

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

Untersuchungen zur enzymhistochemischen Differenzierung von leukämischen Erkrankungen am Schnittpräparat*

Von

R. FISCHER, P. LORBACHER und C. KÄUFER

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 21. März 1964)

Die pathologisch-anatomische Beurteilung von Blutkrankheiten anhand von *Schnittpräparaten* bereitet nicht selten große Schwierigkeiten. Das gilt vor allem für Untersuchungen am Obduktionsmaterial, in dem bei Anwendung der üblichen Färbeverfahren eine nähere Differenzierung der verschiedenen Leukämieformen häufig sehr erschwert ist. Nun haben sich in der Hämatologie in den letzten Jahren durch die Anwendung enzymcytochemischer Methoden an *Ausstrichpräparaten* von peripherem Blut und Knochenmark vor allem für die klinische Diagnostik eine Reihe wichtiger Resultate erzielen lassen (zusammenfassende Darstellungen bei WACHSTEIN 1955, HAYHOE 1960, SCHÜMMELEDER 1961, LAMBERS und BAUER-SIC 1962, LENNERT 1962, MERKER 1963, LÖFFLER 1963). Dabei lag die wesentliche Bedeutung der Anwendung dieser Nachweisverfahren einmal in der Möglichkeit, Zellelemente des Blutes und der blutbildenden Organe auf Grund ihrer Enzymausstattung zu identifizieren und differenzieren, zum anderen in der Erfassung quantitativer Unterschiede und Verschiebungen im Verhalten bestimmter Leukocytenenzyme (besonders der alkalischen Phosphatase) bei Erkrankungen und Reaktionen des Blutes.

Es erschien daher angezeigt, die modernen Methoden zum Nachweis hydrolytischer Enzyme auch am histologischen Material anzuwenden, um hierdurch vielleicht eine genauere Differenzierung und Identifizierung normaler und leukämischer Blutzellen zu ermöglichen. Bisher liegen erst relativ wenige derartige Untersuchungen vor, die sich zudem in erster Linie auf das lymphoreticuläre Gewebe und dessen Veränderungen beziehen (LENNERT u. Mitarb. 1961—1963; BRAUNSTEIN u. a. 1958—1962).

Im folgenden wird daher über die Ergebnisse enzymhistochemischer Untersuchungen am Obduktionsmaterial bei 20 Fällen verschiedener leukämischer Erkrankungen berichtet und die Bedeutung dieser Befunde für die Differentialdiagnostik von Blutkrankheiten am Schnittpräparat aufgezeigt.

Material und Methodik

Die Gewebsstücke wurden in der Regel 6—12 Std nach dem Tode entnommen und während der Obduktion *sofort* in die entsprechenden Fixierungslösungen gebracht. Folgende Organe wurden untersucht: Knochenmark (Wirbelkörper, Femurmark), Lymphknoten, Leber, Milz, Niere, in einzelnen Fällen auch Herzmuskel und Speicheldrüsen.

* Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung bei diesen Untersuchungen.

Fixierung und Vorbehandlung. Die etwa 2—3 mm dicken Gewebsstückchen wurden im allgemeinen 16—24 Std in eiskaltem Formalin- CaCl_2 (BAKER) fixiert, anschließend kurz zwischen Filterpapier abgetupft und in eine Lösung von 1% Gummi arabicum/0,88 M Saccharose bei 4° C (HOLT 1959) gebracht. Das Untersuchungsmaterial konnte so längere Zeit bis zur Verarbeitung im Kühlschrank aufbewahrt werden (Ausnahme: Nachweis der alkalischen Phosphatase!). In den meisten Fällen wurden die Gewebsstückchen außerdem in gepuffertem neutralem Formalin (4° C, 12—24 Std) fixiert.

Im Kryostaten (Modell Dittes-Duspiva) wurden 6—12 μ dicke Gefrierschnitte hergestellt, die teils schwimmend, teils auf Objekträger (ohne Eiweißglycerin!) aufgezogen in die verschiedenen Inkubationslösungen kamen.

Entkalkung. Bei der Entkalkung von spongiosahaltigen Stückchen des Knochenmarks (Wirbelkörper) erwiesen sich die üblichen Verfahren (mit verschiedenen Säuren) für die nachfolgenden enzymhistochemischen Untersuchungen als ungeeignet. Es wurde daher nach der Entkalkungsmethode mit Versen vorgegangen, die sich auch bei der histochemischen Darstellung oxydativer Enzyme in Zellen des Knochenmarks bewährt hat (BALOGH 1962, FISCHER 1963). Nach der Fixierung kamen die Gewebsstückchen in eine auf pH 7,0 eingestellte 10%ige Lösung von Äthylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz (Versen). Der Entkalkungsprozeß wurde mit Hilfe eines Magnetrührapparates bei 4° C durchgeführt. Anschließend wurde das entkalkte Material entweder in das Gummi arabicum/Saccharose-Gemisch (s. oben) eingebracht oder sofort im Kryostaten geschnitten. Das auf diese Weise entkalkte Material gewährleistete nicht nur eine ausgezeichnete Strukturerhaltung, sondern ermöglichte auch die Durchführung der meisten hydrolytischen Enzymnachweise; lediglich beim Nachweis der alkalischen Phosphatase kam es zu einer mehr oder weniger deutlichen Fermentinaktivierung.

