

## Vergleichende enzymhistochemische Untersuchungen an den Gewebseosinophilen im Uterus von Ratte und Maus\*

R. FISCHER und H. E. SCHAEFER

Pathologisches Institut der Universität Bonn (Direktor: Prof. Dr. H. HAMPERL)

Eingegangen am 27. September 1965

Im Stroma der Uteruswandung erwachsener Ratten und Mäuse findet sich eine cyclusabhängige, unterschiedlich dichte Durchsetzung mit eosinophil granulierte Leukozyten. Diese unter dem Einfluß von Follikelhormon stehende Infiltration fehlt sowohl in den Uteri gravider bzw. mit Progesteron behandelter Tiere als auch bei infantilen oder kastrierten Ratten und Mäusen (HOMMA; GANDER; W. M. ALLEN; GANSLER, 1954 u. 1956; BENOIT; RYTÖMAA; BEAVER u. DUMMIT; JÖCHLE; SCHULZ; BJERSING u. BORGLIN). Die funktionelle Bedeutung dieser hormonell beeinflußten Veränderung im Uterusstroma der Nager ist bisher unbekannt. Strittig ist vor allem noch die Frage nach der formalen Genese der als Gewebseosinophile bezeichneten Zellen. Ähnlich wie bei den Gewebseosinophilen an anderen Stellen des lockeren Bindegewebes der Nager stehen auch hier im wesentlichen die Ansichten über eine hämatogene Herkunft (HOMMA) der einer ortsständigen Entstehung aus Fibroblasten (GANSLER, 1954; BENOIT), glatten Muskelzellen (GANSLER, 1956), Zellen des RES (JÖCHLE) oder Adventitiazellen (SCHULZ) gegenüber.

Nachdem in einer früheren Untersuchung (SCHAEFER u. FISCHER) gezeigt werden konnte, daß das cytochemisch erfaßbare Enzymmuster der Gewebseosinophilen im normalen subcutanen Bindegewebe bei Ratte und Maus völlig mit der Fermentausstattung der Bluteosinophilen übereinstimmt, von der der ortsständigen Bindegewebsszellen jedoch zum Teil deutlich abweicht, erschien es angezeigt, in Fortführung und Erweiterung dieser Experimente entsprechende vergleichende enzymhistochemische Untersuchungen auch an den Gewebseosinophilen im Uterus von Ratte und Maus durchzuführen.

In der vorliegenden Mitteilung, die den Ausgangspunkt für weitere experimentelle Untersuchungen darstellt, soll über die enzymhistochemischen Befunde an den Uteri erwachsener Ratten und Mäuse während der verschiedenen Cyclusphasen sowie nach Kastration berichtet werden.

### Material und Methodik

#### I. Tierversuche

Als Versuchstiere dienten je 20 ausgewachsene weibliche Wistar-Ratten (Gewicht 200 bis 300 g) und N.M.R.I.-Mäuse (Gewicht: 30—40 g).

Die Bestimmung der jeweiligen Cyclusphase erfolgte nach den von E. ALLEN sowie LONG und EVANS angegebenen Kriterien an Schnittpräparaten der Vagina, gelegentlich zusätzlich an Vaginalabstrichen, die vor der Tötung der Versuchstiere hergestellt wurden.

\* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Bei je 4 Ratten und Mäusen wurde zwischen 8 und 41 Tagen vor dem Tode eine *Kastration* durch doppelseitige Ovariektomie vorgenommen und dabei gleichzeitig ein Uterushorn (zu Vergleichszwecken) mit entfernt.

Die Tötung der Versuchstiere erfolgte durch Decapitation.

## *II. Histochemische Methoden*

Von verschiedenen Stellen des Uterus wurden kleine Stückchen entnommen und im Kryostaten (DITTES-DUSPITVA) 6—8  $\mu$  dicke *Serienschnitte* hergestellt, die je nach den durchzuführenden Enzymnachweisen weiterverarbeitet wurden (s. SCHAEFER u. FISCHER). In einzelnen Fällen wurden die Gewebsstückchen zunächst 16—24 Std in eiskaltem Formalin-CaCl<sub>2</sub> (BAKER) fixiert, anschließend kurz zwischen Filterpapier abgetupft und in eine Lösung von 1% Gummi arabicum/0,88 M Saccharose bei 4° C (HOLT) gebracht. Im Kryostaten wurden Gefrierschnitte hergestellt, die teils schwimmend, teils auf Objekträger aufgezogen in die verschiedenen Inkubationslösungen kamen.

*Blutausstriche* wurden von Schwanzvenenblut oder dem bei der Decapitation der Tiere anfallenden arteriellen Blut hergestellt. *Knochenmark* wurde mit der Präpariernadel aus dem Femur entnommen und in dünner Schicht auf entfettete Objekträger ausgestrichen. Nach Lufttrocknung wurden die Ausstrichpräparate in entsprechender Weise wie die Schnittpräparate weiterverarbeitet.

An den Schnitt- und Ausstrichpräparaten wurden die Reaktionen zum histochemischen Nachweis folgender *Enzyme* durchgeführt: Alkalische und saure Phosphatase,  $\alpha$ -Naphthyl- und Naphthol AS-Aacetat-Esterase, Naphthol ASD-Chloroacetat-Esterase, Cytochromoxydase und Myeloperoxydase (mit verschiedenen Kontrollreaktionen). Einzelheiten der Methodik sind in einer früheren Arbeit (SCHAEFER u. FISCHER) angegeben.

Zur *Darstellung der eosinophilen Granula* dienten die Orcein-Methode nach GOLDSTEIN und die Färbung mit Biebricher Scharlach (SPICER u. LILLIE).

