

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

Enzymhistochemische Untersuchungen an den Gewebeleukocyten im Vergleich zu Blut- und Bindegewebszellen bei Maus und Ratte* **

Von

H. E. SCHAEFER und R. FISCHER

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 21. Juli 1964)

Im lockeren Bindegewebe der Nager, insbesondere bei Ratte und Maus, finden sich in unterschiedlicher Zahl Zellen mit deutlich eosinophil granuliertem Cytoplasma und ringförmigem Kern, die als *Gewebeleukocyten* bzw. *Gewebe-eosinophile* bezeichnet werden. Diese Zellen sind ein regelmäßiger Bestandteil des normalen, nicht entzündeten Bindegewebes der Subcutis (MAXIMOW, BENNINGHOFF; v. MÖLLENDORF; STOCKINGER; RYTÖMAA), wo sie bei der Maus vereinzelt etwa 3 Wochen, bei der Ratte 3 Monate nach der Geburt auftreten, um dann später an Zahl zuzunehmen.

Eosinophile Gewebeleukocyten werden auch in einer Reihe anderer Organe und Gewebe der Ratte und Maus beobachtet (RYTÖMAA). So treten sie z.B. im Uterus dieser Tiere in bestimmten Cyclusphasen (offenbar unter dem Einfluß der Oestrogenproduktion) in großer Zahl auf (HOMMA; GANSLER; BIRSING und BORGLIN). Diese Zellen sind jedoch nicht mit den von HAMPERL im menschlichen Endometrium beschriebenen „endometrialen Körnchenzellen“ identisch.

Die Ansichten über die kausale und formale Genese der Gewebseosinophilen gehen weit auseinander, ohne daß bisher in dieser Frage eine endgültige Klärung herbeigeführt werden konnte. Die Vielfalt der Meinungen läßt sich in zwei Haupthypothesen zusammenfassen, zwischen denen es fließende Übergänge gibt (Lit. bei DONTENWILL u. RIX; GROSS u. GEDIGK; RYTÖMAA): Auf der einen Seite wurde in Übereinstimmung mit der Cohnheimschen Entzündungslehre besonders von MAXIMOW das Auftreten von eosinophilen Granulocyten im subcutanen Bindegewebe auf eine Emigration der entsprechenden Blutzellen zurückgeführt. Demgegenüber vertraten vor allem v. MÖLLENDORFF sowie in neuerer Zeit eine Reihe weiterer Autoren (CHU; GUSEK; JAFFÉ u. DOMINGUEZ; PAPACHARALAMPOUS) die Ansicht, daß die Gewebeleukocyten aus ortsständigen Bindegewebszellen, und zwar in erster Linie aus Fibroblasten entstehen.

Die bisherigen Untersuchungen wurden vorwiegend mit den üblichen histologischen Färbeverfahren durchgeführt, deren Ergebnisse — wie die lebhaft diskutierte auch in der neueren Literatur zeigt — sehr unterschiedlich interpretiert werden. Eine weitere Klärung in der Frage nach der Genese und Zugehörigkeit der Gewebseosinophilen war von der Anwendung enzymhistochemischer Methoden zu erwarten.

Wir sind daher der Frage nachgegangen, ob das histochemisch erfaßbare *Enzymmuster* der Gewebeleukocyten dem der Blutleukocyten einerseits oder dem der ortsständigen Bindegewebszellen andererseits entspricht. Die vorliegenden Unter-

* Herrn Prof. Dr. H. HAMPERL zum 65. Geburtstag gewidmet.

** Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

suchungen wurden an Häutchenpräparaten aus normalem, nichtentzündetem subcutanem Bindegewebe von Maus und Ratte sowie an Blut- und Knochenmarksausstrichen durchgeführt.

Material und Methodik

Als Versuchstiere dienten je 20 erwachsene Wistar-Ratten (Gewicht: 200—300 g) und N.M.R.I.-Mäuse (Gewicht: 30—40 g) beiderlei Geschlechts. Die Tötung erfolgte durch Dekapitation.

1. Herstellung der Häutchenpräparate. Die Rückenhaut wurde mit der Schere in der Längsrichtung über der Wirbelsäule gespalten und zur Seite geschlagen. Das in großer Ausdehnung freigelegte lockere subcutane Bindegewebe wurde anschließend mit feiner Schere und Pinzette in Form ca. 1—2 cm² großer Häutchen abpräpariert und in noch feuchtem Zustand mit Präpariernadeln auf entfettete Objektträger aufgezogen, wobei ein stärkeres Ziehen oder Zupfen vermieden wurde. Die luftgetrockneten Häutchenpräparate wurden vor den einzelnen Enzymnachweisen fixiert (s. unten).

2. Blut- und Knochenmarksausstriche. Blutausstriche wurden von Schwanzvenenblut oder dem bei der Dekapitation der Tiere anfallenden arteriellen Blut hergestellt. Knochenmark wurde mit der Präpariernadel aus dem Femur entnommen und in dünner Schicht auf entfettete Objektträger ausgebreitet. Die Ausstrichpräparate wurden nach Lufttrocknung in gleicher Weise wie die Häutchenpräparate fixiert und weiterbehandelt.

3. Fixierung. Die luftgetrockneten Häutchen- und Ausstrichpräparate wurden 10 min in neutralem Formalin-CaCl₂ (BAKER) oder 30 sec in Methanol-Formol (9:1) bei 4° C fixiert, anschließend 10 min unter fließendem Leitungswasser gespült und erneut luftgetrocknet. Für den Nachweis der Cytochromoxydase bzw. Peroxydase wurden in der Regel unfixierte Präparate verwendet.

4. Enzymhistochemische Nachweisreaktionen. a) *Alkalische Phosphatase.* (Azofarbstoffmethode nach KAPLOW). Inkubationszeit: 30 min.

b) *Saure Phosphatase.* (Azofarbstoffmethode nach BARKA u. ANDERSON) Inkubationszeit: 2½ Std.

c) *α-Naphthylacetat-Esterase.* (DAVIS u. ORNSTEIN) Inkubationszeit: 15 min.

d) *Naphthol AS-Acetate-Esterase.* α) Modifizierte Azofarbstoffmethode: 5 mg Naphthol AS-Acetate in 0,5 ml Aceton lösen; Zugabe von 15 ml 0,1 M Michaelis-Veronalnatriumpufferlösung und 1,4 ml hexazotiertem Pararosanilin (BARKA); Aqua dest. ad 50 ml; auf pH 6,8 einstellen. — Inkubationszeit: 70 min.

