

## Riesenzellbildung bei Bleomycintherapie oraler Plattenepithelcarcinome Enzymhistochemische, elektronenmikroskopische und ultrahistochemische Untersuchungen

A. Burkhardt, G. Bommer, J.-O. Gebbers\* und W.-J. Höltje

Institut für Pathologie der Universität Hamburg (Direktor: Prof. Dr. G. Seifert),  
Chirurgische Abteilung (Nordwestdeutsche Kieferklinik) der Universitätsklinik für Zahn-,  
Mund- und Kieferkrankheiten der Universität Hamburg (Direktor: Prof. Dr. Dr. G. Pfeifer)

Eingegangen am 10. Oktober 1975

### Formation of Giant Cells in Oral Squamous Cell Carcinoma during Bleomycin Treatment

Enzymehistochemical, Electronmicroscopic and Ultrahistochemical Investigations

*Summary.* During treatment of keratinizing squamous cell carcinomas with bleomycin tumor cells are devitalized by keratinization, while simple necrosis plays a minor role. Connected with this process is a marked resorptive granulomatous inflammation with numerous macrophages which is followed by a fibrous organization. In the border region of the keratinized tumor areas many multinucleated giant cells appear. The nature of these giant cells was the subject of controversy.

Enzyme histochemical, electronmicroscopic, and ultrahistochemical investigations in three cases of advanced squamous cell carcinoma of the oral cavity prove that the giant cells which are formed during bleomycin treatment are not multinucleated tumor cells, but multinucleated macrophages.

The enzymatic pattern is similar to macrophages with a high content of acid phosphatase and aminopeptidase.

The ultrastructure of the giant cells is characterized by lysosomes with acid phosphatase activity, pinocytotic vesicles, and cytoplasmic projections on the cell surface with signs of macroendocytosis. The tumor cells show an epithelial differentiation with desmosomes, tonofibrils, and keratohyaline granula.

The giant cells are formed by fusion of mononucleated (monocytogenic) macrophages. The fusions seem to be related to the functional status of the cells. It is possible, that the macrophages and the giant cells have an additional immunologic function. This is suggested by the frequent association of giant cells with lymphocytes.

The importance of these facts for the evaluation of the action of bleomycin and the consequences for its therapeutic use are discussed. A combination with methods causing a dedifferentiation of the tumor or suppression of the immunologic defense seems to be problematic.

**Key words:** Oral carcinoma — Squamous cell carcinoma — Cytostatic therapy — Bleomycin — Macrophages — Giant cells.

*Zusammenfassung.* Bei Bleomycin-Therapie von verhornten Plattenepithelcarzinomen werden diese unter zunehmender Verhornung devitalisiert, während einfache Tumornekrosen eine geringere Rolle spielen. Dabei findet sich eine ausgedehnte resorpitive, granulomatöse Entzündung mit Makrophagen und schließlich eine bindegewebige Organisation. Im Randbereich der verhornten Tumorareale treten zahlreiche mehrkernige Riesenzellen auf. Die Natur dieser Riesenzellen war bisher umstritten.

\* Mit freundlicher Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Die enzymhistochemischen, elektronenmikroskopischen und ultrahistochemischen Untersuchungen an 3 Fällen mit fortgeschrittenen Carcinomen der Mundhöhle zeigen, daß die unter der Bleomycinbehandlung auftretenden Riesenzellen keine Tumorriesenzellen, sondern durch Verschmelzung von einkernigen (monocytogenen) Makrophagen entstehende mehrkernige Makrophagen sind. Dabei ergeben sich Hinweise für eine funktionelle Genese der Riesenzellen. Eine zusätzliche immunologische Funktion der Makrophagen und der Riesenzellen ist möglich und wird durch die häufige Assoziation von Riesenzellen mit Lymphozyten nahegelegt.

Die Bedeutung dieser Tatsache für eine Bewertung der Bleomycinwirkung und für den therapeutischen Einsatz des Bleomycins wird diskutiert.