## Ergebnisse

### *I. Ratte*

Je nach der Cyclusphase, in der die Tiere getötet wurden, fand sich in den Schnittpräparaten des Uterus eine unterschiedlich dichte Infiltration der Uteruswandung mit eosinophil granulierten Leukocyten, die vor allem im Stroma der Submucosa sowie zwischen den glatten Muskelzellen der inneren, ringförmig verlaufenden Muskelschicht anzutreffen waren (Abb. 1 b). Die Zahl der Eosinophilen war im Prooestrus und Oestrus am größten. In diesen Stadien wurden Ansammlungen von eosinophilen Leukocyten um größere Blutgefäße, besonders in der lockeren Bindegewebszone zwischen den beiden Muskelschichten beobachtet. Morphologisch und färberisch gleichartige Zellen fanden sich auch intravasal und schienen an einzelnen Stellen die Gefäßwandung zu durchdringen.

Die dicht liegenden, relativ groben Granula der Uteruseosinophilen zeigten eine deutliche Anfärbung mit Eosin, Biebricher Scharlach und Orcein. Der chromatindichte Kern besaß zumeist eine Ringform; nicht selten wurden jedoch auch — offenbar durch die Schnittebene bedingt — scheinbare Aufbrüche, Segmentationen oder Stabformen des Kernringes beobachtet.

Neben den beschriebenen eosinophilen Leukocyten fanden sich im Uterusstroma einzelne leukocytäre Zellen *ohne eosinophile Granulation* und mit einem zumeist stärker segmentierten Kern. In größerer Zahl fanden sich solche Elemente im Metoestrus und Dioestrus, wo sie zumeist unterhalb des Drüsenepithels lagen, dieses nicht selten durchsetzten und auch im Uteruslumen anzutreffen waren.

Acht Tage nach der Kastration hatte die Zahl der eosinophilen Leukocyten deutlich abgenommen. Nach 3—4 Wochen waren im Uterusstroma keine Zellen mit eosinophiler Granulation mehr nachweisbar.

a) *Alkalische Phosphatase.* Ebenso wie die eosinophilen und neutrophilen Granulocyten im Blut und deren Vorstufen im Knochenmark besaßen die Gewebseosinophilen im Uterusstroma der Ratte in allen untersuchten Cyclusstadien eine starke Aktivität der alkalischen Phosphatase (Abb. 1a). Schon bei schwacher Vergrößerung gelang es, sich mit dieser Enzymreaktion eine gute Übersicht über das Ausmaß und die Verteilung der eosinophilen Leukocyten in der Uteruswandung zu verschaffen. Sowohl die ortsständigen Bindegewebszellen der Submucosa als auch die glatten Muskelzellen wiesen keine oder höchstens eine sehr schwache (äußere Längsmuskelschicht) Enzymaktivität auf. Deutlich positiv reagierten dagegen die Capillaren. Das Drüseneipithel zeigte eine (in Abhängigkeit von der Cyclusphase stehende) unterschiedlich stark ausgeprägte, vorwiegend apikal lokalisierte Aktivität der alkalischen Phosphatase.

Nach der *Kastration* nahm die Zahl der alkalische Phosphatase-positiven Leukocyten im Uterusstroma deutlich ab. So wurden nach 8 Tagen nur noch vereinzelte enzympositive Eosinophile beobachtet, während die Blutcapillaren weiterhin deutlich zur Darstellung kamen (Abb. 3a u. b).

b) *Saure Phosphatase.* Die Gewebseosinophilen im Uterus der Ratte zeigten — ebenso wie die eosinophilen Granulocyten im peripheren Blutaussstrich — keine oder nur eine geringe Aktivität der sauren Phosphatase. Glatte Muskelfasern, ortsständige Bindegewebszellen, Makrophagen sowie die Epithelien der Drüsenschläuche wiesen eine schwache bis stark positive Enzymaktivität auf.

c)  *$\alpha$ -Naphthyl- und Naphthol AS-Acetat-Esterase.* Die Gewebseosinophilen im Uterus der Ratte besaßen — ebenso wie die Bluteosinophilen — nur eine schwache Aktivität der  $\alpha$ -Naphthylacetat-Esterase, während die Reaktion bei Verwendung von Naphthol AS-Acetat als Substrat stärker ausfiel. Deutlich bis stark positiv reagierten dagegen, besonders beim Nachweis der  $\alpha$ -Naphthylacetat-Esterase, die apikalen Anteile der Drüseneipithelien, ferner histiozytäre Elemente sowie die Zellen der äußeren Muskelschicht, während die innere Ringmuskulatur nur schwach angefärbt wurde.

d) *Naphthol ASD-Chloroacetat-Esterase.* Die eosinophilen Leukocyten wiesen weder im Uterusstroma noch im Blut- und Knochenmarksausstrich eine Aktivität der Naphthol ASD-Chloroacetat-Esterase auf. Auch die übrigen Gewebsstrukturen des Uterus der Ratte zeigten — abgesehen von der bekannten starken Enzymaktivität in den Mastzellen — keinen positiven Reaktionsausfall.

Im Gegensatz zu den Gewebseosinophilen fand sich in den oben erwähnten nicht eosinophil granulierten Leukocyten eine Naphthol ASD-Chloroacetat-Esteraseaktivität, wie sie dem Reaktionsausfall in den neutrophilen Granulocyten in Blut und Knochenmark entspricht.

e) *Cytochromoxydase/Myeloperoxydase.* Bei den verschiedenen Modifikationen der Methode von BURSTONE zum Oxydasenachweis (SCHAEFER u. FISCHER) konnte ein unterschiedlicher Reaktionsausfall in den Gewebseosinophilen und in den übrigen Gewebsstrukturen des Uterus festgestellt werden: Im Gegensatz zu den Gewebseosinophilen zeigten die glatten Muskelzellen und die Zellen des ortsständigen Bindegewebes erst nach Zugabe von Cytochrom c zur Inkubationslösung einen deutlichen Farbniederschlag. Formalinfixierung bzw. Spülen in physiologischer Kochsalzlösung hemmte die Enzymaktivität in den ortsständigen Zellen, während der deutlich positive Reaktionsausfall in den Gewebseosinophilen ebenso wie in den entsprechenden Blut- und Knochenmarkszellen durch diese

Vorbehandlung praktisch unbeeinflußt blieb. Andererseits konnte die Aktivität in den Gewebseosinophilen durch Zusatz von Katalase bzw. Meerrettichperoxydase zum Inkubationsgemisch weitgehend unterdrückt werden.