β) Azofarbstoffmethode nach LÖFFLER. Inkubationszeit: 70 min.

e) *Naphthol ASD-Chloroacetat-Esterase.* (MOLONEY u. Mitarb.) Inkubationszeit: 30—60 min.

f) *Cytochromoxydase/Peroxydase* (BURSTONE). Inkubationszeit: 1 Std.

Dem Reaktionsgemisch (15 mg p-Aminodiphenylamin + 15 mg 8-Amino-1, 2, 3, 4-tetrahydrochinolin) wurde in parallel durchgeführten Versuchen auf 50 ml entweder 5 mg Katalase (Boehringer KAT-I 15674) oder 50 mg Meerrettich-Peroxydase (Boehringer POD-I 15301) zugefügt, gegebenenfalls zusätzlich 20 mg Cytochrom c (Boehringer CYT-C 15143) (s. Tabelle 2).

Die Spezifität der einzelnen Enzymnachweise wurde durch entsprechende *Kontrollreaktionen* (Weglassen des Substrates, Hitzeinaktivierung, Zusatz von spezifischen Inhibitoren usw.) geprüft.

5. Histologische und hämatologische Färbungen. a) *Mastzellenfärbung* (nach LENNERT u. SCHUBERT).

b) *Eosinophilenfärbung* (GOLDSTEIN). In Abänderung der Originalmethode wurde nach der Färbung mit Orcein kurz in 70%igem Isopropanol differenziert.

In besonderen Versuchen wurden die Farbprodukte bestimmter Fermentreaktionen (alkalische Phosphatase, Myeloperoxydase, Naphthol ASD-Chloroacetat-Esterase) in der auf- und absteigenden Alkoholareihe ausgewaschen und am gleichen Präparat die eosinophilen Granula mit Orcein spezifisch dargestellt. Die Ergebnisse wurden jeweils fotografiert und die dabei gewonnenen Bilder verglichen.

Ergebnisse

1. Untersuchungen an Häutchen- und Ausstrichpräparaten der Maus. Bei der Maus besitzen die Gewebeleukocyten der Subcutis einen recht chromatindichten ringförmigen Kern mit relativ kleiner zentraler Aussparung. Während die äußere Begrenzung des Ringkernes glatt erscheint, zeigt der innere Rand besonders bei

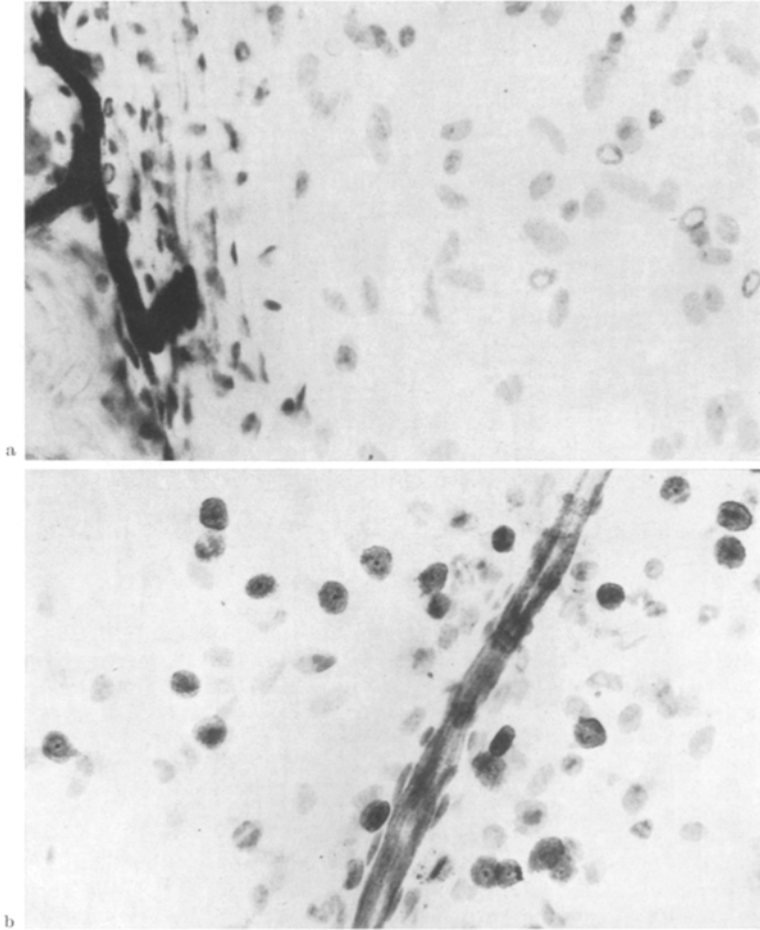


Abb. 1 a u. b. Nachweis der alkalischen Phosphatase an Häutchenpräparaten aus subcutanem Bindegewebe. a Maus: Die Gewebeleukocyten zeigen keine Enzymaktivität. Deutliche Reaktion der Blutcapillaren. b Ratte: Die überwiegende Zahl der Gewebs eosinophilen besitzt eine starke Aktivität der alkalischen Phosphatase. Fibroblasten und Histiocyten bleiben ungefärbt; positiver Reaktionsausfall in den Endothelschläuchen der Blutcapillaren

stärkerer Vergrößerung eine feine Zähnelung. Die bei der Orceinfärbung deutlich darstellbaren Granula umgeben häufig mantelartig den ringförmigen Kern.

In den Häutchenpräparaten der Subcutis älterer Versuchstiere mit struppigem Fell und durch Bißwunden hervorgerufenen entzündlichen Hautreaktionen fielen neben den beschriebenen Gewebs eosinophilen auch ringkernige Zellen ohne eosinophile Granulation auf. Die Kerne dieser Zellen waren häufig stärker segmentiert und entsprachen morphologisch eher den neutrophilen Granulocyten des Blutes. Auch hinsichtlich ihres Enzymmusters unterschieden sie sich von den typischen Gewebs eosinophilen der Subcutis (s. unten).

a) *Alkalische Phosphatase* (Abb. 1a). Die eosinophilen Leukocyten zeigten — ebenso wie die Zellen der neutrophilen Entwicklungsreihe — sowohl in den Häutchen- als auch in den Ausstrichpräparaten keine cytochemisch erfaßbare Aktivität der alkalischen Phosphatase. Histiocyten und Fibroblasten im subcutanen Bindegewebe blieben ebenfalls ungefärbt, im Gegensatz zur deutlichen Enzymaktivität der Blutcapillaren.