### Einleitung

Bleomycin (BLM) ist ein antitumoral brauchbares Antibioticum, welches sich als besonders wirksam gegen Plattenepithelcarcinome erwiesen hat (Übersicht: Umezawa *et al.*, 1967; Umezawa, 1973, 1974). Die Wirkung nimmt mit dem Reifegrad zu (Fettig *et al.*, 1971). Sie wird durch eine Anreicherung von BLM in den Zellen dieser Tumoren erklärt (Suzuki *et al.*, 1974). BLM-inaktivierende Enzyme sind in Plattenepithelcarcinomen erniedrigt (Umezawa, 1974).

Burkhardt und Höltje (1975) untersuchten 7 Fälle mit fortgeschrittenen oralen Plattenepithelcarcinomen nach BLM-Perfusion autoptisch und biotisch, wobei in 5 Fällen lokal kein vitales Tumorgewebe mehr nachweisbar war. Sie zeigten anhand dieser Fälle, daß der BLM-Wirkung ein charakteristisches, histologisches Bild zugrundeliegt. Der Tumor wird über eine Verhornung devitalisiert, während einfache Tumornekrosen eine geringere Rolle spielen (vgl. auch Hornova und Bilder, 1974). Eine Wirkung des BLM auf die Maturation der Tumorzellen ist offensichtlich [Renault u. Mitarb. (1972) sprechen von „hypermaturation kératinienne“]. Im Sinne der klassischen allgemeinen Pathologie handelt es sich um eine durch das BLM induzierte *Prosoplasie* des Tumorgewebes, wobei die überschießende Differenzierung zu einer Devitalisierung führt (vgl. Schwalbe, 1911). Diese besondere Reaktionsform des Tumors ist bei Kombination der BLM-Therapie mit anderen Cytostatica oder einer Bestrahlung nur gering ausgeprägt oder fehlt (Hornova und Bilder, 1974). Hierbei tritt häufiger eine Entdifferenzierung des Tumors auf. Burkhardt und Höltje (1975) glauben, daß die spezifische Wirkung des BLM auf Plattenepithelcarcinome auch durch die nur diesem Tumor mögliche Keratinisierung erklärt wird. Dabei findet sich eine ausgedehnte, resorative, granulomatöse Entzündung und anschließend eine bindegewebige Organisation (Vernarbung) mit Reepithelialisierung des Tumorareals. Bei dieser Tumorresorption treten zahlreiche, mehrkernige Riesenzellen vorwiegend im Randbereich der verhornten Areale auf (Renault *et al.*, 1972; Hornova und Bilder, 1974; Burkhardt und Höltje, 1975).

Im Folgenden wird über die histologischen, enzymhistochemischen, elektronenoptischen und ultrahistochemischen Untersuchungen an drei mit BLM perfundierten, oralen Plattenepithelcarcinomen berichtet. Diese Untersuchungen wurden durchgeführt, um die Entstehung und Natur der Riesenzellen zu klären.

### Material und Methoden

Die Untersuchungen wurden an operativ entnommenen Biopsien von 3 Patienten mit fortgeschrittenen Carcinomen der Mundhöhle nach BLM-Perfusion durchgeführt. Vor Therapiebeginn wurde die Diagnose jeweils histologisch gesichert.

### a) Kasuistik

*Fall 1* (F. F., 87 Jahre, weibl.).  $6 \times 4$  cm großes, flächenhaft wachsendes, zentral exulceriertes, gering verhorndes Plattenepithelcarcinom im hinteren Anteil des rechten Sulcus glosso-alveolaris mit Ausbreitung auf die rechte Pharynxwand und den rechten weichen Gaumen ohne tastbare submandibuläre Lymphknoten ( $T_3 N_0 M_0$ ), rechtsseitige intraarterielle Perfusion mit insgesamt 420 mg BLM innerhalb von 40 Tagen. Nach Abschluß der Perfusion nahezu vollständige Rückbildung und Epithelialisierung des ehemaligen flächenhaften Tumorareals bis auf eine 0,5 cm große schüsselförmige, ulceröse Einziehung am rechten Zungenrand mit zirkulärer Induration. Aus diesem Areal wird eine Probeexcision vorgenommen.