### *II. Maus*

Auch bei der Maus war die Durchsetzung der Uteruswandung mit eosinophilen Leukocyten während des Prooestrus und Oestrus am stärksten ausgeprägt. Die

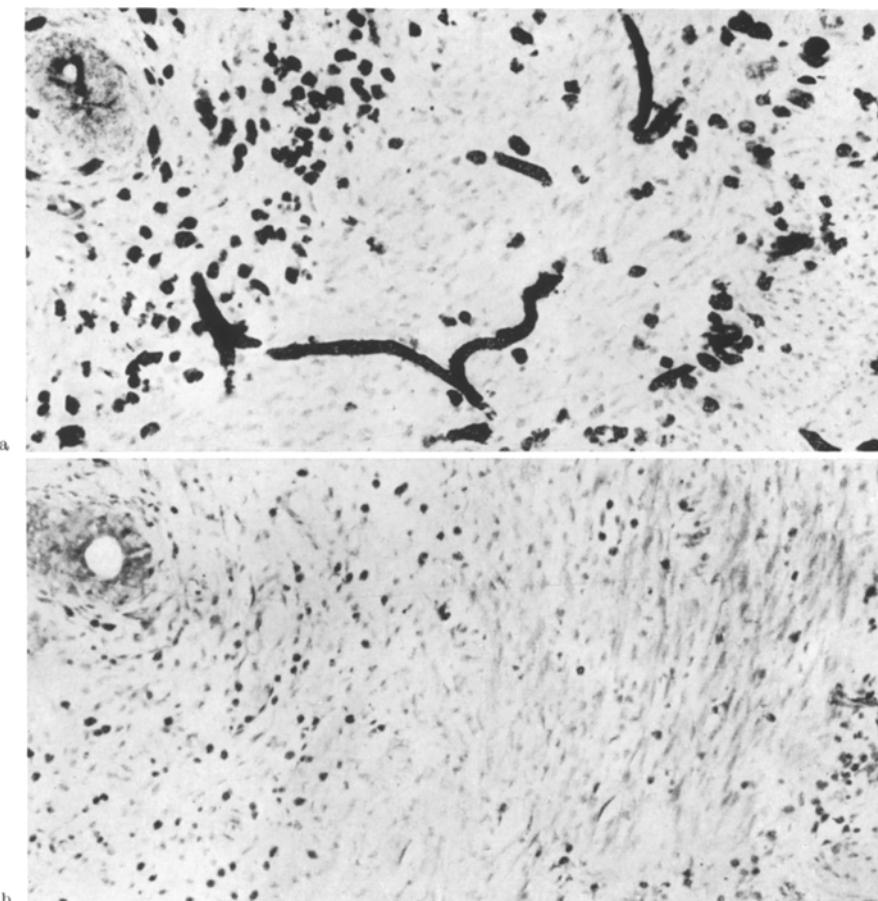


Abb. 1a u. b. Uterus der Ratte. a Nachweis der alkalischen Phosphatase: Die Gewebseosinophilen zeigen eine starke Enzymaktivität. Deutlicher Reaktionsausfall in den Capillaren und im Drüsenepithel. Fehlende Aktivität im Myometrium und in den Stromazellen. b Darstellung der Eosinophilen im Uterusstroma mit Biebricher Scharlach

Zahl der Gewebseosinophilen war jedoch im allgemeinen etwas geringer als in entsprechenden Vergleichspräparaten des Rattenuterus; sie war im untersten Uterussegment größer als in den Uterushörnern. Die Gewebseosinophilen im Uterusstroma der Maus besitzen einen chromatindichten, teils ringförmigen, teils mehr stabförmig erscheinenden bzw. segmentierten Zellkern. Die mehr locker liegenden und zarteren eosinophilen Granula kommen bei der Färbung mit Orcein

bzw. Biebricher Scharlach schwächer zur Darstellung (Abb. 2b) als bei der Ratte.

Neben den eosinophilen Leukocyten fanden sich — ebenso wie bei der Ratte — ringkernige oder stärker segmentierte Zellen ohne eosinophile Granulation. Diese Zellen waren besonders während des Metoestrus sowie nach der Kastration im subepithelialen Stroma bzw. in den Drüseneckungen anzutreffen.

a) *Alkalische Phosphatase*. Im Gegensatz zur Ratte besaßen die Gewebseosinophilen im Uterus der Maus — ebenso wie die eosinophilen und neutrophilen