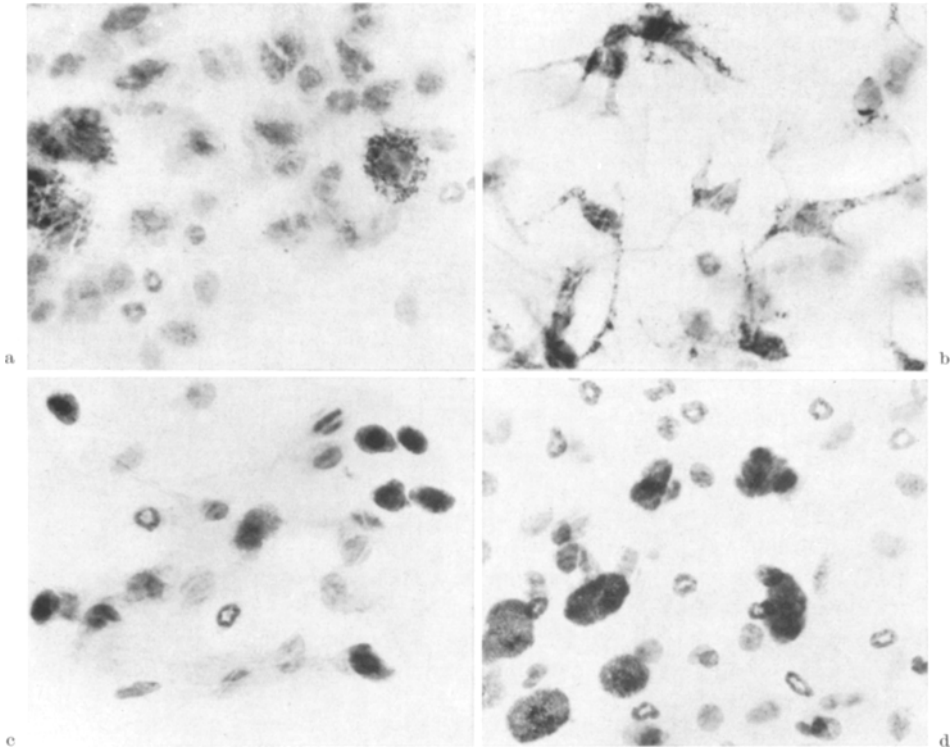


Abb. 2a—d. Histochemische Darstellung verschiedener hydrolytischer Enzyme an Häutchenpräparaten aus subcutanem Bindegewebe der Maus. a Saure Phosphatase: Unterschiedlicher Reaktionsausfall in den ortsständigen Bindegewebszellen; fehlende Aktivität in den ringkernigen Zellen. b α -Naphthylacetat-Esterase: Kräftige Aktivität in den häufig sternförmig verzweigten Fibroblasten; schwache Reaktion in den Histiocyten. Die Gewebseosinophilen bleiben ungefärbt. c Naphthol AS-Acetate-Esterase: Deutliche Reaktion der histiocytären Zellformen; Fibroblasten höchstens schwach positiv. Geringe Enzymaktivität in den ringkernigen Zellen. d Naphthol ASD-Chloracetat-Esterase: Gewebseosinophile, Fibroblasten und Histiocyten ohne Fermentaktivität. Starker Reaktionsausfall in den Mastzellen

b) *Saure Phosphatase* (Abb. 2a). Weder die Gewebeleukocyten noch die eosinophilen und neutrophilen Granulocyten des Blutes und deren Vorstufen im Knochenmark wiesen eine cytochemisch erfaßbare Aktivität dieses Enzyms auf. Fibroblasten und histiocytäre Zellen des subcutanen Bindegewebes zeigten einen unterschiedlichen Reaktionsausfall. Während sich ein Teil der Bindegewebszellen negativ verhielt oder nur schwach angefärbt war, besaßen andere (aktivierte?) Zellen eine stärkere Aktivität der sauren Phosphatase.

c) *α -Naphthylacetat-Esterase* (Abb. 2b). Ebenso wie die eosinophilen und neutrophilen Blutzellen ließen die Gewebeleukocyten in der Subcutis keine Aktivität der α -Naphthylacetat-Esterase erkennen. Im Gegensatz dazu traten

die häufig sternförmig verzweigten Fibroblasten durch eine kräftige Enzymaktivität hervor. Die histiocytären Zellformen reagierten negativ bis schwach positiv.

d) *Naphthol AS-Acetat-Esterase* (Abb. 2c). Die Gewebeleukocyten besaßen eine schwache Aktivität der Naphthol AS-Acetat-Esterase. Dem entsprach auch der Reaktionsausfall in den eosinophilen und neutrophilen Blut- und Knochenmarkzellen. Die häufig in Gruppen zusammenliegenden histiocytären Zellen des subcutanen Bindegewebes zeigten eine mäßig deutliche bis kräftige Naphthol-AS-Acetat-Esteraseaktivität, während die Fibroblasten nur schwach angefärbt waren.

e) *Naphthol ASD-Chloroacetat-Esterase* (Abb. 2d). Dieses Enzym war weder in den eosinophilen Zellen des Gewebes und Blutes bzw. Knochenmarks noch in den Histiocyten und Fibroblasten nachweisbar. Einen starken Reaktionsausfall zeigten dagegen die Mastzellen des subcutanen Bindegewebes.