Enzymhistochemische Nachweisreaktionen

1. Alkalische Phosphatase (KAPLOW 1955, PEARSE 1960). Substrate: Na- α -Naphthylphosphat, Naphthol AS-BI-phosphat. Diazoniumsalze: Echtrotsalz TR, Red Violet LB-Salz.

2. Saure Phosphatase. a) Metallsalzmethode (GOMORI 1953); b) Azofarbstoffmethode (PEARSE 1960; BARKA u. ANDERSON 1962). Substrate: Na- α -Naphthylphosphat, Naphthol AS-TR (und -AS-BI)-phosphat; Diazoniumsalze: Echtrotsalz ITR, Hexazonium-Pararosanilin.

3. Unspezifische Esterase (PEARSE 1960, LÖFFLER 1961). Substrate: α -Naphthylacetat, Naphthol AS-Acetat; Diazoniumsalze: Echtblausalz B, Echtblausalz BB (extra konz.).

4. Naphthol ASD-Chloroacetat-Esterase (MOLONEY u. Mitarb. 1960). Substrat: Naphthol ASD-Chloroacetat. Diazoniumsalz: Echtgranatsalz GBC.

Die Spezifität der einzelnen Enzymnachweise wurde durch entsprechende *Kontrollreaktionen* (Weglassen des Substrates, Hitzeinaktivierung, Zusatz von spezifischen Inhibitoren) geprüft (PEARSE 1960, GÖSSNER 1958 u.a.).

Vergleichsweise wurden zu den enzymhistochemischen Untersuchungen die üblichen histologischen und hämatologischen Färbungen an Paraffinschnitten angestellt.

Weiterhin war es in den meisten Fällen möglich, zu Lebzeiten der betreffenden Patienten enzymcytochemische Untersuchungen an *Blut- und Knochenmarkausstrichen* durchzuführen. Dabei wurden häufig von einem Patienten mehrere Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten angestellt¹. Die Vorbehandlung der Ausstrichpräparate sowie die Durchführung der Enzymnachweise erfolgte mit geringen Modifikationen nach der oben angegebenen Methodik (s. auch FISCHER u. GROPP 1964).

Untersuchungsergebnisse

I. Verteilungsmuster von hydrolytischen Enzymen in normalen Blut- und Knochenmarkzellen des Schnittpräparates (s. auch Tabelle 1)

Granulopoese. Die Myeloblasten zeigten bei den verschiedenen hydrolytischen Enzymnachweisen einen negativen oder höchstens schwach positiven Reaktions-

¹ Der Medizinischen Universitätsklinik Bonn (Direktor: Prof. Dr. A. HEYMER) sind wir für die freundliche Überlassung von Blut- und Knochenmarkausstrichen zu großem Dank verpflichtet.

ausfall. Die Zellen der neutrophilen Entwicklungsreihe — von den Promyelocyten bis hin zu den reifen Neutrophilen — waren vor allem durch eine starke Aktivität der *Naphthol ASD-Chloroacetat-Esterase* gekennzeichnet, während die eosinophilen Leukocyten negativ reagierten. Ähnlich wie am Blut- oder Knochenmarkausstrich gelang es daher auch am Schnittpräparat, sich mit diesem Enzymnachweis einen ausgezeichneten Überblick über die Verteilung und das Ausmaß der neutrophilen Reifungsstufen zu verschaffen. Beim Nachweis der *Naphthol AS-Acetat-Esterase* wiesen die Promyelocyten eine deutliche Aktivität auf, während die reiferen Formen der neutrophilen Entwicklungsreihe sowie die eosinophilen Leukocyten schwächer reagierten. Eine ähnliche Verteilung der Enzymaktivität wurde bei der *sauren Phosphatase*-Reaktion (Azofarbstoffmethode) festgestellt, wobei hier jedoch die Aktivität in den Eosinophilen stärker positiv ausfiel. Beim Nachweis der *alkalischen Phosphatase* wies nur ein Teil der reifen neutrophilen Granulocyten eine unterschiedliche, zumeist schwache Aktivität auf. Eine quantitative Auswertung, wie sie am Ausstrich durch die Ermittlung des sog. Aktivitätsindex (KAPLOW 1955) erfolgt, war am Schnittpräparat nicht möglich.

