

Zur submikroskopischen Struktur der Makrophagen im Terpentinölgranulom der Ratte

U. FUCHS

Pathologisches Institut der Karl-Marx-Universität Leipzig
(Direktor: Prof. Dr. med. habil. G. HOLLE)

Eingegangen am 20. Dezember 1965

Die submikroskopische Makrophagenforschung steht vor einer Reihe von Problemen, die sich auf die Entstehung, die Bedeutung und das Schicksal der in ihnen beobachteten Einschlüsse beziehen. Hinsichtlich ihrer Zahl und Gestalt ergibt sich die Frage, ob es zwischen den aus verschiedenen Ursachen entstehenden phagocytierenden Zellen neben gemeinsamen Merkmalen unterschiedliche Struktureigentümlichkeiten gibt. Es ist anzunehmen, daß nicht nur aufgenommene erhaltene oder geschädigte Zellen und ihre Trümmer, sondern auch die ursächlichen Agentien und ihre Stoffwechselprodukte die feinere Morphologie der parenteralen Verdauung bestimmen. Auch beeinflussen sie die Stärke der Zellschädigung. Als Baustein für eine spätere vergleichende Betrachtung der Makrophagen sollen deshalb elektronenmikroskopische Befunde mitgeteilt werden, die an dem intramuskulären Terpentinölgranulom der Ratte erhoben wurden. Lichtmikroskopische, beim Kaninchen gewonnene Ergebnisse hat BARDENHEUER unter Beifügung von Zeichnungen seines Lehrers MARCHAND bereits 1891 dargestellt.

Material und Methode

Aus dem nach intramuskulärer Injektion von Oleum terebinthinae entstehenden Granulationsgewebssauum wurde Gewebe für die elektronenmikroskopische Untersuchung entnommen und nach den üblichen Methoden präpariert. Weitere Einzelheiten der Versuchsdurchführung sind früher beschrieben worden. Ferner wurden lichtmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Zur besseren Wiedergabe großer Kontrastdifferenzen wurde das Negativ zum Teil durch Neucoccin abgedeckt.

Befunde

Lichtmikroskopisch zeigen die Makrophagen zahlreiche Einschlüsse unterschiedlicher Größe, Gestalt und Anfärbbarkeit. Dabei handelt es sich zum Teil um *Lysosomen*, die saure Phosphatasen enthalten. Andere Einschlüsse erweisen sich als *Phagosomen* mit Muskelzellfragmenten, Erythrocyten, Leukocyten und anderen Bestandteilen des Granulationsgewebes in verschiedenen Stadien des Gewebsabbaues. *Cytolysosome* bzw. *Cytosegresome*, d. h. umschriebene und abgegrenzte, z. T. nekrotische Areale des Makrophagencytoplasmas können allerdings nicht immer zuverlässig von phagocytiertem Material unterschieden werden. Feine *kristalline Einschlüsse* werden neben Vacuolen und noch schattenhaft erkennbaren präexistenten Strukturen in den stark osmophilien und verdichteten einverleibten Zellresten und in Mitochondrien der Makrophagen beobachtet. Häufig treten osmophile homogene *Fetteinschlüsse* auf, die zumeist eine randliche Membran erkennen lassen. Sog. neutrale Lipide lassen sich lichtoptisch mit der Nilblaufärbung nach CAIN nachweisen. Daß auch ungesättigte Neutralfette auf-

treten, ist aus der PAS-Reaktion im Zusammenhang mit den verschiedenen Blockierungsverfahren zu schließen. Andersartige Einschlüsse sind aus einer Vielzahl von schmalen osmiophilen Lamellen mit osmiphoben interlamellären Zwischenräumen (Abb. 1) zusammengesetzt. Diese Membranen laufen zumeist in sich selbst zurück, können jedoch auch selten Anfang und Ende erkennen lassen. Oft umschließen sie zentrale Hohlräume, die ebenso wie die ganze *lamelläre Struktur* recht polymorph gestaltet sind. Ferner können zentral kleine Tubuli liegen. Derartige Einschlüsse finden sich in den einzelnen Zellen unterschiedlich oft; in einigen Zellen sind sie besonders häufig. Außerdem treten *größere Einschlüsse* auf (Abb. 2). Auch ihnen fehlt eine besondere Grenzmembran