Bei den oben erwähnten älteren Versuchstieren mit entzündlichen Hautreaktionen fanden sich in den Häutchenpräparaten auch positiv reagierende ringkernige Zellen. Dabei war das Reaktionsprodukt zumeist im Innern des Ringkernes lokalisiert. Durch eine der Enzymreaktion angeschlossene Eosinophilenfärbung an ein und demselben Präparat (s. S. 131) ließ sich feststellen, daß die ASD-Chloroacetat-Esterase-positiven ringkernigen Zellen *nicht* eosinophil granuliert waren. Im Gegensatz dazu zeigten die enzymnegativen Gewebeleukocyten in den umgefärbten Präparaten eine deutliche eosinophile Granulation des Cytoplasmas.

f) *Cytochromoxydase/Myeloperoxydase*. Bei Verwendung der von BURSTONE angegebenen Reagentien zeigten die Gewebeleukocyten eine kräftige, granulär verteilte Aktivität, während die übrigen Zellelemente des subcutanen Bindegewebes nur sehr schwach reagierten (Abb. 3a). Nach vorausgehender *Spülung* der Häutchenpräparate in physiologischer Kochsalzlösung oder *Fixierung* in Formalin-CaCl₂ wurde die schwache Fermentaktivität in den Histiocyten und Fibroblasten völlig unterdrückt, während der deutlich positive Reaktionsausfall in den Gewebeleukocyten unbeeinflusst blieb. Andererseits fiel der Enzymnachweis in den ringkernigen Zellen bei Zusatz von *Katalase* bzw. *Meerrettich-Peroxydase* zum Inkubationsmedium negativ aus, während die Bindegewebszellen ihre schwache Fermentaktivität behielten (Abb. 3b). Die Zugabe von *Cytochrom c* führte zu einer deutlichen Verstärkung des Reaktionsausfalls in den Histiocyten und Fibroblasten bei gleichbleibend starker Enzymaktivität in den Gewebeeosinophilen (Abb. 3c). Wurde dem Reaktionsansatz *Katalase* bzw. *Meerrettich-Peroxydase* zusammen mit *Cytochrom c* zugesetzt, so fand sich in den Histiocyten und Fibroblasten die durch Cytochrom c bedingte, bereits erwähnte Aktivitätszunahme, während in den ringkernigen Zellen eine deutliche Abschwächung der Enzymaktivität nachweisbar war (Abb. 3d). Der Reaktionsausfall in den eosinophilen Zellen des Blutes und Knochenmarks wies ein analoges Verhalten auf.

2. Untersuchungen an Häutchen- und Ausstrichpräparaten der Ratte. Die im lockeren subcutanen Bindegewebe der *Ratte* anzutreffenden Gewebeleukocyten besitzen einen chromatindichten, ringförmigen Kern, dessen Öffnung etwa ein Drittel des Kerndurchmessers ausmacht. Die Kernringe erscheinen nicht selten entrundet oder zu einer Achterform verschlungen. Scheinbare Aufbrüche, Segmentierungen oder Stabformen des Zellkerns, wie sie in Schnittpräparaten durch die Subcutis nachweisbar sind, konnten in den vorliegenden Häutchen-

präparaten nicht oder höchstens andeutungsweise festgestellt werden. Das Cytoplasma dieser Zellen ist von dicht liegenden eosinophilen Granula eingenommen, die gelegentlich nur einen kleinen rundlichen Cytoplasmabezirk im Zentrum der Ringkerne aussparen. Alle im normalen, nichtentzündeten subcutanen Bindegewebe der Ratte nachweisbaren ringkernigen Zellen waren eosinophil granuliert.

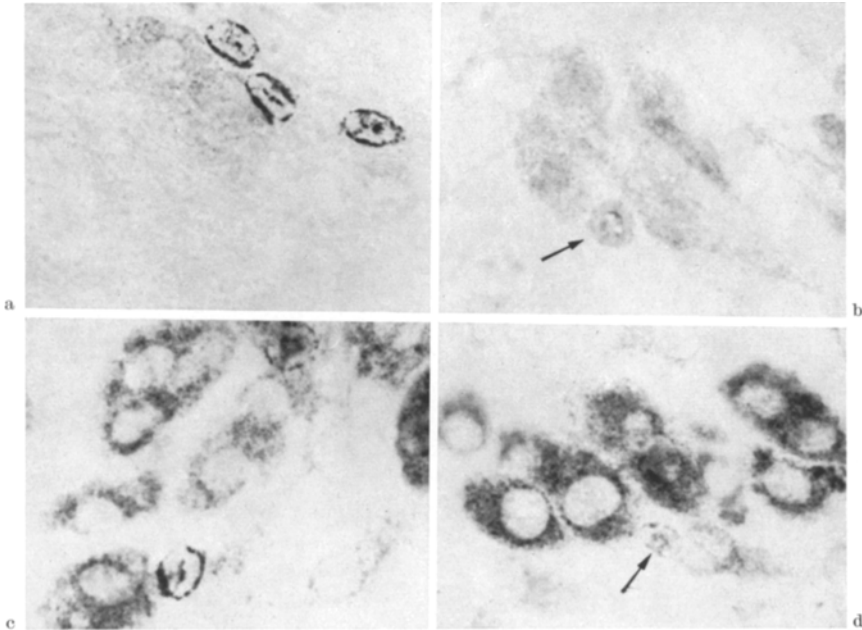


Abb. 3a—d. Differenzierte Darstellung von Myeloperoxydase und Cytochromoxydase an Häutchenpräparaten aus subcutanem Bindegewebe der Maus (Erläuterung s. Text). a Inkubation (nach BURSTONE) ohne Zusatz: Starke Aktivität der ringkernigen Zellen. Schwache Reaktion der übrigen Zellen. b Zugabe von Katalase zum Reaktionsgemisch: Fehlende Reaktion in den Gewebeeosinophilen (→) (Kernfärbung mit Hämalaun!). Die schwache Aktivität in den Histiocyten und Fibroblasten bleibt erhalten. c Zusatz von Cytochrom c: Deutliche Verstärkung des Reaktionsausfalls in den Histiocyten und Fibroblasten bei gleichbleibend starker Enzymaktivität in den ringkernigen Zellen. d Zugabe von Katalase + Cytochrom c: Gewebeeosinophile (→) nur schwach positiv, im Gegensatz zur starken Aktivität der übrigen Zellen des subcutanen Bindegewebes

a) *Alkalische Phosphatase* (Abb. 1b). Die ringkernigen Leukocyten des subcutanen Bindegewebes zeichneten sich — im deutlichen Gegensatz zur Maus — zum großen Teil durch eine zumeist kräftige Reaktion der alkalischen Phosphatase aus; nur etwa ein Drittel der Gewebeleukocyten blieb ungefärbt. Außer den Gewebeeosinophilen kamen beim Nachweis der alkalischen Phosphatase lediglich noch die Endothelschläuche der Blutcapillaren zur Darstellung, während sich die ortsständigen Bindegewebszellen (Fibroblasten, Histiocyten, Mastzellen) enzymnegativ verhielten.