Tabelle 1. *Verteilungsmuster hydrolytischer Enzyme in Schnittpräparaten blutbildender Organe sowie lympho-retikulärer Gewebe*

Zellart	Alkalische Phosphatase	Saure Phosphatase (Azomethode)	Naphthol AS-Acetat-Esterase	ASD-Chloroacetat-Esterase
Myeloblasten	0	0/(+)	(+)	0
Neutrophile Reifungsstufen (Promyelocyten→Segmentkernige)	0/+ ¹	++/(+)	++/+	+++
Eosinophile	0	++	(+)	0
Erythropoese	0	0	+/-	0
Megakaryocyten	0	++/+++	++/+++	0
Lymphocyten	0	0/(+)	0/(+)	0
Mastzellen	0	++	++	++
Plasmazellen	0	++/++	++/++	0
Reticulo-histiocytäre Zellen . . .	0/+	++/+++	++/+++	0/+
Capillaren (Gefäßendothelien) . . .	+++	0	(+)	0

¹ Ein Teil der segmentkernigen Leukocyten.

Zeichenerklärung: 0 = negativ, (+) = schwach positiv, + = positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv.

Erythropoese. Während die erythropoetischen Vorstufen eine mäßig starke Aktivität der Naphthol AS-Acetat-Esterase aufwiesen, ergaben die übrigen Enzymreaktionen (alkalische und saure Phosphatase, Naphthol ASD-Chloroacetat-Esterase) einen negativen Reaktionsausfall.

Lymphocyten. Ähnlich wie in Ausstrichpräparaten waren die Lymphocyten im histologischen Schnitt nur durch eine schwache bzw. inkonstante Aktivität der sauren Phosphatase und Naphthol AS-Acetat-Esterase gekennzeichnet. Naphthol ASD-Chloroacetat-Esterase und alkalische Phosphatase waren in diesen Zellen nicht nachweisbar.

Megakaryocyten. Bei der histochemischen Darstellung der sauren Phosphatase und Naphthol AS-Acetat-Esterase zeigten die Knochenmarkriesenzellen eine deutliche Fermentaktivität, während die Nachweisreaktionen für die alkalische Phosphatase und Naphthol ASD-Chloroacetat-Esterase negativ ausfielen.

Sonstige Zellelemente des Knochenmarks. Eine starke Aktivität der sauren Phosphatase sowie der α -Naphthyl- und Naphthol AS-Acetat-Esterase wiesen die *reticulo-histiocytären Zellen* in Schnittpräparaten des Knochenmarks, ebenso wie im Lymphknoten und in der Milz auf. Alkalische Phosphatase und Naphthol ASD-Chloroacetat-Esterase fielen in den reticulo-histiocytären Zellen teils negativ, teils schwach positiv aus.

Das Verteilungsmuster der untersuchten hydrolytischen Enzyme in *Plasmazellen*, *Mastzellen* und *Capillaren (Gefäßendothelien)* ist aus der Tabelle 1 ersichtlich.

II. Ergebnisse hydrolytischer Enzymnachweise an Schnittpräparaten bei leukämischen Erkrankungen (s. auch Tabelle 2)

1. Akute Leukosen. Die Zellen unreifzelliger *Paramyeloblastenleukämien* zeigten in Schnittpräparaten keine bzw. nur eine sehr geringe Aktivität hydrolytischer Enzyme: So fiel in den Paramyeloblasten zumeist nur die Reaktion der Naphthol AS-Acetat-Esterase schwach positiv aus (Abb. 1b). Alkalische Phosphatase und Naphthol ASD-Chloroacetat-Esterase konnten in den unreifen myeloischen Zell-elementen nicht nachgewiesen werden. Lediglich die in Schnittpräparaten des

Tabelle 2.
Enzymhistochemische Differenzierung der Zellen verschiedener Leukämieformen am Schnittpräparat

Nachweisreaktion	Akute Leukosen			Chronische Myelose		Chronische Lymphadenose
	Paramyelo-blasten-Leukämie	Monocyten-Leukämie	Promyelo-cyten-Leukämie	Ausgereiftes Stadium	Blastenschub	
Naphthol AS-Acetat-Esterase . .	0/(+)	+++	++/+++	+/++	(+)/+	0/(+)
Naphthol ASD-Chloroacetat-Esterase . .	0	0/(+)	++/+++	+++	0	0
Saure Phosphatase	0/(+)	++/+++	++	(+)/++	(+)	0/(+)
Alkalische Phosphatase	0	0	0	0	0	0

Zeichenerklärung: 0 = negativ, (+) = schwach positiv, + = positiv, ++ = deutlich positiv, +++ = stark positiv.