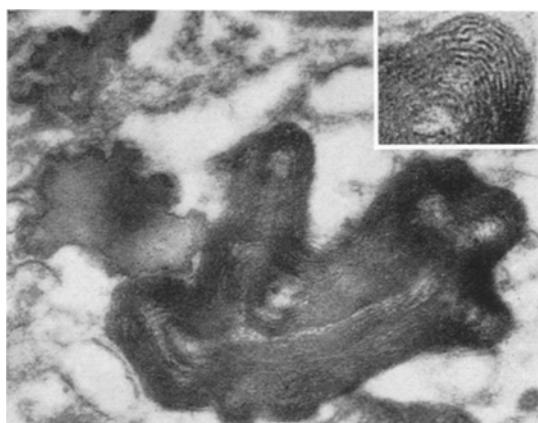


Abb. 1. Multilamellärer Zelleinschluß. 9. Versuchstag. Aufn.-Nr. 986/63. Vergr. 44800 bzw. 102400mal

zum Cytoplasma. Breite elektronenoptisch leere Spalten liegen zwischen den locker geschichteten und selten paarweise gelagerten Membranen. Diese sind im Schnitt, auch bei Präparatkippung, häufig dicker als die Membranen der vorher beschriebenen multilamellären Zelleinschlüsse. Derartige Differenzen können im gleichen Gebilde beobachtet werden. Daß Pyridinextraktion die mit dem sauren Haemateintest nach BAKER erzielte Anfärbung der Esterphosphatide aufhebt, entspricht den Erwartungen.

Von den übrigen Zellstrukturen ist das herdförmige Auftreten isolierter, zumeist jedoch in Bündel angeordneter *Fibrillen* zu erwähnen. Selten werden sog. napfförmige Mitochondrien angetroffen. Vorzugsweise jene Zellen, deren Cytoplasma zahlreiche Einschlüsse aufweist, lassen geschädigte *Zellorganellen* erkennen. Durch Ausstoßung oder nach Zellauflösung verlassen Einschlüsse das Cytoplasma, jedoch können sie zweifellos erneut phagocytiert werden.

Diskussion

Viele der beobachteten Einschlüsse im Makrophagencytoplasma sind auf Grund der bereits bekannten elektronenmikroskopischen Untersuchungen deutbar. So sind bestimmte Einschlüsse als Neutralfett aufzufassen, wie es in Fibroblastenkulturen nach verzögerter Umsetzung als Ausdruck der Sauerstoffverarmung und der Ansäuerung des Milieus auftritt (SCHWARZ u. Mitarb., 1964). Ähnliche Stoffwechselsituationen liegen im Granulationsgewebe vor. Die kleinen