Bereits vor der BLM-Therapie enthielt der Tumor stark entdifferenzierte Areale mit Tumornekrosen. In der Biopsie nach der Behandlung (J.-Nr. 16225/75) findet sich noch ausgedehntes Carcinomgewebe, wobei die entdifferenzierten Anteile überwiegen. Nur vereinzelt liegen dazwischen verhornde Tumorzellverbände mit entzündlicher Reaktion und Riesenzellbildung. Die Umgebung ist vernarbt.

*Fall 2* (L. S., 55 Jahre, weibl.).  $4 \times 4$  cm großes exulceriertes, verhorndes Plattenepithelcarcinom des Planum buccale links mit aufgeworfenem Randwall und gleichzeitig submandibular tastbaren, derben, verschieblichen Lymphknoten ( $T_2 N_1 M_0$ ).

Linksseitige intraarterielle Perfusion mit insgesamt 465 mg BLM innerhalb von 46 Tagen. Nach Behandlungsende totale Remission des Primärtumors mit Epithelialisierung und sternförmiger, zentraler, weißer Narbe. Submandibular kein fortbestehender Lymphknoten.

16 Tage nach letzter BLM-Gabe Wangenninnenschichtresektion und suprathyoidale Drüsenausräumung links.

Die Untersuchung des Resektionspräparates (J.-Nr. 15613/75) zeigt an umschriebener Stelle dicht unter dem Epithel noch geringes Tumorrestgewebe mit Verhornungstendenz. Eine Enddifferenzierung ist nicht erkennbar. Die Umgebung ist fibrosiert. Im Bindegewebe finden sich unzählige Riesenzellgranulome (Abb. 1a und b). Vereinzelt sind im Zentrum noch Hornreste nachweisbar, meist ist aber offensichtlich bereits eine weitgehende Abräumung erfolgt. Dann liegen nur noch besonders große, gigantäre Riesenzellen im Bindegewebe. Sie sind umgeben von zahlreichen Histiocyten (Makrophagen), Mastzellen und Lymphocyten (Abb. 2a). Lymphknotenmetastasen sind nicht nachweisbar.

*Fall 3* (H. S., 55 Jahre, männl.).  $4 \times 4$  cm großes, exophytisch wachsendes, breit ulceriertes verhorndes Plattenepithelcarcinom in den hinteren Anteilen der rechten Wange ( $T_3 N_0 M_0$ ). Rechtsseitige intraarterielle Perfusion mit insgesamt 510 mg BLM innerhalb von 51 Tagen. Darunter klinisch totale Tumorremission und Vernarbung des Tumorareals. Im Anschluß an die Perfusion ausgedehnte Excision des ehemaligen Tumorareals.

Die histologische Untersuchung (J.-Nr. 19996/75) zeigt eine Vernarbung des Tumorareals mit dichtem, kollagenen Fasergewebe. Darin liegen verstreuert resorptiv-entzündliche Infiltrate mit Histiocyten, Lymphocyten und Plasmazellen. An mehreren Stellen finden sich als Reste des Tumors kleine, mit Keratin gefüllte Pseudocysten. Vitale Tumorzellrandsäume fehlen. Diese Areale werden von Fasergewebe mit entzündlichen Infiltraten umschlossen. Ganz vereinzelt finden sich am Rande auch hier mehrkernige Riesenzellen<sup>1</sup>.

### b) Methode

An Gefrierschnitten wurden lichtmikroskopisch folgende Enzymaktivitäten dargestellt<sup>2</sup>:

*Saure Phosphatase* (Substrat: Na- $\alpha$ -Naphthylphosphat; Serva, Heidelberg; nach Barka und Anderson, 1962); *Alkalische Phosphatase* (Substrat: Na- $\alpha$ -Naphthylphosphat; Serva, Heidelberg; nach Pearse, 1968); *Unspezifische Esterase* (Substrat: Na- $\alpha$ -Naphthylacetat; Serva, Heidelberg; nach Davis, 1959); *Naphthol-AS-D-Chloracetatesterase* (Substrat: Naphthol-AS-D-Chloracetat; Serva, Heidelberg; nach Lillie, 1965); *Leucin-Aminopeptidase* (LAP; Sub-

<sup>1</sup> In diesem Falle kamen neben den mit den Tumorresten assoziierten Riesenzellen in der tiefen Wangenmuskulatur mehrkernige Riesenzellen vor, welche vom histologischen und elektronenmikroskopischen Bild her als degenerativ veränderte Muskelzellen anzusprechen sind. Auf sie wird im Folgenden nicht eingegangen.