In Ausstrichpräparaten besaßen die eosinophilen und neutrophilen Granulocyten im Blut und deren Vorstufen im Knochenmark zum überwiegenden Teil ebenfalls eine starke Aktivität der alkalischen Phosphatase.

Daß dieser Reaktionsausfall tatsächlich auch den eosinophilen Blutzellen und nicht nur — wie bereits bekannt — den neutrophilen Granulocyten und deren Vorstufen zuzuordnen ist, konnte durch eine der alkalischen Phosphatasereaktion angeschlossene Eosinophilenfärbung an ein und demselben Ausstrichpräparat mit jeweiliger photographischer Wiedergabe

identischer Stellen des Präparates (s. S. 131) bestätigt werden. Im Knochenmark der Ratte wiesen die verschiedenen neutrophilen und eosinophilen Entwicklungsstufen bereits vom überwiegenden Teil der Myelocyten an eine deutliche alkalische Phosphataseaktivität auf. Im peripheren Blutaussstrich waren nahezu alle myeloischen Zellen phosphatasepositiv (mit unterschiedlicher Reaktionsstärke). Eine statistisch signifikante Auszählung der alkalischen Phosphataseaktivität in den reifen Bluteosinophilen allein war wegen ihrer geringen Zahl im peripheren Blutaussstrich (<5%) nicht möglich.

b) *Saure Phosphatase*. Bei Einstellung des Inkubationsmediums auf pH 5,0 zeigten weder die Gewebeleukocyten noch die eosinophilen und neutrophilen Granulocyten des Blutes und deren Vorstufen im Knochenmark eine Aktivität der sauren Phosphatase. Bei pH 6,0—7,0 trat jedoch ein zunehmender Reaktionsausfall in den meisten ringkernigen Zellen sowohl in den Häutchen- als auch in den Ausstrichpräparaten vom peripheren Blut und vom Knochenmark auf. Das Verteilungsmuster entsprach weitgehend dem der alkalischen Phosphatase bei pH 9,0.

c) *α -Naphthylacetat-Esterase*. Die Gewebseosinophilen und die entsprechenden Blut- und Knochenmarkszellen zeigten im allgemeinen nur eine schwache Aktivität der α -Naphthyl-Esterase. Histiocytäre Zellen und Fibroblasten des subcutanen Bindegewebes wiesen eine geringe Anfärbung ihres Cytoplasmas auf. Nur vereinzelte, am ehesten aktivierten Fibroblasten entsprechende Zellformen ließen eine stärkere Reaktion dieses Enzyms erkennen.

d) *Naphthol AS-Acetat-Esterase*. Die ringkernigen Zellen des subcutanen Bindegewebes zeigten — ebenso wie die Bluteosinophilen — eine leichte Anfärbung ihres Cytoplasmas. Einen stärkeren Reaktionsausfall wiesen die Mastzellen auf, während Histiocyten und Fibroblasten zumeist nur schwach positiv reagierten.

e) *Naphthol ASD-Chloroacetat-Esterase*. Weder im Gewebe noch im Blut bzw. Knochenmark wiesen die eosinophilen Leukocyten eine cytochemisch erfaßbare Aktivität dieses Enzyms auf. Ungefärbt blieben auch die histiocytären Zellen und Fibroblasten. Lediglich in Mastzellen war eine deutliche Enzymaktivität nachweisbar.

f) *Cytochromoxydase/Myeloperoxydase*. Die Ergebnisse dieser Enzymreaktion entsprechen auch unter den verschiedenen modifizierten Versuchsbedingungen völlig den Befunden bei der Maus (s. S. 134).

Diskussion

Überblickt man die hier mitgeteilten Ergebnisse vergleichender enzymhistochemischer Untersuchungen (s. Tabelle 1), so läßt sich feststellen, daß das Enzymmuster in den Gewebeleukocyten bei der Maus und Ratte völlig mit der Fermentausrüstung in den morphologisch gleichartigen Blut- und Knochenmarkszellen übereinstimmt. Im Gegensatz dazu bestanden im enzymhistochemischen Verhalten dieser Zellen z.T. deutliche Unterschiede gegenüber den Fibroblasten und Histiocyten des subcutanen Bindegewebes.

Eine Übereinstimmung in der Enzymausstattung der Gewebe- und Blutleukocyten tritt besonders deutlich beim Nachweis der *alkalischen Phosphatase* hervor. Dabei finden sich auch die speciesbedingten Unterschiede in der Enzymausstattung der Bluteosinophilen bei den jeweiligen Gewebseosinophilen gleicher Tierart wieder: Bei der *Ratte* zeichnen sich die meisten neutrophilen und eosino-

Tabelle 1. Die Enzymaktivität der Gewebs eosinophilen im Vergleich zu Blut- und Bindegewebszellen bei Maus und Ratte

	Gewebs-eosinophile	Blut-eosinophile	Blut-neutrophile	Fibroblasten	Histiocyten	Mastzellen
<i>Maus</i>						
Myeloperoxydase	+++	+++	++	0	0	0
Cytochromoxydase . . .	(+)	(+)	(+)	+ - + +	+ + - + + +	+
Alkalische Phosphatase .	0	0	0	0	0	0
Saure Phosphatase . . .	0	0	0	0 - +	(+) - + +	(+)
α -Naphthylacetat-Esterase	0	0	0	+ - + + +	(+)	0
Naphthol AS-Acetat-Esterase	0 - +	0 - +	0 - +	(+)	+ - + +	+ - + +
Naphthol ASD-Chloroacetat-Esterase	0 ¹	0	0 - +	0	0	+ + +
<i>Ratte</i>						
Myeloperoxydase	+++	+++	++	0	0	0
Cytochromoxydase . . .	(+)	(+)	(+)	+ - + +	+ + - + + +	+
Alkalische Phosphatase .	0 - + + + ²	0 - + + + ²	0 - + + + ²	0	0	0
Saure Phosphatase . . .	0	0	0	0 - +	+	+
α -Naphthylacetat-Esterase	(+)	(+)	(+)	0 - + +	0 - +	0
Naphthol AS-Acetat-Esterase	+	+	+	(+)	+	++
Naphthol ASD-Chloroacetat-Esterase	0	0	+ - + +	0	0	+ + +

¹ Nichteosinophile ringkernige Zellen: +.² Die überwiegende Zahl der Gewebe- und Blutleukocyten: stark positiv.