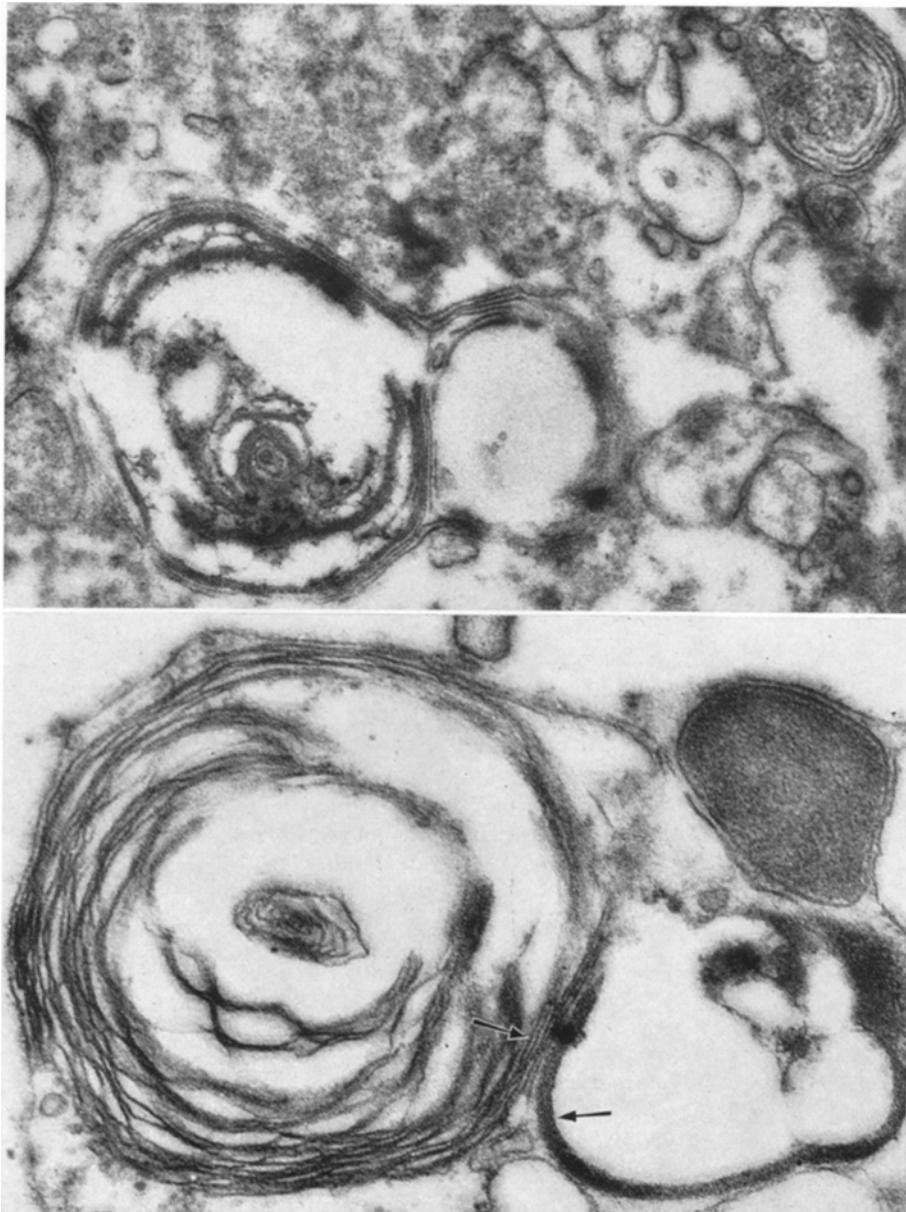


Abb. 2. Große lockere Zelleinschlüsse. An den durch Pfeile markierten Abschnitten verhält sich die Länge der periodischen Einheiten wie 1:2. Vereinzelt sind die Membranen paarig angeordnet. Das kleine, aus Membranen und Tubuli bestehende Gebilde am rechten oberen Bildrand leitet sich möglicherweise von einem Mitochondrium her. 14. bzw. 7. Versuchstag. Aufn. Nr. 1842/64 und 2088/63. Vergr. 42600 bzw. 58880mal

kristallinen Gebilde bestehen aus Kalksalzen. Elektronenmikroskopisch sind sie dem Hydroxyapatit sehr ähnlich.

Die lamellären Einschlüsse sind als flüssige Kristalle bzw. Parakristalle (STOECKENIUS u. Mitarb., 1960; STOECKENIUS, 1962; MERCER, 1961) komplexer

Lipoide aufzufassen, die auf Grund ihrer polaren Gruppen über die Fähigkeit verfügen, sich in Schichten anzuordnen.