<sup>2</sup> Für die Beratung bei der Durchführung der enzymhistochemischen Untersuchungen und die Kontrolle der Nachweise danken die Autoren Herrn Prof. Dr. H.-J. Stutte und Herrn Dr. E. Schlüter, Pathologisches Institut der Universität Kiel.

strat: L-Leucyl-Naphthylamid; Serva, Heidelberg; Fast Blue B; Gurr, London; nach Nachlas et al., 1957a); *Adenosintriphosphatase* (ATP'ase; Substrat: Adenosin-5'-Triphosphat, Na<sub>2</sub>-Salz; Serva, Heidelberg; nach Wachstein und Meisel, 1957); *Peroxydase* (Substrat: Benzidine; Merck, Darmstadt; nach De Robertis und Grasso, 1946); *Cytochromoxydase* (Substrat:  $\alpha$ -Naphthol AS; Fluka, Buchs/Schweiz, 4-Amino-Biphenylamin; Fluka; nach Burstone, 1959); *Succinodehydrogenase* (Substrat: Bernsteinsäure, Na<sub>2</sub>-Salz; Serva, Heidelberg; nach Nachlas et al., 1957b); *Phosphorylase* (Substrat: 2-D-Glucose-1-Phosphat, Na<sub>2</sub>-Salz; Serva, Heidelberg; nach Sasaki und Takeuchi, 1963).

Die Reaktionen wurden durch Leerproben (nach Enzymblockade) und Reaktionen an bekannten Geweben (Pankreas der Maus und Muskelgewebe) kontrolliert. Außerdem wurden noch ein unbehandeltes orales Plattenepithelcarcinom (45 Jahre alte Patientin, J.-Nr. 19428/75) und ein orales Plattenepithelcarcinom nach kombinierter BLM-Methotrexate Therapie ohne Riesenzellbildung (64 Jahre alter Patient, J.-Nr. 21210/75) als *Kontrollen* untersucht, um therapiebedingte Alteration des Enzymmusters der Tumorzellen auszuschließen.

Die *elektronenmikroskopischen Proben* wurden nach der von Luft (1971 a, b) ausgearbeiteten Methode präpariert. Die Rutheniumrot-Imprägnation wurde gewählt, um eine gute Membranarstellung zu erhalten (Anfärbung der Intercellularsubstanzen) und um insbesondere die Phagolysosomen (sekundäre Lysosomen) zu markieren (vgl. Chambers, 1973). Es folgte eine Dehydrierung in üblicher Weise und die Einbettung in Epon 812. Zunächst wurden Semidünnschnitte angefertigt und mit Toluidinblau angefärbt. Kontrastierung der Feinschnitte erfolgte mit Uranylacetat. Mikroskopiert wurde am Zeiss Elektronenmikroskop Em 9 S-2. Die Schnitte wurden teils unkontrastiert, teils kontrastiert durchgemustert. Der *ultrahistochemische Nachweis* von saurer Phosphatase wurde nach der Methode von Komiyama (1974) modifiziert nach Pearse (1968) durchgeführt. Als Substrat wurde  $\beta$ -Glycerophosphat verwandt. Die Reaktion wurde bei einem pH von 5,8 durchgeführt. Die saure Phosphataseaktivität stellte sich durch Präcipitate von Bleiphosphat dar, das sich als Ergebnis der Hydrolyse von  $\beta$ -Glycerophosphat in Gegenwart von Blei-Ionen (Bleiacetat) bildet.