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

philen Blutgranulocyten durch eine starke Aktivität dieses Enzyms aus (MOLONEY; LOBACHER u. Mitarb.). Die gleiche Enzymreaktion zeigt an Häutchenpräparaten des subcutanen Bindegewebes, daß die überwiegende Zahl der Gewebeleukocyten ebenfalls mit einer starken Aktivität der alkalischen Phosphatase ausgestattet ist (Abb. 1b). Im Gegensatz dazu blieben die ortsständigen Fibroblasten und Histiocyten ungefärbt. Im untersuchten normalen, nicht entzündlich veränderten subcutanen Bindegewebe fehlten auch enzympositive *nicht*ringkernige Zellelemente, die als sog. Übergangsformen zwischen den Fibroblasten bzw. Histiocyten und den Gewebeleukocyten angesehen werden könnten. Solche Zwischenstufen wären schon deshalb zu erwarten, weil im Knochenmark der Ratte — im Gegensatz zum Menschen — bereits in vielen Myelocyten ohne Lochkern eine deutliche alkalische Phosphataseaktivität nachweisbar ist.

Bei der *Maus* zeigen die myeloischen Zellen des Blutes und Knochenmarks im Gegensatz zur Ratte *keine* cytochemisch nachweisbare alkalische Phosphataseaktivität (GEORGI u. GOLDENBRUNNER; METCALF u. Mitarb.). Völlig gleichartig verhalten sich nun auch die Gewebeleukocyten im subcutanen Bindegewebe. Auch hier bleiben diese Zellen völlig ungefärbt — im Gegensatz zur deutlichen Enzymaktivität der Blutcapillaren (Abb. 1a).

Eine weitere Analyse der Enzymaktivität in den Gewebeleukocyten war bei Verwendung der in neuerer Zeit von BURSTONE angegebenen Reagentien zum Nachweis der Cytochromoxydase zu erzielen. Durch die beschriebenen Modifikationen des Reaktionsansatzes (s. Tabelle 2) ließ sich nämlich zeigen, daß es sich

Tabelle 2. Differenzierte Darstellung der *Myeloperoxydase* und *Cytochromoxydase* in Blut- und Bindegewebszellen

	Inkubationsmedium: p-Aminodiphenylamin + 8-Amino-1,2,3,4-tetrahydrochinolin (pH 7,4) (BURSTONE)					
	ohne Zusatz	+ Katalase	+ Meerrettichperoxydase	+ Cytochrom c	+ Cytochrom c + Katalase	+ Cytochrom c + Meerrettichperoxydase
Gewebeeosinophile	+++	0	0	+++	(+)	(+)
Bluteosinophile . .	+++	0	0	+++	(+)	(+)
Blutneutrophile . .	++	0	0	++	(+)	(+)
Fibroblasten . . .	(+)	(+)	(+)	+/+++	+/+++	+/+++
Histiocyten . . .	+	+	+	++/++++	++/++++	++/++++

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

bei dem starken Reaktionsausfall in den Gewebeleukocyten in erster Linie um die Aktivität einer *Peroxydase* handelt, wie sie auch in den entsprechenden Blut- und Knochenmarkselementen nachweisbar ist (s. Tabelle 2). Der Befund einer solchen „*Myeloperoxydase*“ (M-Nadireaktion) in den Gewebeeosinophilen ist bereits seit längerem bekannt (v. MÖLLENDORFF). Allerdings wurde die Spezifität dieses Enzymnachweises für myeloische Blutzellen mehrfach — in jüngster Zeit unter anderem von FRITSCH sowie FASSKE — angezweifelt. So soll die Peroxydasereaktion (in der Modifikation von SCHÜMMELFEDER) nicht nur in den ringkernigen Zellen des Mäusemesenteriums („Cricokaryocyten“, FASSKE) sondern in nahezu allen Zellen der Taches laiteuses positiv ausfallen (FRITSCH). Dieser Befund ist nicht verwunderlich, da mit der von SCHÜMMELFEDER angegebenen Modifikation der G-Nadi-Reaktion außer der Myeloperoxydase die in allen tierischen Zellen vorkommende Cytochromoxydase erfaßt wird. Auch bei den vorliegenden Untersuchungen war zwar nach Zugabe von Cytochrom c zum Reaktionsgemisch eine deutliche Enzymaktivität in sämtlichen Zellen des subcutanen Bindegewebes feststellbar (Abb. 3c). Hiervon unterscheidet sich jedoch die nur in den ringkernigen Gewebeleukocyten kräftige Reaktion *ohne* Cytochrom c-Zusatz, die durch Meerrettichperoxydase bzw. Katalase gehemmt wird. Dieses Enzym ließ sich hierdurch eindeutig von der in allen Zellen — in geringer Aktivität auch in den Gewebeeosinophilen — vorkommenden Cytochromoxydase abgrenzen. Der Reaktionsausfall in den Gewebeleukocyten entspricht vielmehr völlig dem Nachweis einer *Myeloperoxydase*, also eines Fermentes, das nicht nur mit dem ursprünglich von WINKLER und GRAEFF angegebenen M-Nadigemisch histochemisch nachweisbar ist sondern auch bei biochemischen Untersuchungen (AGNER; TAKIKAWA u.a.; SCHULTZ u. KAMINKER; ARCHER) neben der Cytochromoxydase in den myeloischen Zellen gefunden wurde.

In nichtringkernigen Zellen, die als Übergangsformen von den Fibroblasten zu den Gewebeleukocyten angesehen werden könnten, war eine derart definierte Myeloperoxydase nie nachweisbar. Zwischenstufen wurden ja besonders von v. MÖLLENDORFF als wesentliche Stütze für eine Entstehung der Gewebeleukocyten aus den ortsständigen Bindegewebezellen herangezogen. Als weitere Übergangsformen gelten auch ringkernige Zellen, denen eine eosinophile Granulation fehlt und die eine schwächere Oxydasereaktion aufweisen. Auch bei den

vorliegenden Untersuchungen fanden sich in Häutchenpräparaten aus subcutanem Bindegewebe der Maus, besonders bei Versuchstieren mit struppigem Fell und durch Bißwunden hervorgerufenen entzündlichen Hautreaktionen, Gewebeleukocyten ohne eosinophile Granulation. In diesen Zellformen ließ sich jedoch im Gegensatz zu den eosinophil granulierten Zellen Naphthol ASD-Chloroacetat-Esterase nachweisen. Sie entsprechen daher aufgrund ihrer Enzymausstattung *neutrophilen Granulocyten* (MOLONEY u. Mitarb.). Hiermit in Einklang steht auch die von mehreren Autoren festgestellte schwächere Peroxydaseaktivität dieser Zellen, ein Befund, der bereits von HAMPERL zur Differenzierung von neutrophilen und eosinophilen Granulocyten in der menschlichen Magenschleimhaut benutzt wurde.

