . .	159	159	100
Epitheloidzellen	251	229	91,2
Kerntrümmerphagen . . .	78	74	94,9
Neutrophile ¹	806	—	—
Eosinophile ¹	48	—	—
Gewebsmastzellen	50	33	66,0
Basophile Stammzellen . .	10	—	—
Hodgkin-Zellen	61	6	9,8

¹ In den neutro- und eosinophilen Granulocyten sahen wir häufig einige Körnchen des Reaktionsproduktes. In der Tabelle wurde dies nicht berücksichtigt.

beiden von uns benutzten Esterasemethoden überein. Der Grad der Enzymaktivität der positiven Histioocyten und der esteraseaktiven reticulären Reizzellen,

und SCHUBERT) möchten wir annehmen, daß die erwähnten, nicht sicher identifizierten Zellen wenigstens z. T. Blutmastzellen waren. Keine Esteraseaktivität sahen wir in Germinoblasten (Keimzentrumzellen), Plasmazellen und basophilen Stammzellen.

Da wir die kleinen Reticulumzellen in den meisten Fällen nur durch ihre Plasmaaktivität von Lymphocyten unterscheiden konnten, sind in den Tabellen 100% esteraseaktive Zellen angegeben. Die Zahl entspricht daher nicht unbedingt den wahren Verhältnissen. Die Kerntrümmerphagen waren bei Anwendung der α -N-Tchnik 100%ig positiv.

In den Tabellen 5 und 6 ist der Prozentsatz esterasepositiver Zellen bei den einzelnen Lymphknotenerkrankungen aufgeführt. Danach wurde bei der Tuberkulose einerseits der höchste Prozentsatz positiver reticulärer Reizzellen und Histioocyten, andererseits der niedrigste Prozentsatz positiver Epitheloidzellen gefunden. In diesen Punkten stimmen die

die größtenmäßig zu den mittleren Formen gehören, war im Durchschnitt geringer als bei den Reticulumzellen, Epitheloidzellen und Kerntrümmern.

Ein Unterschied zwischen den beiden von uns verwendeten Methoden besteht darin, daß die Naphthol-AS-Esteraseaktivität im Durchschnitt schwächer war

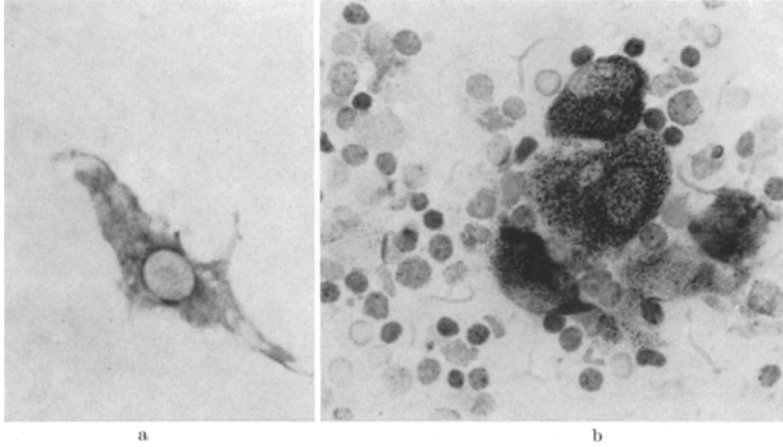


Abb. 7 a u. b. Große Reticulumzelle (a) und saftige Epitheloidzellen (b) im Lymphknoten-Tupfpräparat. Bei a Reticulumzellgestalt entsprechend der Reticulumzellform in der Pulpa des Schnittes. E 9019/59. α -N-Esterase ohne Kernfärbung. Bei b Epitheloidzellgruppe einer käsigen Lymphknotentuberkulose. α -N-Esterase mit Kernfärbung. Je 500 \times

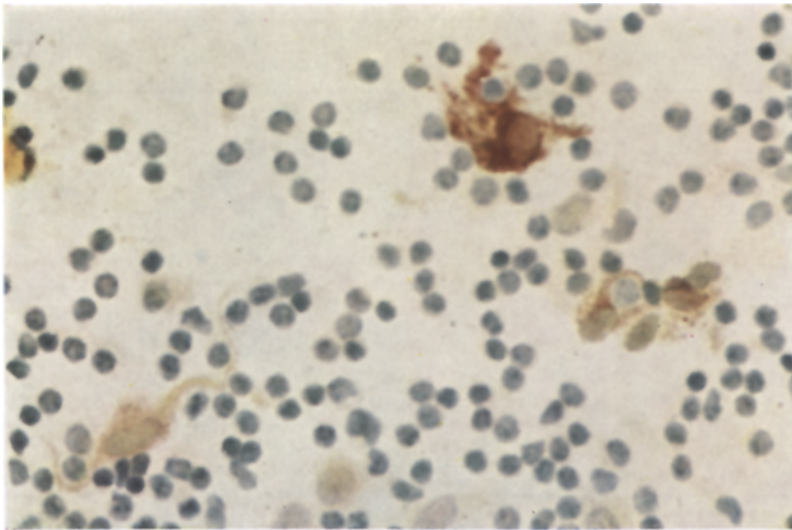


Abb. 8. Saftige (oben) und dürre (links unten) Epitheloidzellen im Tupfpräparat bei käsiger Lymphknotentuberkulose. E 723/59. α -N-Esterase. 500 \times

als die Naphthol-Esterase-Aktivität. Lediglich die Gewebsmastzellen zeigten eine stärkere Reaktion mit Naphthol-AS-Acetat.