Hinsichtlich der wichtigen Frage, ob ihre verschiedenartige Struktur auf chemisch oder physikalisch andersartige Beschaffenheit hinweist, sind die Myelinfiguren zu erörtern, die C. RUSKA (1963) nach der Einwirkung von Äthanol oder Äther in Epithelzellen der Darmwand beobachtet hat. Die Lamellenkörper lassen nämlich Ähnlichkeiten zu dem vielschichtigen kompakten „Alkoholmyelin“ erkennen, das in Anbetracht der differenten Löslichkeit der einzelnen Lipoide vorwiegend aus Leцитinen und Kephalinen bestehen dürfte. Einige größere Einschlüsse unserer Mitteilung zeigen dem lockeren „Acetonmyelin“ vergleichbare Züge, das wahrscheinlich von Cerebrosiden gebildet wird. Diese Struktur ist in beiden Untersuchungsreihen größer und seltener als die multilamelläre Form. Auch ist die kleinste periodische Einheit dieser Myelinkörper zumeist größer als bei der kompakten Form, wie auch C. RUSKA (1963) feststellt. Diese Länge wird vom Bestrahlungswinkel (C. RUSKA, 1963) und durch Verschmelzung vorher getrennter Membranen (KARRER, 1960) beeinflußt, sie ist jedoch von der Güte der Fokussierung unabhängig (STOECKENIUS u. Mitarb., 1960; TRURNIT u. SCHIDLOVSKY, 1960). Diese verändert lediglich die relative Dicke der elektronenoptisch sichtbaren schwarzen und weißen Linien. Der Grad periodischer Membrananordnung wird ferner durch chemische Substitution verändert (TRURNIT u. SCHIDLOVSKY, 1960). Die gestaltlichen Unterschiede können also in bestimmten Fällen als Glieder differenter formaler Reihen aufgefaßt werden.

Demgegenüber führt MERCER (1961) offene Myelinfiguren auf Wassereinlagerungen zwischen die Schichten der Myelinkörper zurück. Die Dicke der Wasserschicht wird mit sinkender Lipoidkonzentration größer. In Versuchen von LUZZATI u. HUSSON (1962) war bei einer um 50% erniedrigten Konzentration eines Phospholipoid-Wassersystems die Wasserschicht $\sim 5-6$ mal dicker. In einer Auflockerung der Struktur sehen BLÜMCKE u. NIEDORF (1965) bei Untersuchungen der Nervenfaser den beginnenden Zerfall der Lamellenkörper. Auch wir nehmen an, daß die morphologischen Unterschiede bei den Gebilden mit dünnen, durch große Spalten getrennten Membranen im Ablauf eines Entwicklungseyclus aufgetreten sind.

Weitere Befunde an verschiedenartigen Modellen machen kleinere Strukturdifferenzen verständlich. REVEL u. WALLACH (1958) haben gezeigt, daß Phosphatidyläthanolamin in einer wäßrigen Phase lamelläre und tubuläre Membranlagerungen erzeugt. In der Entwicklungsphase vorhandenes Eiweiß führt zur Bildung konzentrischer Schalen und vieler kleiner Bläschen (MERCER, 1961) und zu größerer Membrandicke (STOECKENIUS, 1962).

Derartige Einschlüsse werden in verschiedenartigen Zellen beobachtet (CECIO, 1964; BLÜMCKE u. NIEDORF, 1965 u. a.). Einige osmiophile Zelleinschlüsse treten auch in den Makrophagen anderer Granulome auf, und zwar besonders in Versuchen mit Cholesterin, Olivenöl und Beryllium (GUSEK, 1965). Jedoch scheinen die vielgestaltigen lamellären Einschlüsse in dem hier erörterten Fall besonders häufig (GUSEK, 1965). Diese Tatsache ist im Terpentinölgranulom zum Teil mit den — in einigen Fällen stärkeren — Gewebsblutungen in Zusammenhang zu bringen, da auch bei dem intracellulären Erythrocytenabbau zahlreiche multilamelläre Körper beobachtet werden. Zweifellos können derartige Körper auch

aus den Lipoiden untergehender Zellen entstehen. Eine Beschreibung der großen lockeren Einschlüsse haben wir jedoch gleich FASSKE bislang in den Makrophagen bei diesem und anderen Modellen vermißt. Die im Meerschweinchen-Hoden beschriebene exzentrische Membranlagerung und die von ATHANASSIADES u. Mitarb. (1965) beobachteten filamentösen Strukturen haben wir nicht angetroffen.