Neben den bereits erwähnten Fermenten (alkalische Phosphatase, Myeloperoxydase) weichen die Gewebeleukocyten gegenüber den ortständigen Bindegewebszellen auch in ihrem sonstigen Enzymgehalt z.T. deutlich ab (s. Tabelle 1). So zeigen die ringkernigen Zellen des subcutanen Bindegewebes eine negative bzw. nur schwach positive Esteraseaktivität, im Gegensatz zum deutlichen Reaktionsausfall in den Fibroblasten (α -Naphthylacetat-Esterase) und Histiocyten (Naphthol AS-Acetate-Esterase). Sie stimmen andererseits auch hier mit den entsprechenden Blut- und Knochenmarkszellen überein.

Die vorliegenden Untersuchungen am normalen, nicht entzündlich veränderten subcutanen Bindegewebe von Ratte und Maus sollten in erster Linie einen Beitrag zur besseren Charakterisierung der dort auftretenden Gewebeleukocyten liefern. Diese Experimente stellen gewissermaßen eine „Bestandaufnahme“ für weitere Untersuchungen dar. Die festgestellte völlige Übereinstimmung im Enzymmuster der Gewebeleukocyten mit den entsprechenden Blut- und Knochenmarkszellen erfährt zwar durch neuere bauelementhistochemische Untersuchungen von GÜTHEIT und KÖHLER an den Gewebeleukocyten des Kaninchens eine weitere Bestätigung und Ergänzung. Zur Frage nach der Herkunft der Gewebeleukocyten können diese Ergebnisse jedoch noch keine endgültige Klärung herbeiführen. Hierzu sind weitere histochemische Untersuchungen erforderlich, die vor allem die systematische Beobachtung der Vorgänge am entzündeten Bindegewebe einschließen müssen.

Zusammenfassung

Vergleichende enzymhistochemische Untersuchungen an Häutchenpräparaten aus normalem, nicht entzündlich verändertem Bindegewebe sowie an Blut- und Knochenmarksausstrichen von Maus und Ratte haben gezeigt, daß das Enzymmuster der Gewebeeosinophilen mit der Fermentausstattung der entsprechenden Blut- und Knochenmarkszellen völlig übereinstimmt. Dabei ließen sich auch, vor allem beim Nachweis der alkalischen Phosphatase, die speciesbedingten Unterschiede der Enzymaktivität der Bluteosinophilen in den Gewebeeosinophilen gleicher Tierart wiederfinden.

Im Gegensatz dazu wichen die Fibroblasten und Histiocyten des subcutanen Bindegewebes in ihrem Enzymgehalt von den Gewebeeosinophilen deutlich ab.

Die Gewebeleukocyten besaßen ebenso wie die neutrophilen und eosinophilen Blut- und Knochenmarkszellen eine starke Aktivität der Myeloperoxydase, die sich von der in allen Zellen vorkommenden Cytochromoxydase eindeutig abgrenzen ließ.

A comparative enzyme-histochemical study of the tissue leukocytes, blood cells and connective tissue cells of the mouse and rat

Summary

The enzyme-histochemical studies performed in cells of non inflamed connective tissue, blood and bone marrow showed, that the enzyme pattern of the tissue eosinophiles is identical to that present in the blood eosinophiles. Furthermore, the enzyme species borne differences of the mouse and rat blood eosinophiles, could be found as well in the tissue eosinophiles, especially in regard to the alkaline phosphatase.

In contrast, a clear difference was found between the enzyme content of the fibroblasts and histiocytes and that of the tissue eosinophiles.

The tissue leukocytes as well as the neutrophiles and the eosinophiles in blood and bone marrow showed a strong myeloperoxidase activity. Such reaction could be sharply outlined from the cytochrome oxidase reaction present in all cells.

Literatur

- AGNER, K.: Verdoperoxydase. A ferment isolated from leucocytes. *Acta physiol. scand.* **2**, Suppl. VIII, 1—62 (1941).
- ARCHER, G. T., and J. G. HIRSCH: Isolation of granulas from eosinophil leucocytes and study of their enzyme content. *J. exp. Med.* **118**, 277—286 (1963).
- BARKA, T., and P. J. ANDERSON: Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler. *J. Histochem. Cytochem.* **10**, 741—753 (1962).
- BENNINGHOFF, A.: Beobachtungen über Umformungen der Bindegewebszellen. *Arch. mikr. Anat.* **99**, 570—605 (1923).
- BJERSING, L., and N. E. BORGLIN: Effect of hormones on incidence of uterine eosinophilia in rats. *Acta path. microbiol. scand.* **60**, 27—35 (1964).
- BURSTONE, M. S.: New histochemical techniques for the demonstration of tissue oxydase (cytochrome oxydase). *J. Histochem. Cytochem.* **7**, 112—122 (1959).
- Histochemical demonstration of cytochrome oxydase with new amine reagents. *J. Histochem. Cytochem.* **8**, 63—70 (1960).
- Modifications of histochemical techniques for the demonstration of cytochrome oxydase. *J. Histochem. Cytochem.* **9**, 59—65 (1961).
- CHU, C. H. M.: A study of the subcutaneous connective tissue of the mouse, with special reference to nuclear type, nuclear division and mitotic rhythm. *Anat. Rec.* **138**, 11—26 (1960).
- DAVIS, B. J., and L. ORNSTEIN: High resolution enzyme localisation with a new diazo reagent "hexazonium pararosaniline". *J. Histochem. Cytochem.* **7**, 297 (1953).
- DONTENWILL, W., und J. RIX: Schlummerzelltheorie und Cohnheimsche Entzündungslehre. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **97**, 138—156 (1957/58).
- FASSKE, E.: Über Cricokaryocyten im aktiven Mesenchym. *Virchows Arch. path. Anat.* **335**, 63—71 (1962).
- FRITSCH, H.: Zur Frage der ringkernigen Zellen in den „Taches laiteuses“ des Mesenterium der Maus. *Z. Zellforsch.* **59**, 224—238 (1963).
- GANSLER, H.: Über ringkernige Gewebsleukoeyten im Genitaltrakt der Ratte und ihren Zusammenhang mit weiblichen Sexualhormonen. *Virchows Arch. path. Anat.* **325**, 90—97 (1954).
- Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Uterusmuskel der Ratte unter Follikelhormonwirkung. *Virchows Arch. path. Anat.* **329**, 235—244 (1956).
- GEORGII, A., u. P. GOLDENBRUNNER: Über alkalische Phosphatase in Leukoeyten der Maus. *Frankfurt. Z. Path.* **72**, 209—217 (1962).