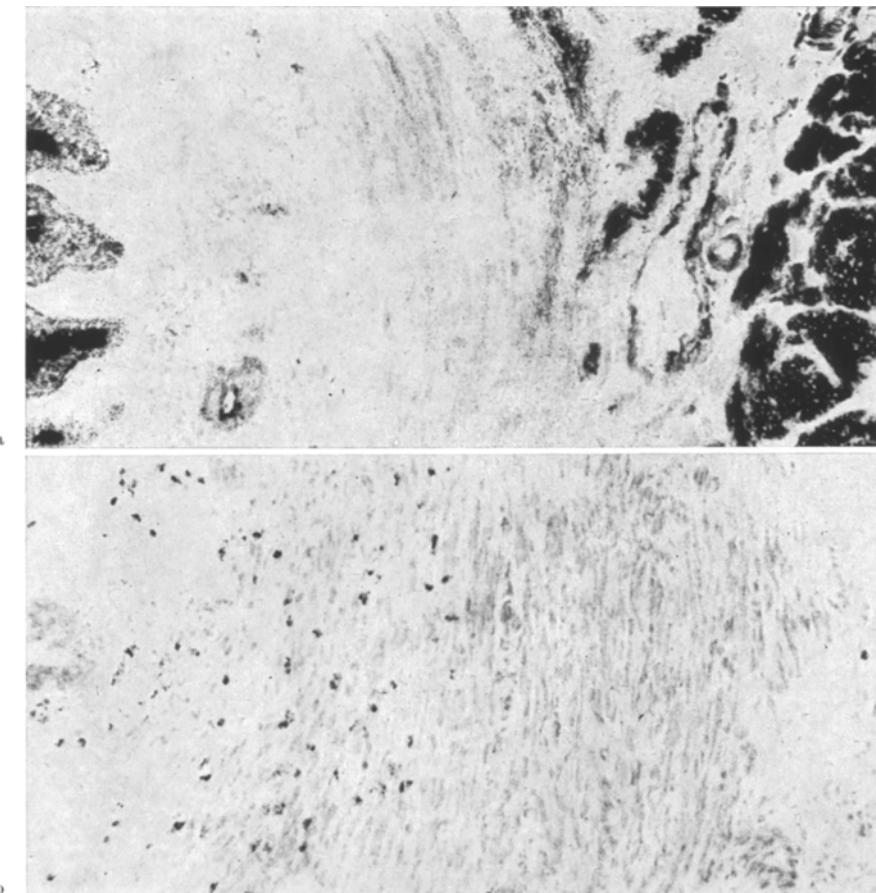


Abb. 2a u. b. Uterus der Maus. a Nachweis der alkalischen Phosphatase: Die Gewebseosinophilen bleiben ungefärbt. Starke Reaktionsausfall im Myometrium (besonders in der äußeren Längsschicht), in Blutcapillaren sowie im Drüsenepithel. b Spezifische Anfärbung der Uteruseosinophilen mit Biebricher Scharlach

Granulocyten im Blut und Knochenmark — in allen untersuchten Cyclusphasen keine histochemisch nachweisbare Aktivität der alkalischen Phosphatase (Abb. 2a). Stark positiv reagierten dagegen neben den Capillaren besonders die Zellen der äußeren Muskelschicht, schwächer die der inneren Ringmuskulatur. Das Drüsenepithel zeigte eine cyclusabhängige schwache bis stark positive Enzymaktivität.

Nach der *Kastration* kam es zu einem weitgehenden Verlust der alkalischen Phosphatase im Epithel des Endometriums, während die deutliche Reaktion in der Längsmuskelschicht praktisch unbeeinflußt blieb.

b) *Saure Phosphatase*. Die Gewebseosinophilen wiesen keine cytochemisch erfaßbare Aktivität dieses Enzyms auf. Eine stärkere Anfärbung zeigten im Uterus der Maus lediglich die Drüsenepithelien sowie einzelne histiocytäre Zellelemente im Bindegewebsstroma, besonders zwischen den beiden Muskelschichten.

c)  $\alpha$ -*Naphthyl- und Naphthol AS-Acetat-Esterase*. In den eosinophilen Leukozyten des Uterusstromas war nur eine geringe Esteraseaktivität bei Verwendung der beiden Substrate nachweisbar. Stärker positiv reagierten nur die Drüsenepithelien sowie einzelne Histiocytzen.

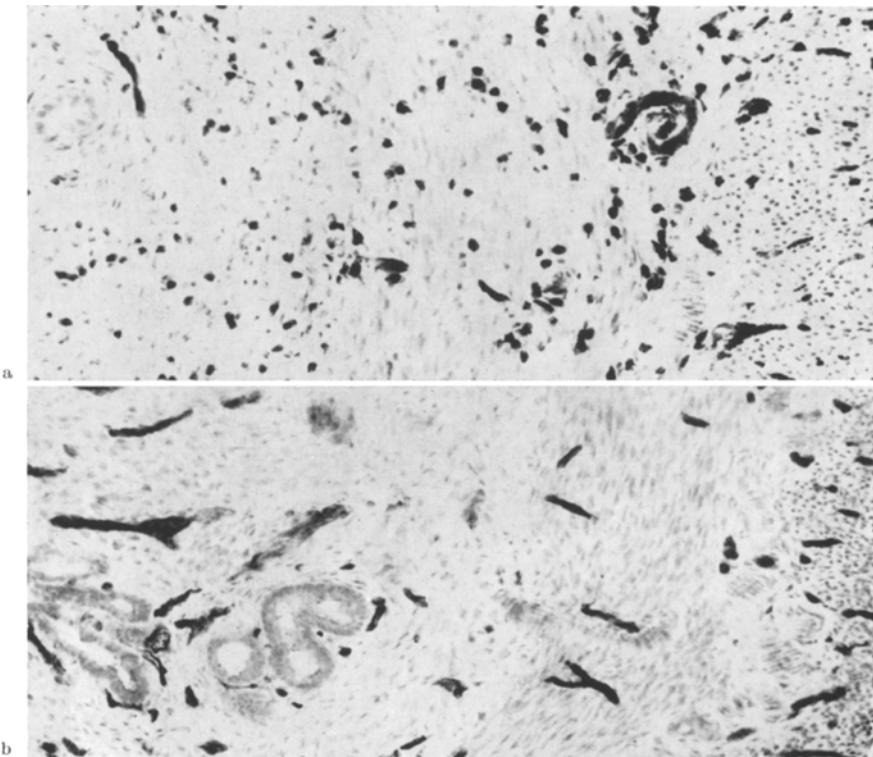


Abb. 3a u. b. Nachweis der alkalischen Phosphatase im Rattenuterus vor und nach Kastration, a Bei der Ovariextomie entferntes Uterushorn mit zahlreichen alkalische Phosphatase-positiven Eosinophilen. b Verbliebenes Uterushorn, 8 Tage nach der Kastration mit nur noch vereinzelten fermentpositiven Eosinophilen. Die Capillaren zeigen nach wie vor eine starke Aktivität