Knochenmarks vereinzelt liegenden oder in herdförmigen Bezirken anzutreffenden normalen neutrophilen Reifungsformen wiesen die für diese Zellen charakteristische starke ASD-Chloroacetat-Esteraseaktivität auf (Abb. 1a). Diese Methode erlaubte daher auch bei Fällen von akuter unreifzelliger Leukose eine fast quantitative Erfassung der noch vorhandenen neutrophilen Restgranulopoese.

Ein durchaus anderes Bild ergab die enzymhistochemische Analyse in drei Fällen von *Monocyten-Leukämie*: An Schnittpräparaten von Knochenmark, Milz und Lymphknoten wiesen die monocytären Zellen vor allem eine starke Esteraseaktivität (α -Naphthyl- bzw. Naphthol AS-Acetat-Esterase) (Abb. 1d), ferner eine deutliche Aktivität der sauren Phosphatase auf. Durch das gleiche Muster

der Enzymausstattung waren auch die leukämischen Infiltrationen in anderen Organen (z. B. Haut, Speicheldrüsen) gekennzeichnet. Die Naphthol ASD-Chloroacetat-Esterasreaktion fiel nur in einem Teil der monocytären Zellen

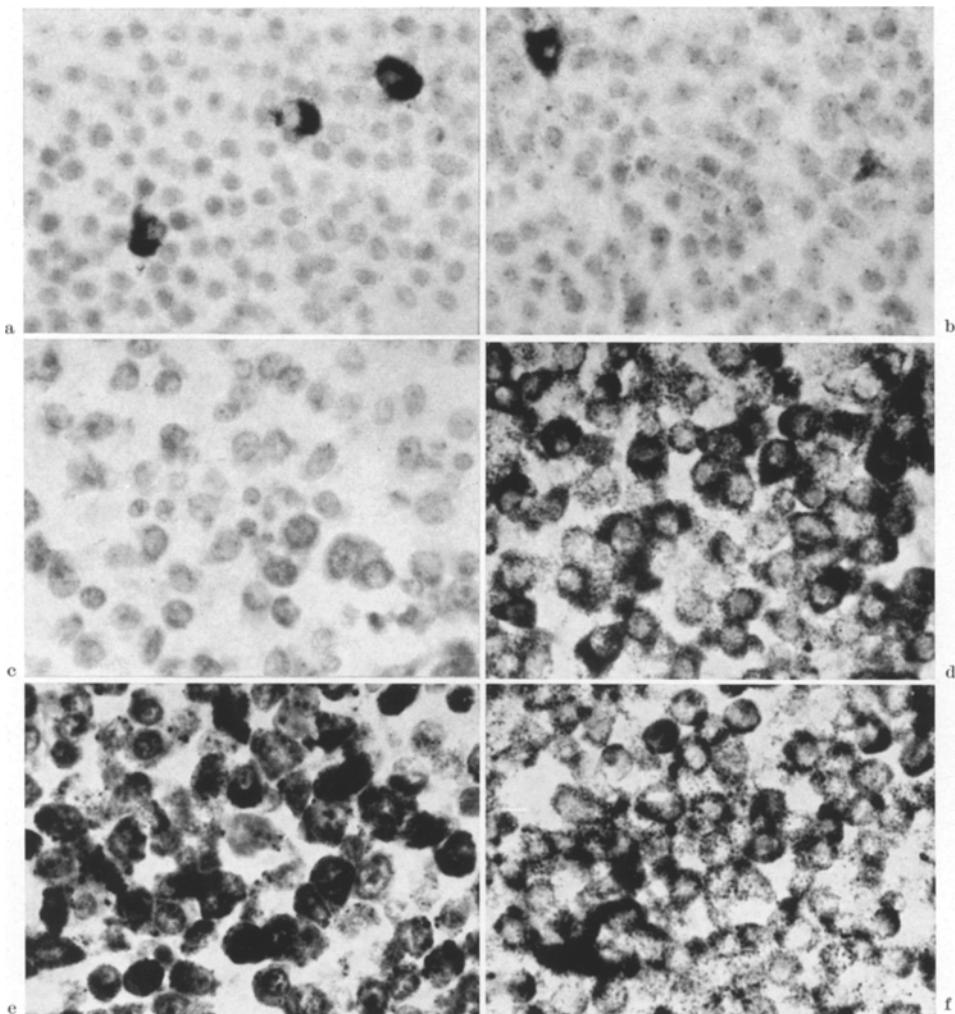


Abb. 1a-f. Histochemische Darstellung der Naphthol ASD-Chloroacetat-Esterase (linke Bildreihe) und Naphthol AS-Acetat-Esterase (rechte Bildreihe) an Schnittpräparaten des Knochenmarks bei verschiedenen Formen von akuter Leukose: a und b Paramyeloblasten-Leukämie, c und d Monocyten-Leukämie, e und f Promyelocytene-Leukämie. Erläuterung siehe Text und Tabelle 2. Vergr. 480 ×

schwach positiv aus (Abb. 1c). Alkalische Phosphatase konnte in den Zellen der Monocyten-Leukämie nicht nachgewiesen werden.