Da bei der Heilung von Muskel- und Hautwunden (SCHOEFL, 1964; Ross u. BENDITT, 1961) nur wenige vergleichbare Zelleinschlüsse beobachtet werden, halten wir die toxischen Einflüsse des Terpentinöls auf das granulierende Gewebe für besonders wichtig. Wir führen also die morphologischen Besonderheiten der Phagocyten auf die durch das Terpentinöl verursachten ausgedehnten Gewebs- und Gefäßnekrosen mit den nachfolgenden Blutungen und die schädigende Einwirkung des entzündungsauslösenden Agens auf die entzündliche Reaktion zurück. Den Veränderungen kommt demnach kein spezifischer Charakter zu. Jedoch zeichnen sich auch andere Makrophagen durch bestimmte Charakteristika aus. So treten Mikrotubuli nur an Lysosomen und Phagosomen von Makrophagen bei der Rückbildung eines Ascitestumors der Maus auf (JOURNEY, 1964); sie weisen wahrscheinlich Beziehungen zur intracellulären Verdauung auf. Bestimmte Myelinkörper finden sich beim Markscheidenabbau und im Bereich von Hirnnekrosen. Die Cytomorphologie der Makrophagen kann also durch das ursächliche Agens (GUSEK, 1965) und durch gewebliche Faktoren mitbestimmt werden. Auch ihr Fermentgehalt wechselt. Andere lichtmikroskopisch identische Entzündungszellen lassen ebenfalls bei genauer Analyse histochemisch und submikroskopisch faßbare Abweichungen erkennen, wie anhand der Epitheloidzellen gezeigt worden ist.

Das endgültige Schicksal der Einschlüsse wird erst durch weitere Untersuchungen zu klären sein. CECIO (1964) sieht in Lamellenkörpern morphologisch faßbare Zwischenstadien des Stoffwechsels. NOVIKOFF (1963) rechnet die in Lysosomen verschiedener Standorte, darunter in Makrophagen der Lunge, beobachteten Membranen zu den sog. Restkörpern, die unlösliche Endprodukte des Stoffwechsels speichern, weil Lipasen in den Lysosomen nicht vorhanden sind. Derartige Restkörper entstehen in der Niere bereits innerhalb einiger Stunden.

Im übrigen zeigen die Makrophagen die von GIESEKING (1963) dargestellten Strukturen, die eine sichere submikroskopische Abgrenzung der Zellen gegenüber Fibroblasten und Fibrocyten zulassen. Die von DE PETRIS u. Mitarb. (1962) in Makrophagen von Meerschweinchen und Kaninchen beschriebenen Filamente haben wir auch bei der Ratte nachgewiesen.

Zusammenfassung

In Makrophagen des intramuskulären Terpentinölgranuloms der Ratte finden sich neben anderen Einschlüssen zahlreiche lamelläre Körper. Etwas seltener werden größere, locker geschichtete, aus Membranen aufgebaute Einschlüsse angetroffen. Die Strukturunterschiede zwischen beiden Formen werden auf chemische und physikalische Differenzen zurückgeführt. Daß hinsichtlich der Einschlüsse einige quantitative und qualitative Unterschiede zu anderen Entzündungsmodellen bestehen, wird auf die starke toxische Terpentinölschädigung des präexistenten und des neugebildeten Entzündungsgewebes bezogen.

The Submicroscopic Structure of the Macrophages in Turpentine-Oil Granulomas of the Rat

Summary

Electron microscopic studies of macrophages of the granuloma, produced in rats with an intramuscular injection of turpentine-oil, revealed many inclusions, among them many lamellar bodies. Larger, loosely layered membraneous bodies were rarer. The structural differences between these two forms reflect their dissimilar chemical or physical constituents. Because of the inclusions, some quantitative and qualitative differences exist compared with other models of inflammation. This fact is explained by the great toxicity of the turpentine-oil, which damages not only the preexisting structures but also the newly forming granulation tissue.