d) *Naphthol ASD-Chloroacetat-Esterase*. Dieses Enzym war weder in den eosinophilen Zellen des Uterusstromas noch in den entsprechenden Zellen der Blut- und Knochenmarksausstriche feststellbar, während die Mastzellen bei dieser Reaktion kräftig angefärbt wurden.

Eine insgesamt schwache Aktivität der Naphthol ASD-Chloroacetat-Esterase wiesen die oben beschriebenen nicht eosinophil granulierten leukozytären Zellen auf.

e) *Cytochromoxydase/Myeloperoxydase*. Die Ergebnisse des unter den verschiedenen modifizierten Versuchsbedingungen durchgeföhrten Oxydasenachweises nach BURSTONE stimmen völlig mit den Befunden am Uterus der Ratte überein (Abb. 4a—d).

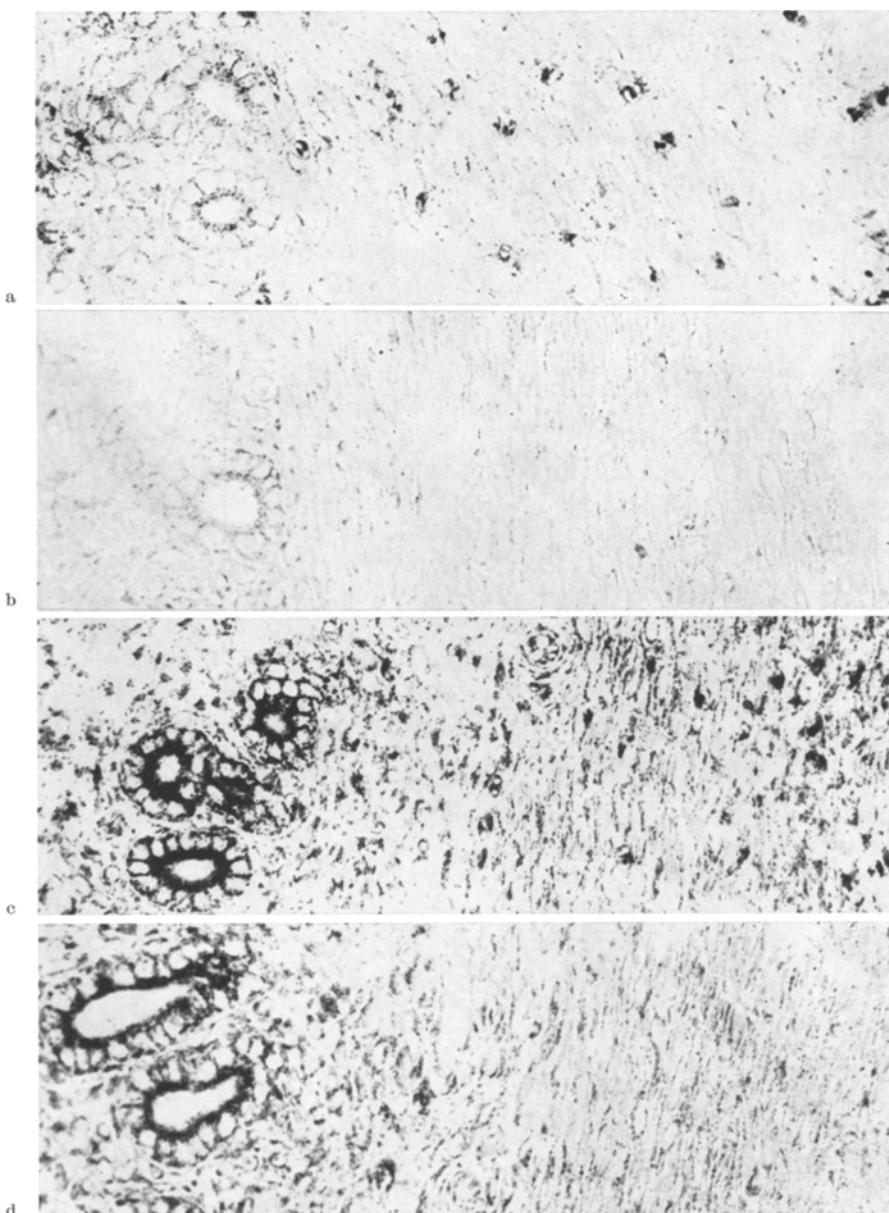


Abb. 4a—d. Differenzierte Darstellung der Myeloperoxydase und Cytochromoxydase am Uterus der Maus (Erläuterung s. Text). a Inkubationsmedium (nach BURSTONE) ohne Zusatz: Starke Aktivität in den Eosinophilen. Schwache Reaktion in den ortständigen Bindegewebs- und glatten Muskelzellen. b Zugabe von Katalase zum Reaktionsgemisch: Fehlende Reaktion in den Gewebseosinophilen bei unveränderter Aktivität in den übrigen Zellen. c Zusatz von Cytochrom c: Gleichbleibend starke Aktivität in den Eosinophilen wie bei a. Deutliche Verstärkung des Reaktionsausfalls in den glatten Muskelzellen sowie Stroma- und Epithelzellen. d Zugabe von Katalase + Cytochrom c: Die Gewebseosinophilen sind nur noch schwach positiv im Gegensatz zur starken Aktivität der übrigen Zellen