Zwei Fälle von akuter Promyelocytene-Leukämie zeigten in Schnittpräparaten ebenfalls eine deutliche Esteraseaktivität der Leukosezellen (Abb. 1f). Auch saure Phosphatase war in den vorherrschenden Promyelocyten und promyelocytoiden Zellelementen nachweisbar. Im Gegensatz zur Monocyten-Leukämie wiesen die Zellen der Promyelocytene-Leukämie jedoch eine zumeist starke ASD-

Chloroacetat-Esteraseaktivität auf, im Unterschied zu den normalen Promyelocyten häufig mit einem mehr unregelmäßigen und z.T. grobgranulären Reaktionsausfall (Abb. 1e). Die Nachweisreaktionen für alkalische Phosphatase fiel auch hier in den Leukosezellen negativ aus.

2. Chronische Myelosen. In Schnittpräparaten von Knochenmark, Milz, Lymphknoten usw. war die chronische Myelose bei weitgehender *Ausreifung der myeloischen Proliferation* vor allem durch die starke Aktivität der Naphthol

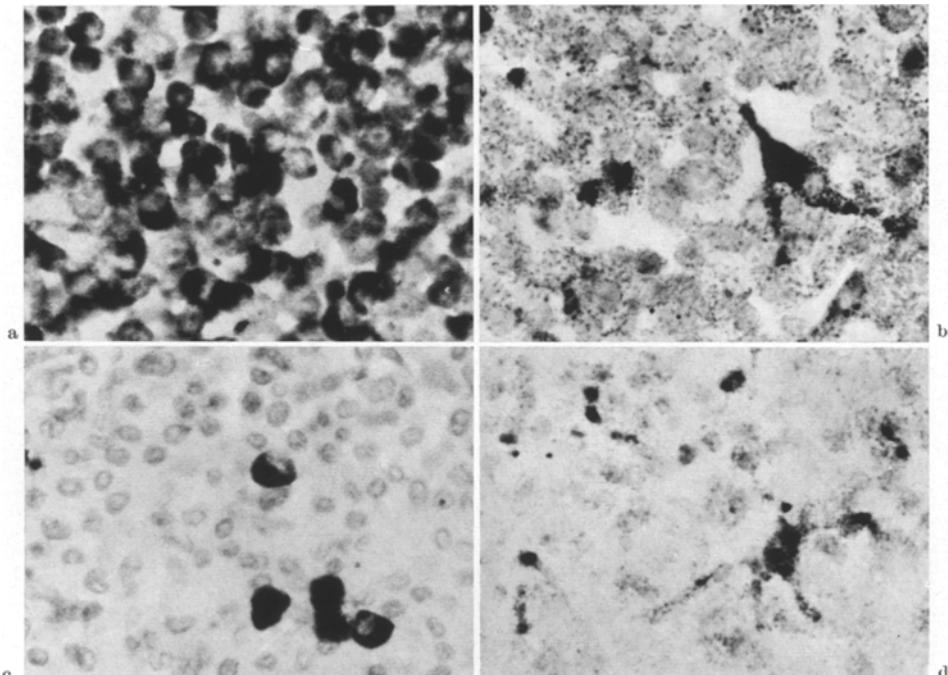


Abb. 2a—d. Histochemischer Nachweis der Naphthol ASD-Chloroacetat-Esterase (linke Bildreihe) und Naphthol AS-Acetat-Esterase (rechte Bildreihe) an *Schnittpräparaten des Knochenmarks bei chronischer Myelose*: a und b ausgereiftes Stadium, c und d terminaler Blastenschub. Vergr. 480 ×

ASD-Chloroacetat-Esterase charakterisiert (Abb. 2a), wie sie auch in den normalen neutrophilen Reifungsstufen nachweisbar war (s. oben). Saure Phosphatase und Naphthol AS-Acetat-Esterase fielen in den Zellen der leukämischen Infiltration mäßig stark positiv aus (Abb. 2b). In Fällen von chronischer Myelose mit *terminalem Blastenschub* zeigten beim Nachweis der ASD-Chloroacetat-Esterase nur die noch vorhandenen neutrophilen Reifungsstufen (von den Promyelocyten bis hin zu den reifen Neutrophilen) einen starken Reaktionsausfall, während dieses Enzym in den Blasten selbst nicht nachweisbar war (Abb. 2c). Bei der Naphthol AS-Acetat-Esterasreaktion war in den unreifzelligen Elementen der chronischen Myelose im allgemeinen eine schwache, im ganzen jedoch etwas stärkere Aktivität als in den Paramyeloblasten der akuten Leukose feststellbar (Abb. 2d). Alkalische Phosphatase kam in typischen Fällen von chronischer Myelose weder in den Myeloblasten noch in den verschiedenen Reifungsstufen zur Darstellung.