- GOLDSTEIN, D. J.: Selective staining of eosinophil granules in sections by alkaline orcein in a concentrated urea solution. *Stain Technol.* **38**, 49—51 (1963).
- GRAEFF, S.: Der kolorimetrische Nachweis von Zelloxydase unter optimalen Bedingungen. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **35**, 481—487 (1925).
- GROSS, R., u. P. GEDIGK: Die eosinophilen Leukocyten. In: *Physiologie und Physiopathologie der weißen Blutzellen*, hrsg. v. H. BRAUNSTEINER. Stuttgart: Georg Thieme 1959.
- GÜTHERT, H., et M. KÖHLER: Recherches sur l'origine des cellules leucocytaires dans les inflammations. *Ann. Anat. path.* **9**, 49—55 (1964).
- GUSEK, W.: Submikroskopische Untersuchungen zur Feinstruktur aktiver Bindegewebszellen. *Veröffentl. morph. Path. H.* **64**, Stuttgart 1962.
- HAMPERL, H.: Zur Histologie der akuten Gastritis und der Erosionen der Magenschleimhaut. *Beitr. path. Anat.* **90**, 85—141 (1932).
- Über endometriale Granulocyten (endometriale Körnchenzellen). *Klin. Wschr.* **32**, 665—668 (1954).
- HOMMA, E.: Pathologische und biologische Untersuchungen über die Eosinophilenzellen und die Eosinophilie. *Virchows Arch. path. Anat.* **233**, 11—51 (1921).
- JAFFÉ, R., u. A. DOMINGUEZ: Über extramedulläre Leukocytenbildung im Bindegewebe der Ratte. *Frankfurt. Z. Path.* **73**, 1—9 (1963).
- 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).
- Cytochemistry of leukocyte alkaline phosphatase. Use of complex naphthol AS-phosphate in azo dye-coupling technics. *Amer. J. clin. Path.* **39**, 439—449 (1963).
- LENNERT, K., u. J. C. F. SCHUBERT: Untersuchungen über die sauren Mucopolysaccharide der Gewebsmastzellen am menschlichen Knochenmark. *Frankfurt. Z. Path.* **69**, 579—590 (1959).
- LÖFFLER, H.: Cytochemischer Nachweis von unspezifischen Esterasen an Ausstrichen. *Klin. Wschr.* **39**, 1220—1227 (1961).
- LORBACHER, P., R. FISCHER u. D. SCHMÄHL: Über das Verhalten der alkalischen Leukocytenphosphatase bei experimentellen Tiertumoren. In: *Cyto- und Histochemie in der Hämatologie*. 9. Freiburger Symp., S. 320—328. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1963.
- MAXIMOW, A. A.: Über entzündliche Bindegewebsneubildung bei der weißen Ratte und die dabei auftretenden Veränderungen der Mastzellen und Fettzellen. *Beitr. path. Anat.* **35**, 91—126 (1904).
- Über die Histogenese der entzündlichen Reaktion. Nachprüfung der v. Möllendorffschen Trypanblauversuche. *Beitr. path. Anat.* **82**, 1—26 (1929).
- METCALF, D., N. SPARROW, and R. WYLIE: Alkaline phosphatase activity in mouse lymphoma tissue. *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.* **40**, 215—224 (1962).
- MÖLLENDORFF, W. v.: Bindegewebsstudien V. Die Ableitung der entzündlichen Gewebsbilder aus einer den Bindegeweben gemeinsamen Zellbildungsfolge. *Z. Zellforsch.* **6**, 61—150 (1928).
- , u. M. v. MÖLLENDORFF: Das Fibrocytennetz im lockeren Bindegewebe. *Z. Zellforsch.* **3**, 503—601 (1926).
- MOLONEY, W. C.: Leukocyte alkaline phosphatase activity in the rat. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **75**, 31—36 (1958/59).
- K. MCPHERSON, and L. FLIEGELMAN: Esterase activity in leucocytes demonstrated by the use of naphthol ASD-chloroacetate substrate. *J. Histochem. Cytochem.* **8**, 200—207 (1960).
- PAPACHARALAMPOUS, N. X.: Über das Wesen und die Herkunft der sog. ringkernigen Gewebeleukocyten. *Frankfurt. Z. Path.* **73**, 452—455 (1964).
- RYTÖMAA, T.: Organ distribution and histochemical properties of eosinophil granulocytes in rat. *Acta path. microbiol. scand.* **50**, Suppl. 140, 1—118 (1960).
- SCHÜMMELFEDER, N.: Untersuchungen zur histochemischen Indophenolblausynthese. *Virchows Arch. path. Anat.* **317**, 707—769 (1950).

SCHULTZ, J., and K. KAMINKER: Myeloperoxydase of the leucocyte of normal human blood. I. Content and localisation. *Arch. Biochem.* **96**, 465—467 (1962).

STOCKINGER, W.: Bindegewebsstudien. IV. Das lockere Bindegewebe der weißen Maus in verschiedenen Altersstufen mit besonderer Berücksichtigung der Mastzellen und der Gewebsleukocyten. *Z. Zellforsch.* **6**, 27—60 (1928).

TAKIKAWA, K., T. ITO, J. KATO, H. YOSHIDA, H. KONDO, and J. MIYATA: Studies on the isolation of granules and mitochondria of the leukocytes. *Acta haemat. (Basel)* **18**, 179—184 (1957).

WINKLER, F.: Der Nachweis von Oxydase in Leukocyten mittels der Dimethylparaphenylendiamin-Naphthol-Reaktion. *Folia haemat. (Leipzig)* **4**, 323—328 (1907).

Dr. H. E. SCHAEFER und Priv.-Doz. Dr. R. FISCHER,
Pathologisches Institut der Universität,
53 Bonn-Venusberg