### Diskussion

Unsere vergleichenden enzymhistochemischen Untersuchungen haben gezeigt, daß sich bei der Ratte und Maus die Gewebseosinophilen im Uterusstroma vor

allem durch den Reaktionsausfall beim Nachweis der *alkalischen Phosphatase* unterscheiden: Während nämlich die Uteruseosinophilen bei der Ratte eine starke alkalische Phosphataseaktivität besitzen, ist dieses Enzym in den entsprechenden Zellen bei der Maus histochemisch nicht nachweisbar (vgl. Tabelle 1). Es besteht hier eine völlige Übereinstimmung mit den Befunden sowohl an den Gewebeeosinophilen im subcutanen Bindegewebe (SCHAEFER u. FISCHER) als auch an den eosinophilen Granulocyten im Blut und Knochenmark, wo diese speciesbedingten Unterschiede bei der alkalischen Phosphatasereaktion ebenfalls bekannt sind. Auch die Aktivität und Lokalisation der übrigen untersuchten Enzyme in den Uteruseosinophilen stimmten weitgehend mit dem Reaktionsausfall in den Gewebeeosinophilen der Subcutis und in den Bluteosinophilen der jeweiligen Tierart überein.

Tabelle 1. *Die Aktivität der alkalischen Phosphatase in Blut- und Gewebeeosinophilen im Vergleich zu Stroma- und glatten Muskelzellen im Uterus bei Ratte und Maus*

	Ratte	Maus
Bluteosinophile	+++	0
Gewebeeosinophile	+++	0
Glatte Muskelzellen		
äußere Längsschicht	(+)	+++
innere Ringschicht	0	+/-++
Stromazellen	0	0

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

Maus — im Gegensatz zu den Gewebeeosinophilen — eine, auch von anderen Autoren (ATKINSON u. ELFTMAN) festgestellte, starke Aktivität der alkalischen Phosphatase (Abb. 2a). Ein entgegengesetztes Verhalten findet sich im Rattenuterus: Hier besitzen die Eosinophilen eine starke alkalische Phosphataseaktivität, während dieses Enzym im Myometrium nicht oder in nur sehr geringer Aktivität nachweisbar ist (Abb. 1a).

Eine weitere Unterscheidung zwischen Gewebeeosinophilen und ortsständigen Zellen des Uterus war durch die *differenzierte Darstellung von Peroxydase und Cytochromoxydase* möglich (vgl. Tabelle 2): Durch geeignete Kontrollreaktionen (SCHAEFER u. FISCHER) ließ sich die bei Verwendung der von BURSTONE angegebenen Reagentien nachweisbare starke Aktivität in den Gewebeeosinophilen als eine Peroxydase identifizieren, die von der in den übrigen Zellen, insbesondere des Bindegewebstromas bzw. der glatten Muskulatur, vorkommenden Cytochromoxydase abzugrenzen war (Abb. 4). Die in den Gewebeeosinophilen des Uterus nachgewiesene Peroxydase, die völlig mit dem Reaktionsausfall in den entsprechenden Zellen des subcutanen Bindegewebes übereinstimmt (SCHAEFER u. FISCHER), entspricht cytochemisch der in den eosinophilen und neutrophilen Blut- und Knochenmarkszellen vorkommenden „Myeloperoxydase“ (AGNER).

Schließlich ist auf die übereinstimmende Anfärbbarkeit der Granula in den Eosinophilen des Gewebes und Blutes mit Orcein bzw. Biebricher Scharlach hinzuweisen. Auch elektronenmikroskopisch zeigen die Gewebeeosinophilen des Rattenuterus (GANSLER 1956) — ebenso wie die des subcutanen Bindegewebes (GUSEK) — die für die Bluteosinophilen typische Kristallloidstruktur der spezifischen Granula.

Vergleicht man dagegen das histochemisch erfaßbare Enzymmuster der Gewebeeosinophilen im Uterus der beiden untersuchten Tier-species mit der Fermentausstattung in den Zellen des ortsständigen Bindegewebes oder der glatten Muskulatur, so lassen sich hier deutliche *Unterschiede* feststellen (vgl. Tabelle 1): So zeigt besonders die äußere Muskelschicht im Uterus der

Tabelle 2. Differenzierte Darstellung der Myeloperoxydase und Cytochromoxydase in Blut- und Gewebseosinophilen im Vergleich zu glatten Muskelzellen, Stroma- und Epithelzellen im Uterus bei Ratte und Maus

	Inkubationsmedium: p-Aminodiphenylamin + 8-Amino-1,2,3,4-tetrahydrochinolin (pH 7,4) (BURSTONE)						
	fixiert		unfixiert				
	ohne Zusatz	ohne Zusatz	+ Katalase	+ Meerrettichperoxydase	+ Cytochrome c	+ Cytochrome c + Katalase	+ Cytochrome c + Meerrettichperoxydase
Bluteosinophile	+++	+++	0	0	+++	(+)	(+)
Gewebseosinophile	+++	+++	0	0	+++	(+)	(+)
Glatte Muskelzellen	0	(+)	(+)	(+)	++	++	++
Stromazellen	0	(+)	(+)	(+)	++	++	++
Drüsenepithele	0	+	+	+	+++	+++	+++