Die untersuchten Fälle von chronischer Myelose wiesen ferner eine unterschiedlich starke Beteiligung von reticulo-histiocytären Zellen am leukämischen Krankheitsprozeß auf, was auch hier besonders deutlich durch den starken Ausfall der Esterasereaktion zum Ausdruck kam (Abb. 3).

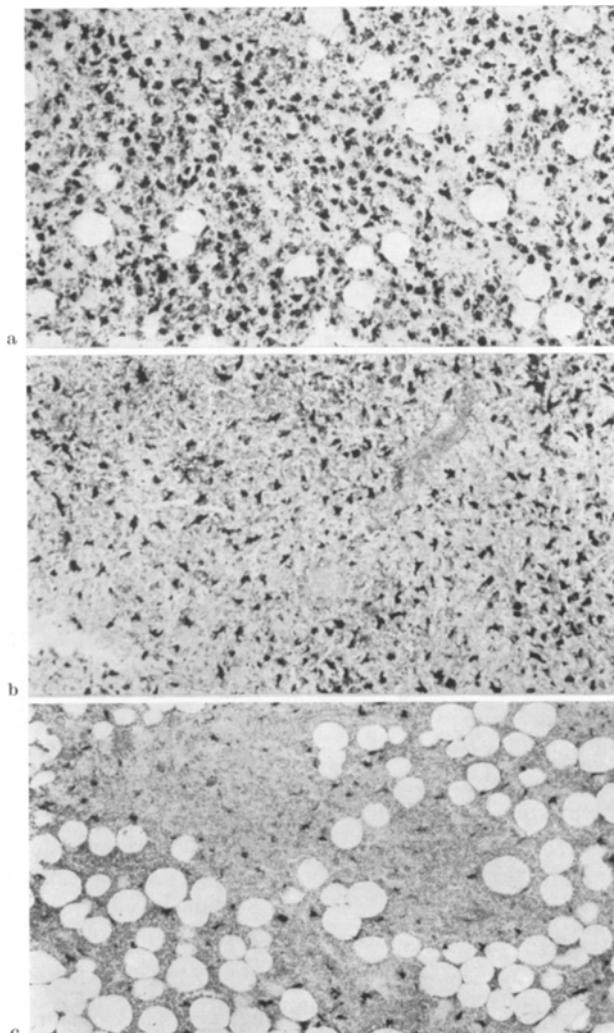


Abb. 3a-c. Nachweis der α -Naphthylacetat-Esterase an Schnittpräparaten des Knochenmarks. Unterschiedlicher Gehalt an esterasepositiven Reticulumzellen bei verschiedenen Verlaufsformen bzw. Endstadien von chronischer Myelose. Vergr. 48 \times

3. Lymphadenosen. Ähnlich den Verhältnissen an Ausstrichpräparaten fand sich auch in Gewebsschnitten in den Infiltraten der chronischen Lymphadenose lediglich eine inkonstante bzw. schwache Aktivität der AS-Acetat-Esterase und sauren Phosphatase. Die übrigen untersuchten Hydrolasen waren in den lymphocytären Zellen nicht nachweisbar.

In einem Fall einer Makroglobulinaemia Waldenström konnte in den lymphoiden Zellen höchstens eine sehr schwache Esterase- und saure Phosphataseaktivität festgestellt werden.

Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß die Anwendung enzymhistochemischer Methoden auch am Obduktionsmaterial bei der pathologisch-anatomischen Beurteilung von Schnittpräparaten — ähnlich wie am Ausstrichpräparat — Hinweise zur Differenzierung der verschiedenen Blut- und Knochenmarkelemente sowie ihrer pathologischen Varianten geben kann. Diese Möglichkeiten ließen sich besonders deutlich am Beispiel der verschiedenen Formen von unreifzelliger (akuter) Leukose demonstrieren, deren Unterscheidung bekanntlich nicht nur klinisch-hämatologisch, sondern vor allem pathologisch-anatomisch nicht selten große Schwierigkeiten bereitet. So gelang es auch am Obduktionsmaterial — ähnlich wie an Blut- und Knochenmarkausstrichen (LÖFFLER 1963) — durch den Nachweis einer starken Esteraseaktivität in den Leukosezellen die Monocyten-Leukämie von Paramyeloblasten-Leukämien zu unterscheiden, deren Zellen nur eine sehr schwache Aktivität dieses Enzyms aufwiesen. Auf diesen Befund haben in jüngster Zeit auch LENNERT u. Mitarb. (1962) bei Untersuchungen am Lymphknoten hingewiesen. Akute Promyelocyten-Leukämien, die nach unseren bisherigen Untersuchungen am Schnittpräparat ebenfalls eine deutliche Reaktion der Naphthol AS-Acetat-Esterase aufwiesen, ließen sich durch den Gehalt der leukämischen Zellen an Naphthol ASD-Chloroacetat-Esterase eindeutig von der Monocyten-Leukämie abgrenzen.