Literatur

- ATHANASSIADES, T. J., L. HERMAN, and G. R. HENNIGAR: Electron microscopy of particulate inclusions within human macrophages. *Amer. J. Path.* **46**, 29 a (1965).
- Electron microscopy of cytoplasmic inclusions within "macrophages" of human tissues. *Lab. Invest.* **14**, 409—423 (1965).
- BARDENHEUER, F.: Über die histologischen Vorgänge bei der durch Terpentin hervorgerufenen Entzündung im Unterhaut-Zellgewebe. *Beitr. path. Anat.* **10**, 394—432 (1891).
- BLÜMCKE, S., u. H. R. NIEDORF: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Lamellenkörpern im regenerierenden peripheren Nerven. *Beitr. path. Anat.* **131**, 38—62 (1965).
- CECIO, A.: Electron microscopic observations of young rat liver. I. Distribution and structure of the myelin figures (lamellar bodies). *Z. Zellforsch.* **62**, 717—742 (1964).
- FASSKE, E.: Persönliche Mitteilung 1965.
- FUCHS, U.: Die Ultrastruktur der Blutcapillaren bei einer chronischen Entzündung. *Frankfurt. Z. Path.* **74**, 544—554 (1965).
- GIESEKING, R.: Submikroskopische Strukturunterschiede zwischen Histiocyten und Fibroblasten. *Beitr. path. Anat.* **128**, 259—282 (1963).
- GUSEK, W.: Persönliche Mitteilung 1965.
- JOURNEY, L. J.: Cytoplasmic microtubules in mouse peritoneal macrophages during rejection of MC₁M ascites tumor cells. *Cancer Res.* **24**, 1391—1405 (1964).
- KARRER, H. E.: Electron microscopic study of the phagocytosis process in lung. *J. biophys. biochem. Cytol.* **7**, 357—366 (1960).
- LUZZATI, V., and F. HUSSON: The structure of the liquid-crystalline phases of liquid-water systems. *J. Cell Biol.* **12**, 207—219 (1962).
- MERCER, E. H.: Comparision of natural biological membranes with arteficial models. In: J. D. BOYD, F. R. JOHNSON and J. D. LEVER, *Electron microscopy in anatomy*, p. 100—113. London: Arnold 1961.
- NOVIKOFF, A. B.: Lysosomes in the physiology and pathology of cells: Contribution of staining methods. In: *Ciba Foundation Symposium Lysosomes*, ed. by A. V. S. DE REUCK and M. P. CAMERON, p. 36—73. London: Churchill 1963.
- PETRIS, S. DE, G. KARLSBAD, and B. PERNIS: Filamentous structures in the cytoplasm of normal mononuclear phagocytes. *J. Ultrastruct. Res.* **7**, 39—55 (1962).
- REVEL and WALLACH: Zit. bei D. W. FAWCETT, *The membranes of the cytoplasm*. *Lab. Invest.* **10**, 1162—1188 (1961).
- ROSS, R., and E. P. BENDITT: Wound healing and collagen formation. I. *J. biophys. biochem. Cytol.* **11**, 677—700 (1961).
- RUSKA, C.: Beobachtungen an experimentell im Zellinnern erzeugten Myelinfiguren. *Z. Zellforsch.* **59**, 134—141 (1963).
- SCHOEFL, G. I.: Persönliche Mitteilung 1964.

- SCHWARZ, W., H. J. MERKER u. A. KUTZSCHE: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an verfetteten Fibroblastenkulturen nach verzögerter Umsetzung. *Z. Zellforsch.* **64**, 804—812 (1964).
- STOECKENIUS, W., J. H. SCHULMAN, and L. M. PRINCE: The structure of myelin figures and microemulsion as observed with the electron microscope. *Kolloid-Z.* **169**, 170—180 (1960). — Some electronmicroscopical observations of liquid crystalline phases in liquid-water systems. *J. Cell Biol.* **12**, 221—229 (1962).
- TRURNIT, H. J., and G. SCHIDLOVSKY: Thin cross-sections of artificial stacks of mononuclear films. In: *Proceedings Europ. Reg. Conference Electron Microscopy*, ed. by A. L. HOUWINCK and B. S. SPIT, vol. II, p. 721—725. Delft 1960.

Doz. Dr. U. FUCHS
Pathologisches Institut der Karl-Marx-Universität
X 701 Leipzig, Liebigstr. 26