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

Sogenannte *Übergangsformen*, d.h. ortsständige Zellen, die aufgrund ihrer Enzymausstattung in einer Entwicklungsreihe zwischen den cytochemisch deutlich unterscheidbaren Gewebseosinophilen und Bindegewebs- bzw. glatten Muskelzellen eingeordnet werden könnten, waren bei unseren Untersuchungen, auch während der verschiedenen Cyclusphasen, nicht nachweisbar. Bei der Annahme einer ortsständigen Entstehung der eosinophilen Leukocyten im Uterus aus Fibroblasten (GANSLER, 1954) bzw. Zellen des RES (JÖCHLE) oder — wie GANSLER (1956) aufgrund neuerer elektronenmikroskopischer Untersuchungen vermutet — aus glatten Muskelzellen wären solche Zwischenstadien etwa bei der alkalischen Phosphatasereaktion jedoch zu erwarten gewesen. Ganz im Gegensatz hierzu aber standen bei der Ratte den fermentreichen Gewebseosinophilen fermentarme oder negative glatte Muskelzellen gegenüber, umgekehrt bei der Maus völlig fermentnegative Gewebseosinophile einer ausgesprochen fermentreichen Muskulatur (vgl. Tabelle 1). Ähnlich ergaben sich bei der differenzierten Darstellung der mitochondrial gebundenen Cytochromoxydase und der in den eosinophilen Granula lokalisierten Myeloperoxydase keinerlei Anhaltspunkte für die von GANSLER (1956) angenommene Transformation der Mitochondrien glatter Muskelzellen in die spezifischen Granula der Gewebseosinophilen. Auch neuere elektronenmikroskopische Untersuchungen von BARGMANN und KNOOP lassen eine solche Umwandlung unwahrscheinlich erscheinen.

Es fehlen auch im Uterus sowohl morphologisch (SCHULZ) als auch enzymhistochemisch alle Reifungsstufen, wie sie bei der normalen Eosinopoiese im Knochenmark anzutreffen sind. Tritt doch z.B. bei der Ratte bereits in den zum Teil nichtringkernigen Promyelocyten und Myelocyten eine alkalische Phosphataseaktivität auf. Auch die „Myeloperoxydase“ ist bekanntlich schon in den frühen Reifungsstufen der eosinophilen Entwicklungsreihe im Knochenmark der Ratte und Maus nachweisbar, während bei unseren Untersuchungen am Uterus keine solchen Übergangsformen zwischen ortsständigen Zellen und Gewebseosinophilen mit einer Myeloperoxydaseaktivität gefunden wurden.

Von den Gewebseosinophilen im Uterus der beiden untersuchten Tierspecies ließen sich ferner aufgrund ihrer Enzymausstattung *nicht eosinophil* granulierte Leukocyten abgrenzen, die besonders im Metoestrus und Dioestrus oder nach der Kastration nicht nur in das Vaginallumen eindringen, sondern auch subepithelial im Uterusstroma angetroffen werden und von hier aus die Mucosa durchwandern. JÖCHLE leitet diese Zellen von den Gewebseosinophilen ab, die, je näher sie der endometrialen Schleimhaut zu liegen kommen, eine zunehmende Segmentierung des Kernes sowie einen Verlust der eosinophilen Granula zeigen sollen. Bei den vorliegenden Untersuchungen konnten diese eosinophil granulierten Zellen jedoch eindeutig als *neutrophile Leukocyten* identifiziert werden, da sie eine Aktivität der Naphthol ASD-Chloroacetat-Esterase besitzen. Dieses Enzym ist nicht nur für die neutrophilen Granulocyten des Menschen typisch, sondern läßt sich auch in den entsprechenden Zellen der Ratte und Maus nachweisen, während es jedoch sowohl in den eosinophilen Blut- und Knochenmarkszellen (MOLONEY u. Mitarb.) als auch in den Gewebseosinophilen von Häutchenpräparaten des subcutanen Bindegewebes (SCHAEFER u. FISCHER) fehlt. In keinem Fall wurde bei unseren Untersuchungen ein Durchwandern von Eosinophilen durch das Epithel von Uterus oder Vagina beobachtet.

Die Ergebnisse unserer vergleichenden enzymhistochemischen Untersuchungen, die die Grundlage für weitere Experimente darstellen, und bei denen gezeigt werden konnte, daß nicht nur das Enzymmuster der Gewebseosinophilen im Uterus von Ratte und Maus völlig mit der Fermentausstattung in den eosinophilen Blutzellen der jeweiligen Tierart übereinstimmt, sondern daß auch sog. Übergangsformen zwischen den enzymhistochemisch deutlich differierenden ortsständigen Zellen und den Uteruseosinophilen fehlen, lassen eine hämatogene Herkunft der eosinophilen Leukocyten im Uterusstroma vermuten. Die vorliegenden Experimente haben weiterhin die Frage aufgeworfen, ob sich die verschiedenen färberischen und enzymhistochemischen Eigenschaften der Gewebseosinophilen bei der Alterung gleichzeitig oder in einer bestimmten Reihenfolge verändern. Wir haben bei unseren zunächst nur orientierenden Untersuchungen an den Uteri kastrierter Tiere den Eindruck gewonnen, daß die Peroxydasereaktion am längsten erhalten bleibt. Die Klärung dieser Frage wäre besonders auch im Hinblick auf die in letzter Zeit lebhaft diskutierte funktionelle Bedeutung der Eosinophilen (VAUGHN; GROSS; ARCHER) und ihr endgültiges Schicksal im Gewebe von Interesse.

#### Zusammenfassung

Vergleichende enzymhistochemische Untersuchungen haben gezeigt, daß die Gewebseosinophilen im Uterus von Ratte und Maus in ihrem Enzymmuster völlig mit der Fermentausstattung in den eosinophilen Blutzellen der jeweiligen Tierart übereinstimmen, und zwar auch insofern, als sie die bekannten speciesbedingten Unterschiede hinsichtlich der alkalischen Phosphatase der Blutleukocyten aufweisen: Während die Eosinophilen im Uterusstroma bei der Ratte eine starke Aktivität der alkalischen Phosphatase besitzen, fehlt dieses Enzym in den entsprechenden Zellen der Maus. Die in den Uteruseosinophilen nachgewiesene Myeloperoxydaseaktivität ließ sich eindeutig von der in allen Zellen vorkommenden Cytochromoxydase abgrenzen. Sogenannte Übergangsformen zwischen den enzymhistochemisch deutlich differierenden ortsständigen Bindegewebs- und

glatten Muskelzellen und den Gewebseosinophilen wurden nicht beobachtet. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen sprechen für eine hämatogene Herkunft der sog. Gewebseosinophilen im Uterus der Nager.