Bei der chronischen Myelose erbrachte die Anwendung der Naphthol ASD-Chloroacetatreaktion am Schnittpräparat, wie keine andere histologische oder hämatologische Färbung, einen Überblick über das Ausmaß und die Verteilung der neutrophilen Entwicklungsstufen von den Promyelocyten bis hin zu den reifen Neutrophilen. Da die Myeloblasten bei dieser Methodik negativ reagierten, ließ sich so auch pathologisch-anatomisch die Diagnose eines terminalen Blastenschubs verifizieren.

Weiterhin erlaubt die Anwendung enzymhistochemischer Methoden an Schnittpräparaten von Leukosen nicht nur eine nähere Differenzierung der leukämischen Zellelemente, sondern sie gibt darüber hinaus auch am Obduktionsmaterial einen Einblick in die Einbeziehung und Lokalisation anderer Zellen und Strukturlemente der blutbildenden Organe und des lympho-retikulären Gewebes im Rahmen des leukämischen Krankheitsprozesses. So vermittelt die Esterase- und saure Phosphatasereaktion eine fast quantitative Erfassung von funktionell aktiven Reticulumzellen in Knochenmark, Milz und Lymphknoten (s. auch LENNERT u. Mitarb. 1962). Der Nachweis der alkalischen Phosphatase an Schnittpräparaten dieser Organe ergibt durch die Enzymaktivität in den Capillarendothelien einen Überblick über die Gefäßarchitektur unter normalen und krankhaften Bedingungen. Dieses Enzym scheint darüber hinaus durch seine histochemisch nachweisbare Bindung an bestimmte Faserstrukturen auch Hinweise auf Faserbildungsvorgänge im Rahmen des leukämischen Krankheitsprozesses zu geben.

Schließlich konnten die von uns durchgeführten vergleichenden enzymhistochemischen Untersuchungen an intravital gewonnenen Blut- und Knochenmark-

ausstrichen sowie Schnittpräparaten des Obduktionsmaterials häufig auch einen tieferen Einblick in den leukämischen Krankheitsprozeß vermitteln. Stellt doch der morphologische Befund bei der Obduktion zumeist nur das Endstadium einer mehr oder weniger langen Kette von Einzelphasen des Krankheitsablaufs hämatologischer Erkrankungen dar, wie es vor kurzem in einer eigenen Beobachtung (FISCHER u. Mitarb. 1963) am Beispiel besonderer Verlaufsformen der chronischen Myelose gezeigt werden konnte. Es bleibt daher zu hoffen, daß die Anwendung enzymhistochemischer Methoden in der Hämatologie — über die praktisch-diagnostischen Möglichkeiten hinaus — vor allem durch die Einbeziehung weiterer vergleichender klinisch-hämatologischer und pathologisch-anatomischer Untersuchungen das Verständnis für den Ablauf leukämischer Erkrankungen erweitert.

Zusammenfassung

Am Obduktionsmaterial wurden bei Fällen verschiedener leukämischer Erkrankungen histochemische Untersuchungen zum Nachweis hydrolytischer Enzyme (alkalische und saure Phosphatase, α -Naphthyl- und Naphthol AS-Acetat-Esterase, Naphthol ASD-Chloroacetat-Esterase) durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß diese Methoden — ähnlich wie an intravital gewonnenen Ausstrichpräparaten — auch bei der pathologisch-anatomischen Beurteilung von Schnittpräparaten über die Möglichkeiten der üblichen histologischen und hämatologischen Färbungen hinaus zur Differenzierung der verschiedenen Blut- und Knochenmarkelemente verhelfen und so zur Unterscheidung und Abgrenzung verschiedener Leukämieformen beitragen können. Diese Methoden gestatten weiterhin einen Überblick über Ausmaß und Beteiligung anderer Zellen und Strukturelemente an dem leukämischen Krankheitsprozeß.

The Differentiation of Leukemias by Enzyme-Histochemical Studies of Tissue Sections

Summary

Histochemical studies (the demonstration of hydrolytic enzymes: alkaline and acid phosphatase, α -naphthyl- and naphthol AS-acetate esterase, naphthol ASD-chloroacetate esterase) were carried out on autopsy material of various leukemic disorders. It could be shown, that these technics, similar to smears obtained during life, are helpful in the pathological anatomical evaluation of sections in differentiating the various blood and bone marrow elements beyond the commonly applied histological and hematological staining technics. They may, therefore, be of aid in distinguishing and identifying various forms of leukemia. In addition, these technics permit a survey of the extent of the leukemic process and of the involvement of other cells and structural elements.