Bei der Lymphogranulomatose war die Esterasereaktion der Hodgkinzellen im Durchschnitt schwächer als bei den Reticulum- und Epitheloidzellen. Bei der Auszählung haben wir nur drei Sternbergsche Riesenzellen registriert;

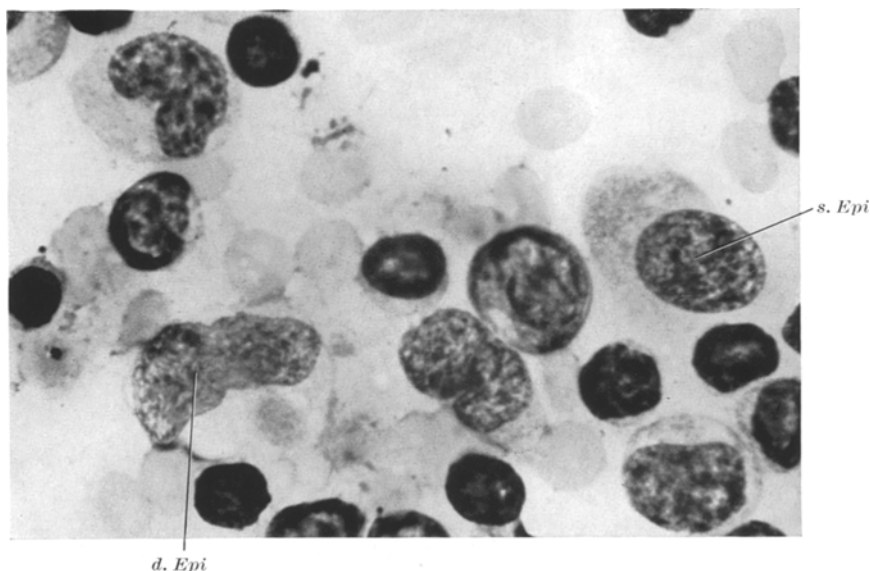


Abb. 9. Saftige (s. Epi) und dünne (d. Epi) Epitheloidzelle bei Pappenheim-Färbung zum Vergleich. Lymphknoten-Tupfpräparat. Gleicher Fall wie Abb. 5. 125 ×

Tabelle 5. Prozentualer Anteil esterase-aktiver Zellen bei verschiedenen Lymphknoten-erkrankungen im Lymphknotentupfpräparat (α -Naphthylacetat-Methode)

Zellart	Unspezifische Lymphadenitis	Piringerische Lymphadenitis	Tuber- kulose	Lympho- granulo- matose
Reticuläre Reizzellen	24,9	24,6	58,2	25,0
Histiocyten	46,9	60,0	75,6	48,1
Große Reticulumzellen	69,8	90,2	88,5	83,4
Epitheloidzellen	100	96,7	92,9	100
Hodgkin-Zellen	—	—	—	63,4

NB. Kerntrümmerphagen und kleine Reticulumzellen waren in allen Fällen 100%ig positiv. Die Zahl der ausgezählten Gewebsmastzellen und Sternbergschen Riesenzellen war zu klein, um Prozentzahlen angeben zu können.

Tabelle 6. Prozentualer Anteil esterase-aktiver Zellen bei verschiedenen Lymphknoten-erkrankungen im Lymphknotentupfpräparat (Naphthol-AS-Acetate-Methode)

Zellart	Unspezifische Lymphadenitis	Piringerische Lymphadenitis	Tuber- kulose	Lympho- granulo- matose
Reticuläre Reizzellen	5,1	7,4	33,3	10,7
Histiocyten	72,7	55,7	76,6	65,1
Große Reticulumzellen	51,6	53,5	67,3	40,5
Epitheloidzellen	94,2	100	76,7	93,7
Kerntrümmerphagen	100	89,7	100	100
Gewebsmastzellen	63,6	—	—	—
Hodgkin-Zellen	—	—	—	9,8

NB. Kleine Reticulumzellen waren in allen Fällen 100%ig positiv. Außer bei der unspezifischen Lymphadenitis war die Zahl der ausgezählten Gewebsmastzellen zu klein, um Prozentzahlen angeben zu können.

unabhängig davon sahen wir noch eine Anzahl dieser Zellen, die — wenn überhaupt — nur eine schwache bis mäßig starke Esterasereaktion zeigten.

Von den fünf Carcinommetastasen (drei Metastasen von Magencarcinom, je eine Metastase eines Bronchialcarcinoms und eines undifferenzierten soliden Carcinoms) zeigten die Tumorzellen der Magencarcinommetastasen auch im Ausstrich deutliche Esteraseaktivität. Die Tumorzellen des Bronchialcarcinoms waren größtenteils negativ, einige wiesen eine geringe Fermentaktivität auf. Die Zellen des undifferenzierten soliden Carcinoms waren negativ.

Bei den drei im Ausstrich untersuchten Reticulosarkomen waren in zwei Fällen die neoplastischen Zellen negativ oder enthielten nur vereinzelt Granula des Reaktionsproduktes im Cytoplasma. Stark positiv verhielt sich das großzellige Reticulosarkom, dessen enzymaktive Zellen wir schon im Schnitt beschrieben haben. Hier lag der Prozentsatz der positiven Sarkomzellen bei 60. Die „normal“ aussehenden Reticulumzellen zeigten im Durchschnitt eine kräftigere Anfärbung als die basophilen, schmalplasmatischen Reticulumzellen.

Die Tumorzellen der beiden Lymphosarkome und der beiden Fälle von großfollikulärem Lymphoblastom, die im Tupfpräparat untersucht wurden, ließen keine sichere Enzymaktivität erkennen.

III. Hemmversuche

In Tabelle 7 haben wir die Ergebnisse unserer Untersuchungen mit Enzymeffektoren zusammengestellt. Die Auswertung wurde nur an Schnittpreparaten vorgenommen, weil eine einigermaßen sichere Beurteilung des Hemmeffektes nur dann möglich ist, wenn sich das gehemmte und das Kontrollpräparat histologisch weitgehend gleichen. Diese Voraussetzung ist im Tupfpräparat nicht regelmäßig gewährleistet.

Tabelle 7. *Der Einfluß verschiedener Enzyminhibitoren auf die Esteraseaktivität im Lymphknoten*

Substrate	Inhibitoren			
	E 600 10^{-6} M	NaF 2×10^{-3} M	Physo- stigmin 10^{-3} M	AgNO ₃ 2×10^{-2} M
Naphthol-AS-Acetat	0	0	0	++
α -Naphthylacetat	±	±	0	++

Zeichenerklärung: 0 = keine erkennbare Hemmung; ± = Hemmung inkonstant; ++ = starke bis vollständige Hemmung.