### A Comparative Study of the Tissue Eosinophiles in the Uterus of the Rat and Mouse Summary

Comparative enzyme-histochemical studies were performed on the tissue eosinophiles of the uterus of the rat and mouse. Results disclosed, that the enzyme pattern of these eosinophiles is identical to that of the blood eosinophiles of the respective animal, especially in regard to the known species-specific differences of the leukocyte alkaline phosphatase: The eosinophiles in the uterine stroma of the rat showed a strong alkaline phosphatase activity, whereas this enzyme was absent in the corresponding cells of the mouse. The myeloperoxidase activity of the uterine eosinophiles could be sharply distinguished from the cytochrome oxidase activity present in all cells. No so-called transition forms could be observed between the connective tissue cells or smooth muscle cells of the uterus and the enzyme-histochemically very different tissue eosinophiles. The present results indicate the tissue eosinophiles in the uterus of the rodent originate hematogenously.

### Literatur

- AGNER, K.: Verdoperoxydase. A ferment isolated from leucocytes. *Acta physiol. scand.* **2**, Suppl. 8, 1—62 (1941).
- ALLEN, E.: The oestrus cycle in the mouse. *Amer. J. Anat.* **30**, 297—372 (1922).
- ALLEN, W. M.: Cyclical alterations of the endometrium of the rat during the normal cycle, pseudopregnancy, and pregnancy. *Anat. Rec.* **48**, 65—104 (1931).
- ARCHER, R. K.: On the function of eosinophils in the antigen-antibody reaction. *Brit. J. Haemat.* **11**, 123—129 (1965).
- ATKINSON, W. B., and H. ELFMAN: Effect of steroid sex hormones on distribution of alkaline phosphatase in uterus of mouse. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **62**, 148—150 (1946).
- BARGMANN, W., u. A. KNOOP: Über das Granulum des Eosinophilen. *Z. Zellforsch.* **48**, 130—136 (1958).
- BEAVER, D. L., and E. S. DUMMIT: "Leukocyte emigrating factor" of mouse uterus. *Arch. Path.* **75**, 543—544 (1963).
- BENOIT, W.: Die Rolle des Follikelhormons bei der Neuroleukocytose. *Med. Ges. Frankfurt/M.*, Sitzg vom 4. 2. 1959. Ref. *Klin. Wschr.* **37**, 782 (1959).
- BJERSING, L., and N. E. BORG LIN: Effect of hormones on incidence of uterine eosinophilia in rats. *Acta path. microbiol. scand.* **60**, 27—35 (1964).
- BURSTONE, M. S.: Modifications of histochemical techniques for the demonstration of cytochrome oxydase. *J. Histochem. Cytochem.* **9**, 59—65 (1961).
- GANDER, G.: Die Histogenese des Uteruswachstums von Ratte und Maus unter der Wirkung von Ovarial- und Hypophysenvorderlappenhormon im Vergleich mit derjenigen während der Schwangerschaft. *Z. ges. exp. Med.* **72**, 44—64 (1930).
- GANSLER, H.: Über ringkernige Gewebsleukocyten 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).
- GOLDSTEIN, D. J.: Selective staining of eosinophil granules in sections by alkaline orcein in a concentrated urea solution. *Stain Technol.* **38**, 49—51 (1963).
- GROSS, R.: Die eosinophilen Leukocyten. In: *Physiologie und Physiopathologie der weißen Blutzellen*, hrsg. v. H. BRAUNSTEINER. Stuttgart: Georg Thieme 1959.
- GUSEK, W.: Submikroskopische Untersuchungen zur Feinstruktur aktiver Bindegewebszellen. Veröffentl. morph. Path. H. 64, Stuttgart 1962.

- HOMMA, E.: Pathologische und biologische Untersuchungen über die Eosinophilenzellen und die Eosinophilie. Virchows Arch. path. Anat. **233**, 11—51 (1921).
- JÖCHLE, W.: Umwelteinflüsse auf neuroendokrine Regulationen: Wirkungen langfristiger, permanenter Beleuchtung auf jugendliche und erwachsene Ratten. Zbl. Vet.-Med., Reihe A, **10**, 653—706 (1963).
- LONG, J. A., and H. M. EVANS: The oestrus cycle in the rat and its associated phenomena. Mem. Univ. California **6**, 1—148 (1922).
- MOLONEY, W. C., 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).
- RYTÖMÄA, T.: Organ distribution and histochemical properties of eosinophil granulocytes in rat. Acta path. microbiol. scand. **50**, Suppl. 140, 1—118 (1960).
- SCHAEFER, H. E., u. R. FISCHER: Enzymhistochemische Untersuchungen an den Gewebeleukocyten im Vergleich zu Blut- und Bindegewebszellen bei Maus und Ratte. Virchows Arch. path. Anat. **338**, 130—142 (1964).
- SCHULZ, L.-CL.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur extramedullären Genese eosinphiler Leukocyten im Endometrium des Rindes und der Maus. Verh. dtsch. Ges. Path. **44**, 331—334 (1960).
- SPICER, S. S., and R. D. LILLIE: Histochemical identification of basic proteins with Biebrich scarlet at alkaline pH. Stain Technol. **36**, 365—370 (1961).
- VAUGHN, J.: The function of the eosinophile leucocyte. Blood **8**, 1—15 (1953).

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