Literatur

BALOGH, K.: Decalcification with Versene for histochemical study of oxidative enzyme systems. *J. Histochem. Cytochem.* **10**, 232—233 (1962).

BARKA, T., and P. J. ANDERSON: Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler. *J. Histochem. Cytochem.* **10**, 741—753 (1962).

BRAUNSTEIN, H., D. G. FREIMAN, and E. A. GALL: Histochemical study of enzymatic activity of lymph nodes. I. Normal and hyperplastic lymph nodes. *Cancer (Philad.)* **11**, 829—837 (1958).

BRAUNSTEIN, H., D. G. FREIMAN, W. THOMAS, and E. A. GALL: A histochemical study of the enzymatic activity of lymph nodes. II. Further investigation of normal and hyperplastic lymph nodes. *Cancer (Philad.)* **15**, 130—138 (1962).

— — — A histochemical study of the enzymatic activity of lymph nodes. III. Granulomatous and primary neoplastic conditions of lymphoid tissue. *Cancer (Philad.)* **15**, 139—152 (1962).

FISCHER, R.: Probleme der Enzymhistochemie beim Nachweis oxydativer Fermente an Blutzellen. In: *Cyto- und Histochemie in der Hämatologie*. 9. Freiburger Symp. S. 170 bis 186. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1963.

—, u. A. GROPP: Cytologische und cytochemische Untersuchungen an normalen und leukämischen *in vitro* gezüchteten Blutzellen. *Klin. Wschr.* **42**, 111—118 (1964).

— P. LORBACHER u. K. SCHUMACHER: Über den terminalen Anstieg der alkalischen Leukozytenphosphatase bei chronischer Myelose. *Klin. Wschr.* **41**, 669—670 (1963).

— Untersuchungen über das Verhalten der Phosphatasen und Esterasen während der Autolyse. *Virchows Arch. path. Anat.* **327**, 304—313 (1955).

GOSSNER, W.: 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.: *Microscopic histochemistry. Principles and practice*. Chicago: Chicago Univ. Press 1953.

HAYHOE, F. G. J.: *Leukaemia. Research and clinical practice*. London: J. & A. Churchill 1960.

HOLT, S. J.: Factors governing the validity of staining methods for enzymes, and their bearing upon the Gomori acid phosphatase technique. *Exp. Cell Res.*, Suppl. **7**, 1—27 (1959).

KAPLOW, L. S.: A histochemical procedure for localizing and evaluating leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow. *Blood* **10**, 1023—1029 (1955).

LAMBERS, K., u. P. BAUER-SIC: Zur Zytchemie der Blutzellen. *Dtsch. med. Wschr.* **87**, 1913—1917 (1962).

LENNERT, K., H. LÖFFLER u. F. GRABNER: Fermenthistochemische Untersuchungen des Lymphknotens. IV. Esterase in Schnitt und Ausstrich. *Virchows Arch. path. Anat.* **335**, 491—512 (1962).

— u. L. D. LEDER: Fermenthistochemische Untersuchungen des Lymphknotens. I. Alkalische Phosphatase in Schnitt und Ausstrich. *Virchows Arch. path. Anat.* **334**, 399—418 (1961).

— — — Fermenthistochemische Untersuchungen am lymphoretikulären Gewebe. *Cyto- und Histochemie i. d. Hämatologie*. 9. Freib. Symposium, S. 363—377. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1963.

LÖFFLER, H.: Cytochemischer Nachweis von unspezifischer Esterase in Ausstrichen. *Klin. Wschr.* **39**, 1220—1227 (1961).

— Enzymhistochemische Befunde bei unreifzelligen Leukosen. *Cyto- und Histochemie i. d. Hämatologie*. 9. Freib. Symposium, S. 275—291. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1963.

— Hinweise zur Unterscheidung unreifzelliger Leukämien mit zytchemischen Methoden. *Dtsch. med. Wschr.* **88**, 1531—1532 (1963).

MERKER, H.: Grundlagen zur klinisch-morphologischen Blutdiagnostik mit Hydrolasen. *Cyto- und Histochemie i. d. Hämatologie*. 9. Freib. Symposium, S. 233—250. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1963.

MOLONEY, W. C., K. MCPHERSON, and L. FLIEGELMAN: Esterase activity in leukocytes demonstrated by the use of Naphthol ASD-Chloroacetate substrate. *J. Histochem. Cytochem.* **8**, 200—207 (1960).

PEARSE, A. G. E.: *Histochemistry. Theoretical and applied*. London: J. & A. Churchill 1960.

SCHÜMMELFEDER, N.: Probleme der Fermentzytchemie. *Folia haemat., N. F.* **6**, 117—144 (1961).

WACHSTEIN, M.: Histochemistry of leukocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **59**, 1052—1065 (1955).