E 600 und NaF hemmten die Enzymaktivität, wenn α -Naphthylacetat als Substrat verwandt wurde; die Ergebnisse waren aber inkonstant und deshalb nicht sicher auszuwerten. Dagegen wurde die Reaktion mit Naphthol-AS-Acetat nicht beeinflusst. Mit einer stärkeren Konzentration von NaF (7×10^{-2} M) sah GÖSSNER (1955) in tuberkulösem Granulationsgewebe eine starke Hemmung der Naphthol-Esterase.

Eine Hemmung durch Physostigmin (10^{-5} M) beobachteten wir nicht. Auch GÖSSNER (1955) fand bei Anwendung dieser Substanz keine auffallende Änderung des Reaktionsausfalles in tuberkulösem Granulationsgewebe und schließt daher das Vorhandensein einer Cholinesterase in diesen Strukturen aus. In Bindegewebs-

zellen der Haut sahen STEIGLEDER und SCHULTIS keinen Effekt, wenn sie Physostigmin in Konzentrationen unter 2×10^{-3} M einwirken ließen.

Konstante Ergebnisse erhielten wir bei den Hemmversuchen mit AgNO_3 . Naphthol- und Naphthol-AS-Esteraseaktivität wurde praktisch in allen Fällen in Schnitt und Ausstrich vollständig gehemmt.

Der Einfluß von AgNO_3 auf Esterasen im histochemischen Versuch wurde bisher nur in Verbindung mit dem Substrat 5-Bromindoxyl-o-acetat untersucht (PEARSE u. PEPLER, PEPLER u. PEARSE). Um die Möglichkeit auszuschließen, daß AgNO_3 die Kupplung des Naphthols mit dem Diazoniumsalz stört, und somit die negative Reaktion keine Fermenthemmung bedeutet, haben wir Kontrolluntersuchungen an anderen Geweben durchgeführt. Dabei wurden nebeneinander im selben Schnitt Zellen und Strukturen beobachtet, die keine Beeinflussung der Reaktion erkennen ließen, und andere, deren Esteraseaktivität z. T. oder völlig unterdrückt wurde (s. a. LÖFFLER 1960 b). Wir dürfen daher annehmen, daß der durch AgNO_3 im menschlichen Lymphknoten beobachtete Hemmeffekt eine echte Enzymhemmung ist.

Diskussion

1. Typus der nachgewiesenen Esterasen. Die beiden von uns zum Esterasenachweis verwendeten Substrate werden von unspezifischer Esterase, Cholinesterase, Lipase und z. T. auch von Peptidasen gespalten. Um eine weitere Charakterisierung der gefundenen Esterase zu ermöglichen, war es nötig, Hemmversuche durchzuführen; denn nach den Untersuchungen von GOMORI (1952, 1953 a, 1955) und PEARSE gelingt auf diese Weise die Abgrenzung einer Reihe von verschiedenen Esterasetypen.

GOMORI (1955) hat bei Verwendung von NAS als Substrat drei Gruppen von Esterasen unterschieden: einen allgemeinen Typ, einen Lebertyp und einen Pankreastyp. Bei seinen Hemmversuchen traten aber vielfach Überschneidungen auf, die eine exakte Zuordnung zu dem einen oder anderen Typ erschweren.

Der Arbeitskreis um PEARSE (PEARSE 1956; PEARSE und PEPLER 1957; PEPLER und PEARSE 1957 a und b; HESS und PEARSE 1958) hat eine Esterase abgegrenzt, die resistent gegenüber E 600 und DFP ist und in ihren Eigenschaften an Cathepsin C erinnert. Sie fanden dieses Enzym u. a. in Makrophagen und Kupfferschen Sternzellen. Es wird durch AgNO_3 gehemmt und durch Cystein aktiviert.

In jüngster Zeit hat PEARSE (1960) eine Einteilung der unspezifischen Esterasen veröffentlicht, die den biochemischen Gegebenheiten Rechnung trägt und sich auf das Verhalten der Enzyme gegenüber einer Anzahl unterschiedlicher Effektoren stützt. Er unterscheidet eine A-Esterase („arom-esterase“ oder „organophosphate-resistant esterase I“), eine B-Esterase („ali-esterase“ oder organophosphate-sensitive esterase“) und eine C-Esterase („organophosphate-resistant esterase II“). Die A- und C-Esterasen werden durch E 600 in Konzentration unter 10^{-2} M nicht gehemmt, während die Aktivität der B-Esterase durch E 600 10^{-5} M vollständig unterdrückt wird. Durch Anwendung anderer Effektoren gelingt eine Unterscheidung der A- und C-Esterasen.

Nach unseren Untersuchungen gehören die Esterasen des Lymphknotens wahrscheinlich dem „*allgemeinen Typ*“ im Sinne von GOMORI an. Dieses haben auch BRAUNSTEIN u. Mitarb festgestellt. Doch muß man berücksichtigen, daß GOMORI mit Paraffinschnitten von zumeist acetonfixierten Geweben gearbeitet, also die Präparate anders vorbehandelt hat als wir.

Die für die jüngste Einteilung von PEARSE nötigen Hemmversuche haben wir bisher nicht durchgeführt. Wir sahen aber eine konstante und reproduzierbare

Hemmung der Esteraseaktivität in den reticulohistiocytären Zellen des Lymphknotens durch AgNO_3 (2×10^{-3} M). Auch bei Untersuchungen über die Esteraseaktivität in der Milz konnten wir diesen Befund erheben. Andere Strukturen und Zellen ließen sich in diesem Organ dadurch abgrenzen, daß ihre Esteraseaktivität durch AgNO_3 nicht beeinflußt wurde. Durch die biochemischen Untersuchungen von ABDERHALDEN und MERKEL wissen wir, daß Peptidasen durch Ag-Ionen gehemmt werden. DOYLE gelang es, im lymphatischen Gewebe der Rattenappendix mit biochemischen Methoden Dipeptidase nachzuweisen. Histochemische Reaktionen an fixierten Gewebsschnitten sind zwar nur mit Vorsicht biochemischen Befunden an die Seite zu stellen; denn sie erfassen ja strukturgebundene Enzyme (Desmoenzyme). Dennoch scheint nach den bisher mitgeteilten histochemischen Befunden anderer Autoren und unseren Ergebnissen die Vermutung berechtigt, daß in den reticulohistiocytären Zellen des Lymphknotens und der Milz *Peptidasen* vorhanden sind, die *Esterbindungen spalten können*.

2. Bedeutung des Esterase-Nachweises für die Lymphknoten-Cytologie. Durch den Vergleich der Esterasereaktionen im Lymphknotenschnitt und Tupfpräparat wurde es möglich, unsere bisher für das Tupfpräparat angewandte Klassifizierung der Lymphknotenzellen weiter zu unterbauen und noch manche Einzelbefunde zur Erkennung uneinheitlicher Zelltypen (z. B. der „Reticulumzellen“ und der reticulären Reizzellen) zu erheben.

Im Lymphknotenschnitt sahen wir eine deutliche Esteraseaktivität im Plasma von Sinusretothelien, Reticulumzellen der Pulpa und der Follikel, Kerntrümmern, Epitheloidzellen und Langhansschen Riesenzellen. Schwache bis mäßig starke Aktivität fand sich in Gewebsmastzellen, Hodgkinzellen, Sternbergschen Riesenzellen, gelegentlich auch in Fibroblasten, Capillaren und Venolen; z. T. war in den zuletzt genannten Strukturen keine Reaktion zu erkennen.

Im Lymphknoten-Tupfpräparat konnte Esteraseaktivität im Plasma von mittleren reticulären Reizzellen, Histiozyten, großen und kleinen Reticulumzellen, Kerntrümmern, Epitheloidzellen, Gewebsmastzellen, Hodgkinzellen und Sternbergschen Riesenzellen nachgewiesen werden. Keine Fermentaktivität sahen wir in Germinoblasten (Keimzentrumzellen), Plasmazellen und basophilen Stammzellen.

Über die Zellen des Blutes haben wir an anderer Stelle berichtet (LÖFFLER 1961 b). Im Rahmen dieser Arbeit haben wir die Granulocyten und Lymphocyten als negativ bewertet, da nur gelegentlich einzelne Granula des Reaktionsproduktes nachweisbar waren.

Auf Grund dieser Ergebnisse kann allgemein gesagt werden, daß die reticulohistiocytären Zellen des Lymphknotens mehr oder weniger stark esteraseaktiv sind, während die übrigen Lymphknotenzellen, vor allem die regenerierenden basophilen Zellformen, keine Aktivität zeigen.

Innerhalb der Gruppe positiv reagierender Zellen sind deutliche Unterschiede bezüglich der Aktivitätsstärke und des prozentualen Anteiles enzymaktiver Zellen erkennbar.

Sehen wir von den kleinen Reticulumzellen ab, so nimmt der prozentuale Anteil esteraseaktiver Zellen in folgender Reihe ab: Kerntrümmern, Epitheloidzellen, große Reticulumzellen, Hodgkinzellen, Histiozyten, reticuläre Reizzellen. Diese Aufzählung gilt bei Anwendung von α -Naphthylacetat als Substrat.

Bei der Auszählung der mit Naphthol-AS-Acetat gewonnenen Ergebnisse stehen die Histiocyten vor den Reticulumzellen. Die Aktivitätsstärke war bei dieser Reaktion im Durchschnitt geringer als bei der α -N-Technik. Das umgekehrte Verhalten der Gewebsmastzellen war bereits von GOMORI (1953 b) beschrieben worden.

Die starke Aktivität der Kerntrümmmerphagen könnte man mit der sichtbaren Phagocytoseleistung erklären. Auch GEDIGK und FISCHER vermuten diesen Zusammenhang. Von biochemischer Seite wird diese Vermutung durch die Arbeit von DOYLE und LIEBELT unterbaut. Diese Autoren fanden in der Rattenappendix einen erhöhten Esterasegehalt, wenn histologisch vermehrt Phagocyten nachweisbar waren.

Wir hatten Gelegenheit, ein Talkumgranulom zu untersuchen, das in der Umgebung eines excidierten Lymphknotens lag. In den Fremdkörperriesenzellen und den Reticulumzellen dieses Granuloms fanden wir eine extrem starke Esterasereaktion. Das gleiche sahen früher auch GÖSSNER und EDER.

Alle diese Befunde deuten darauf hin, daß die Esterasen neben anderen Enzymen (s. bei GEDIGK und FISCHER) im Rahmen der *Phagocytose*, speziell bei der Verarbeitung der aufgenommenen Stoffe, eine wichtige Rolle spielen. Die *Antigenverarbeitung* scheint also mit einer *hohen Esteraseaktivität* verknüpft zu sein.

Man beobachtet aber gelegentlich Makrophagen, die mit gespeichertem Material vollgestopft sind und nur geringe Esteraseaktivität zeigen. Wir sahen dieses z. B. in der Lunge, wenn Alveolarphagocyten mit Kohlenpigment überfüllt waren. VERNE hat ähnliches bei experimenteller Tusche- und Trypanblau-Speicherung in der Lunge beobachtet. Ob dieses Phänomen nur bei der Phagocytose von bestimmten Substanzen auftritt, oder ob es sich dabei um ein Zeichen beginnenden Zelltodes handelt, sei dahingestellt.

Die großen „*Reticulumzellen*“ des Ausstriches stellen dann, wenn sie plump-ovale saftige Kerne besitzen und stärker vermehrt sind, zum großen Teil *Sinusretothelien* dar, wie wir beim Vergleich mit den zugehörigen Schnittpreparaten feststellen konnten. Die Zellen der unreifen Sinushistiocytose unterscheiden sich im Schnitt eindeutig von den Sinusretothelien durch ihre negative Esterasereaktion.

Unsere Untersuchungen ergaben weiterhin, daß *Sinusretothelien* und *Gefäßendothelien*, auf deren morphologische Ähnlichkeit in letzter Zeit von OMORI und REINAUER hingewiesen wurde, *cytochemisch unterschieden* werden können. Bezüglich der Esteraseaktivität bestehen deutliche quantitative Unterschiede: Während die Sinusretothelien stets eine starke Aktivität von unspezifischer Esterase erkennen lassen, sahen wir in Capillaren und Venolen nur gelegentlich eine geringe Ablagerung des Reaktionsproduktes. Berücksichtigt man weiter das Verhalten beider Systeme bei der Untersuchung der alkalischen Phosphatase, so zeigt sich ein qualitativer Unterschied. In den Capillaren des Lymphknotens ist stets eine sehr deutliche Aktivität nachweisbar; in geringerem Grade findet man sie auch im Endothel der Arteriolen, Venolen und größerer Gefäße. Im Gegensatz dazu ließen die Sinusretothelien niemals Aktivität von alkalischer Phosphatase erkennen.

Die *esterasenegativen* „*Reticulumzellen*“ des Ausstriches gehören wohl z. T. der Gruppe an, die wir früher (LENNERT, LÖFFLER und LEDER) bei der alkalischen

Phosphatasereaktion als positiv beschrieben. Die übrigen esterasenegativen Reticulumzellen dürften als „ruhende“ oder „regenerierende“ Formen anzusehen sein.

Die „kleinen Reticulumzellen“ konnte man mit den üblichen Färbemethoden bisher meist nicht sicher von den Lymphocyten abgrenzen. Mit Hilfe der Esterasetechnik gelingt dieses, wenn wir auch nicht wissen, ob wir alle Zellen damit erfassen.

Die *Epitheloidzellen* stellen eine Sonderform der reticulohistiocytären Zellen des Lymphknotens dar. Sie haben wahrscheinlich an der Antigenverarbeitung wesentlichen Anteil. Dementsprechend zeigen sie auch eine positive Esterasereaktion. Diese ist am stärksten in den „saftigen“ Epitheloidzellen und geringer positiv in den „dürren“ Epitheloidzellen (Abb. 8 und 9). Diese dünnen Formen reichen mit ihren langen Plasmafortsätzen weit in die Verkäsungsherde hinein und lassen sich hier mit der Esterasereaktion noch nachweisen, während sie bei üblichen Färbungen nicht mehr sichtbar sind. Das gleiche beobachtete MARSHALL bei Anwendung der Versilberung nach WEIL-DAVENPORT.

Ein Teil der „dürren Epitheloidzellen“ läßt keine positive Esterasereaktion erkennen, und zwar besonders in den Randbezirken von Epitheloidzelltuberkeln, wo die Faserbildung einsetzt. Es ist möglich, daß diese esterasenegativen „dürren“ Formen den Zellen entsprechen, die alkalische Phosphatase in ihrem Plasma nachweisen lassen (LENNERT, LÖFFLER und LEDER), und die wir früher als Fibroblasten deuteten. Wir halten es für möglich, daß die phosphataseaktiven „Fibroblasten“ aus esteraseaktiven Epitheloidzellen hervorgegangen sind, wie auch MARSHALL nach seinen Versilberungspräparaten annimmt.

Für die Aufschlüsselung der Sammelgruppe von Zellen, die wir als *reticuläre Reizzellen* bezeichnen (LENNERT 1961), bekamen wir durch die Esterasereaktion einen Hinweis. Wir haben schon früher vermutet, daß die mittleren Reizzellen z. T. als histiocytäre Elemente anzusehen sind und fanden nun schwache bis mäßig starke Aktivität — etwa dem Grade der positiven Histiocyten entsprechend — im Cytoplasma eines Teiles der mittleren reticulären Reizzellen.

Das histochemische Verhalten der *Hodgkin-Zellen* und der *Sternbergschen Riesenzellen* erlaubt keine eindeutige Stellungnahme zu ihrer Bedeutung. Die festgestellte Abnahme der Esteraseaktivität gegenüber den Reticulumzellen kann entweder Ausdruck einer Minderung der funktionellen Leistung oder Folge der neoplastischen Umwandlung dieser Zellen sein.

3. Bedeutung für die Lymphknotenhistologie und -diagnostik. Während die alkalische Phosphatasereaktion einen raschen Überblick über die Gefäßverteilung bzw. Capillarisation des Lymphknotens gestattet, sehen wir bei der Esterasereaktion bereits bei Lupenvergrößerung Weite und Zellgehalt der Sinus sowie Reticulumzellenmenge in Pulpa und Follikeln. Sinuskatarrh und Reticulocytose treten daher — ähnlich wie bei der Versilberung nach WEIL-DAVENPORT — markant hervor und sind daher leichter zu erkennen als mit den üblichen Färbemethoden. Die Verteilung der Reticulumzellen gibt uns außerdem einen Anhalt dafür, ob die Lymphknotenstruktur erhalten oder zerstört ist. Ähnlich eindrucksvoll ist die positive Reaktion in Epitheloidzellherden und Käserandzonen.

Auch im Ausstrich kann man sich bei Anwendung der Esterasereaktion rasch über die Zahl der vorhandenen Reticulumzellen orientieren (Abb. 10). Die oft

nacktkernig erscheinenden Reticulumzellen treten dann mit ihrem breiten und vielfach verzweigten Plasmaleib deutlich hervor und gestatten eine grobe Schätzung der Reticulumzellmenge. Sind zahlreiche, in Gruppen liegende, abgerundete große Reticulumzellen vorhanden, darf man mit Wahrscheinlichkeit auf einen Sinuskatarrh schließen.

Bei der Erkennung maligner Lymphknotenerkrankungen hilft uns die Esterase-reaktion nur z. T. weiter. Leukosen, Lymphosarkome, großfollikuläre Lymphoblastome zeigen eine geringe Reticulumzellbeimengung, die allerdings — wie

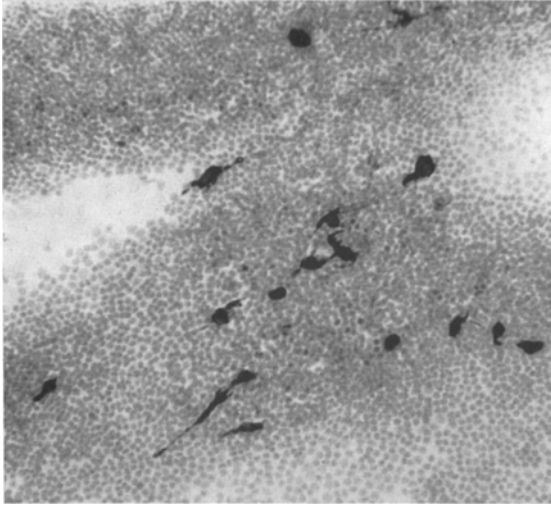


Abb. 10. Lymphosarkom im Lymphknoten-Tupfpräparat. Die „normalen“ Reticulumzellen zwischen den Tumorzellen treten deutlich hervor. E 9019/59. α -N-Esterase. 125 \times

mit kaum einer anderen Methode — quantitativ auswertbar ist. Von größter praktischer Wichtigkeit scheint die positive Esterase-reaktion bei Monocytenleukämien zu sein. Gestattet doch der Esterasenachweis eine einwandfreie Unterscheidung von Monocyten und Paramyeloblasten. Es wird sich mit dieser Methode bald erweisen, ob die in Europa seit NAEGELI vorherrschende Ansicht noch gilt. NAEGELI, ROHR und zahlreiche Hämatologen glauben, die Monocytenleukämien seien zumeist monocytoide Paramyelo-

blastenleukämien, keine „echten“ Monocytenleukämien im Sinne von SCHILLING. Diese seien sehr selten. Demgegenüber ist in den USA die Auffassung weitverbreitet, wonach die Monocytenleukämie eine gar nicht so seltene Form der akuten Leukose darstelle und mit der Paramyeloblastenleukämie nichts zu tun habe. Nach einigen weiteren klinisch beobachteten Fällen von akuter Leukämie scheint die amerikanische Auffassung weitgehend richtig zu sein; denn wir konnten in kurzer Zeit drei Fälle von Monocytenleukämie mit stark esterasepositiven Zellen im Blut von den esterasenegativen Paramyeloblastenleukämien abgrenzen. Die Zahl der echten Monocytenleukämien scheint somit nicht so niedrig zu sein, wie in deutschen Statistiken meist zu lesen ist.

Ein Teil der Reticulosarkome zeigt eine positive Esterasereaktion in einer größeren Zahl von Reticulumzellen, die ihrem morphologischen Aspekt nach relativ gut ausgereift sind, d. h. ein breites, wenig basophiles bis oxyphiles Plasma besitzen. Die basophilen schmalplasmatischen Zellen des Reticulosarkoms sind negativ. Wir stimmen in diesem Punkte nicht ganz mit der Interpretation von BRAUNSTEIN u. Mitarb. überein. BRAUNSTEIN u. Mitarb. berichten, daß die Zellen des Reticulosarkoms ebenso positiv seien wie die normalen Reticulumzellen. In der von GALL beigegebenen Abbildung sieht man jedoch, daß in dem wiedergegebenen Schnitt nur *ein Teil* der Zellen esteraseaktiv ist wie bei einem unserer Fälle.

Ob zur Differenzierung des Geschwulsttyps von Carcinommetastasen die Esterasereaktion erfolgreich herangezogen werden kann, läßt sich aus unseren wenigen Befunden noch nicht schließen. Hier sollten weitere Untersuchungen Klarheit schaffen.

Zusammenfassung

Die Esteraseaktivität der Lymphknotenzellen wurde mit den Substraten α -Naphthylacetat und Naphthol-AS-Acetate im Schnitt- und Tupfpräparat geprüft. Die Reaktion mit α -Naphthylacetat ist stets stärker als diejenige mit Naphthol-AS-Acetate, außer bei den Gewebsmastzellen. Die stärkste positive Reaktion finden wir in den phagocytosefähigen Zellen, nämlich in *Sinusendothelien*, *Reticulumzellen* der Pulpa und Follikeln (hier besonders in Kerntrümmerphagen!), *Epitheloidzellen* und *Langhansschen Riesenzellen*. Die „saftigen“ Epitheloidzellen reagieren viel stärker als die „dürren“. Eine geringere Aktivität zeigen die *Gewebsmastzellen*, *Hodgkinzellen* und *Sternbergschen Riesenzellen*. Die regenerierenden Zellen des Lymphknotens — *basophile Stammzellen* und *Germinoblasten* — sind wie die Lymphocyten und Plasmazellen esterasenegativ. Im Tupfpräparat konnten kleine *Reticulumzellen* durch ihre positive Reaktion von *Lymphocyten* abgegrenzt werden. Auch gelang es, einen Teil der „mittleren retikulären Reizzellen“ den Histiocyten zuzuordnen.

Für die Diagnostik gestattet die Esterasereaktion einen guten Überblick über Zahl und Verteilung funktionell-aktiver Reticulumzellen im Schnitt- und Tupfpräparat. Ein Teil der *Retikulosarkome* enthält esterasepositive Zellen. Auch die Zellen der *Monocytenleukämie* zeigen großenteils Esteraseaktivität, wodurch sie sich leicht von den Paramyeloblasten unterscheiden lassen. Alle übrigen Neubildungen des blutbildenden Gewebes reagieren negativ.

Die gefundenen Esterasen zählen wahrscheinlich zum „allgemeinen Typ“ GOMORI und sind möglicherweise als esterspaltende Peptidasen anzusprechen.

Summary

The esterase activity of cells of lymph nodes was studied in sections and touch preparations by using α -naphthyl-acetate and naphthol-AS-acetate as substrates. The reaction with α -naphthyl-acetate was always more intense than with naphthol-AS-acetate, except in tissue mast cells. We found the most positive reaction in the phagocytic cells; namely in the sinus endothelial cells, in the reticulum cells of the pulp and follicles (here especially in the cells that phagocytize nuclear debris), and in the epithelioid cells and Langhans giant cells. The plump epithelioid cells reacted much more intensely than the thinner ones. The tissue mast cells, the Hodgkins' cells, and the Sternberg giant cells show edless activity. The regenerating cells of the lymph nodes, the basophilic stem cells and germinoblasts, were esterase negative, as were the lymphocytes and plasma cells. By means of their positive reaction in touch preparations small reticulum cells could be differentiated from the lymphocytes. In addition, some of the middle reticular "Reizzellen" could be classified with the histiocytes. The esterase reaction provided a good method of surveying the number and distribution of functionally active reticulum cells. The cells of monocytic leukemia showed esterase activity enabling them to be differentiated readily

from paramyeloblasts. The esterases as demonstrated probably belonged to the general GOMORI type, and possibly were ester-splitting peptidases.

Literatur

- ABDERHALDEN, E., u. R. MERKEL: Weitere Studien über das Vorhandensein einer Prolinase. *Fermentforsch.* **15**, 1—23 (1936).
- ACKERMAN, 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).
- AMMON, R.: Die Esterasen. In AMMON u. DIRSCHERL, *Fermente, Hormone, Vitamine*, Bd. I, Fermente S. 99. Stuttgart: Georg Thieme 1959.
- 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).
- BRAUNSTEIN, H.: Histochemistry of lymphocytic tissue in the malignant lymphomas. In: *The lymphocyte and lymphocytic tissue*. Edit. by J. W. REBUCK. New York: P. B. Hoeber, 1960.
- D. G. FREITMAN and E. A. GALL: Histochemical study of the distribution of enzymatic activity in malignant lymphoma. *Amer. J. Path.* **33**, 603—604 (1957).
- — A histochemical study of the enzymatic activity of lymph nodes. *Cancer (Philad.)* **11**, 829—837 (1958).
- BURSTONE, M. S.: Esterase of the salivary glands. *J. Histochem. Cytochem.* **4**, 130—139 (1956).
- CHESICK, R. D.: Histochemical study of the distribution of esterases. *J. Histochem. Cytochem.* **1**, 471—486 (1953).
- COHEN, E. B., M. M. NACHLAS and A. M. SELIGMAN: Histochemical demonstration of esterase in malignant tumors. *Cancer Res.* **11**, 709—711 (1951).
- DOYLE, W. L. and R. L. LIEBELT: Distribution of esterase in epithelial and lymphatic tissues of the rabbit appendix. *J. Histochem. Cytochem.* **3**, 50—60 (1955).
- EDER, M.: Histochemische Fermentnachweise. Ihre Bedeutung in der Pathologie. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **42**. Tagg, S. 374—394. 1959.
- FISHMAN, W. H., and J. R. BAKER: Cellular localization of β -glucuronidase in rat tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **4**, 570—588 (1956).
- GALL, E. A.: The cytological identity and interrelation of mesenchymal cells of lymphoid tissue. In: *Hodgkin's Disease*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **73**, 120—130 (1959).
- GEDIGK, P., u. E. BONKE: Über die Enzymaktivität im Fremdkörpergranulationsgewebe. *Virchows Arch. path. Anat.* **330**, 538—568 (1957).
- , u. R. FISCHER: Über die Anpassung der Enzymaktivität von Histiozyten an funktionelle Leistungen. *Klin. Wschr.* **1960**, 806—809.
- GÖSSNER, W.: Histoenzymatische Untersuchungen zur Tuberkulose. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **39**. Tagg, S. 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).
- GOMORI, G.: Distribution of lipase in tissues under normal and under pathologic conditions. *Arch. Path. (Chicago)* **41**, 121—129 (1946).
- The histochemistry of esterases. *Int. Rev. Cytol.* **1**, 323—335 (1952).
- Chloroacyl esters as histochemical substrates. *J. Histochem. Cytochem.* **1**, 469—471 (1953).
- Histochemistry of human esterases. *J. Histochem. Cytochem.* **3**, 479—485 (1955).
- , and R. D. CHESICK: Histochemical studies of the inhibition of esterases. *J. cell. comp. Physiol.* **41**, 51—63 (1953).
- GROPP, A., u. K. HUPE: Nachweis von Enzymen an in vitro gezüchteten Makrophagen und epitheloiden Zellen. *Virchows Arch. path. Anat.* **331**, 641—652 (1958).
- HESS, R., and A. G. E. PEARSE: The histochemistry of indoxylesterase of rat kidney with special reference to its cathepsin like activity. *Brit. J. exp. Path.* **39**, 292—299 (1958).

- KRAUT, H., u. Ä. WEISCHER: Esterasen. In: Physiologische Chemie, Bd. I, herausgeg. von FLASCHENTRÄGER u. LEHNARTZ. Berlin: Springer 1951.
- LENNERT, K.: Die Frühveränderungen der Lymphogranulomatose. Frankfurt. Z. Path. **69**, 103—122 (1958).
- Lymphknoten. Diagnostik in Schnitt und Ausstrich. Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie, Bd. I, 3A. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1961.
- , u. H. LÖFFLER: Zur Cytochemie der Lymphknotenzellen. VII. Congr. der Europ. Ges. für Hämatologie, London, 1959.
- — u. L. D. LEDER: Fermenthistochemische Untersuchungen des Lymphknotens. I. Alkalische Phosphatase im Schnitt und Ausstrich. Virchows Arch. path. Anat. **334**, 399—418 (1961).
- , u. W. REMMELE: Karyometrische Untersuchungen an Lymphknotenzellen des Menschen. I. Mitteil. Germinoblasten, Lymphoblasten und Lymphocyten. Acta haemat. (Basel) **19**, 99—113 (1958).
- II. Mitt. Reticulum- und Endothelzellen. Acta haemat. (Basel) **20**, 301—317 (1958).
- III. Mitt. Basophile Stammzellen, Plasmazellen und Gewebsmastzellen. Acta haemat. (Basel) **21**, 139—156 (1959).
- , u. H. RINNEBERG: Fermenthistochemische Untersuchungen des Lymphknotens. III. Adenosintriphosphatase und 5-Nucleotidase in den Zellen des Lymphknotentupfpräparates. Klin. Wschr. **1961**, 971.
- , u. J. C. F. SCHUBERT: Zur Cytochemie der Blut- und Gewebsmastzellen. Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 66. Congr., S. 1061—1065. 1960.
- LÖFFLER, H.: Kombinationsmöglichkeiten der Nachweismethoden für hydrolytische Enzyme mit der Azofarbstoffmethode. Histochemie **2**, 23—31 (1960a).
- Vergleichende histochemische Untersuchungen an Säugermilzen. Verh. Dtsch. Ges. Path. **44**. Tagg, S. 351—355. 1960b.
- Untersuchungen über die Aktivität der alkalischen Phosphatase und der unspezifischen Esterase in den Reticulumzellen des Knochenmarks. Ein Vergleich zwischen Knochenmark und Lymphknoten. Fol. haemat. (N.F.) **6**, 164—169 (1961a).
- Cytochemischer Nachweis von unspezifischer Esterase in Ausstrichen. Beiträge zur Technik und Ergebnisse im Blutaustriech des Menschen. Klin. Wschr. **39**, 1220—1229 (1961b).
- , u. J. C. F. SCHUBERT: Zum histochemischen Nachweis der Esterasen in Zellen des Blutes. Klin. Wschr. **37**, 563—564 (1959).
- MALATY, H. A., and G. H. BOURNE: The distribution of „simple“ esterase in human tissues. Acta anat. (Basel) **21**, 249—258 (1954).
- MARSHALL, A. H. E.: An outline of the cytology and pathology of the reticular tissue. Edinburgh and London: Oliver & Boyd 1956.
- MITUS, W. J., J. B. MEDNICOFF, B. WITTELS and W. DAMESHER: Neoplastic lymphoid reticulum cells in the peripheral blood: A histochemical study. Blood **17**, 206—215 (1961).
- MOLONEY, W. C., K. MCPHERSON and L. FLIEGELMAN: Esterase activity in leucocytes demonstrated by the use of naphthol-AS-D-Chloroacetate substrate. J. Histochem. Cytochem. **8**, 200—207 (1960).
- NACHLAS, M. M., and A. M. SELIGMAN: The comparative distribution of esterase in the tissues of five mammals by a histochemical technique. Anat. Rec. **105**, 677—695 (1949).
- OMORI, Y.: Cytological studies on reticuloendothelial system. Acta med. biol. (Niigata) **2**, 439—460 (1954).
- PEARSE, A. G. E.: Azo dye methods in enzyme histochemistry. Int. Rev. Cytol. **3**, 329—358 (1954).
- The esterases of the hypophyses and their functional significance. J. Path. Bact. **72**, 471—487 (1956).
- Histochemistry. Theoretical and applied. London: Y. & A. Churchill Ltd. 1960.
- , and W. J. PEPLER: A probable peptidase in carcinoid tumours. Nature (Lond.) **179**, 589 (1957).
- PEARSON, B., and V. DEFENDI: A comparison between the histochemical demonstration of non-specific esterase activity by 5-bromo-indoxyl acetate, α -naphthyl acetate and naphthol-AS-acetate. J. Histochem. Cytochem. **5**, 72—84 (1957).

- PEPLER, W. J., and A. G. E. PEARSE: The histochemistry of the esterases of rat brain, with special reference to those of the hypothalamic nuclei. *J. Neurochem.* **1**, 193—202 (1957 a).
 — — A histochemical study of the esterases on rat thyroid and their behaviour under experimental conditions. *Brit. J. exp. Path.* **38**, 221—226 (1957 b).
 REINAUER, H.: Morphologische Befunde an Lymphknoten bei infektiöser Mononukleose. *Virchows Arch. path. Anat.* **332**, 56—82 (1959).
 RINNEBERG, H., u. K. LENNERT: Fermenthistochemische Untersuchungen des Lymphknotens. II. Adenosintriphosphatase und 5-Nucleotidase im Lymphknotenschnitt. *Klin. Wschr.* **1961**, 923—924.
 STEIGLEDER, G. K., u. H. LÖFFLER: Zum histochemischen Nachweis unspezifischer Esterasen und Lipasen. *Arch. klin. exp. Derm.* **203**, 41—60 (1956).
 —, u. K. SCHULTIS: Die Bedeutung des Nachweises unspezifischer Esterasen in Bindegewebszellen der Haut. *Arch. klin. exp. Derm.* **204**, 448—456 (1957 a).
 — — Zur Histochemie der Esterasen der Haut. *Arch. klin. exp. Derm.* **205**, 196—211 (1957 b).
 VERNE, J.: Ein neuer Aspekt der Histologie durch Lokalisation der Enzyme. Cytochemische Studie über alkalische Phosphatasen und Esterasen. *Ärztl. Forsch.* **10**, 1/157—I/166 (1956).
 WACHSTEIN, M., and G. WOLF: The histochemical demonstration of esterase activity in human blood and bone marrows smears. *J. Histochem. Cytochem.* **6**, 457 (1958).
 WELLS, G. C.: Esterases in cutaneous granulomata. *Brit. J. Derm.* **69**, 415—427 (1957).
 — Hydrolysing enzymes in macrophages. *J. invest. Derm.* **31**, 83—87 (1958).

Prof. Dr. K. LENNERT, Pathologisches Institut der Universität,
 Heidelberg, Voßstr. 2

Dr. H. LÖFFLER, Heidelberg, Ludolf-Krehl-Klinik