### Ergebnisse

Die Ergebnisse der *lichtmikroskopischen* Enzymnachweise sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die Nachweise von saurer Phosphataseaktivität und Leucin-Aminopeptidaseaktivität an Riesenzellen sind in Abb. 1 dargestellt. Bei der sauren

Tabelle 1. Ergebnisse der enzymhistochemischen Nachweise am Tumorgewebe und an den Riesenzellen im Vergleich zum Enzymmuster der Monocyten (nach Leder, 1967, und Shoham et al., 1974) und zu den in Makrophagen vorkommenden Enzymen (nach Carr, 1973, und Shoham et al., 1974)

	Tumorzellen	Riesenzellen	Monocyten	Makrophagen
Saure Phosphatase	+/-	++/+	++	++
Alkalische Phosphatase	-	-	-	-
Unspez. Esterase	+/-	++	++	+
Naphthol-AS-D-Chlor-acetatesterase	(+)/-	+	(+)/-	+/-
Leucin-Aminopeptidase	-	++	++	+
Adenosintriphosphatase	-	(+)	(+)	+
Peroxidase	-	-	(+)/-	+/-
Cytochromoxidase	-	-	(+)	+
SDH	-	-	-	+
Phosphorylase	-	-	-	-

Aktivitäten: + = positiv; - = negativ; (+) = schwach positiv; ++ = stark positiv; +/- = unterschiedlich, teils positiv, teils negativ.

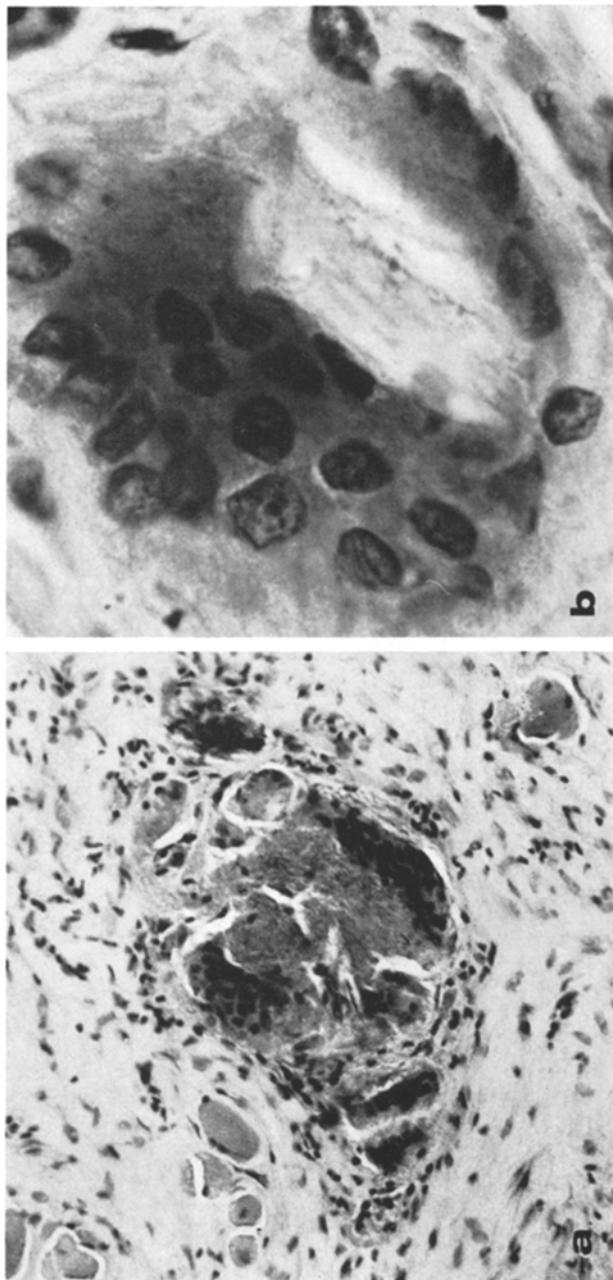


Abb. 1 a und b. Nachweis von Enzymaktivitäten in den Riesenzellen. (a) Granulom mit mehreren Riesenzellen. Positiver Ausfall des Leucin-Aminopeptidase-Nachweises (im Original blau-violett). Fall 2, Gefrierschnitt 84 $\times$ . (b) Riesenzelle mit Nachweis von saurer Phosphatasaktivität. Phosphatasen-negativer Zelleinschluß (Makroendocytose?). Nachweis im Original rot-braun. Fall 2, Gefrierschnitt 1200 $\times$

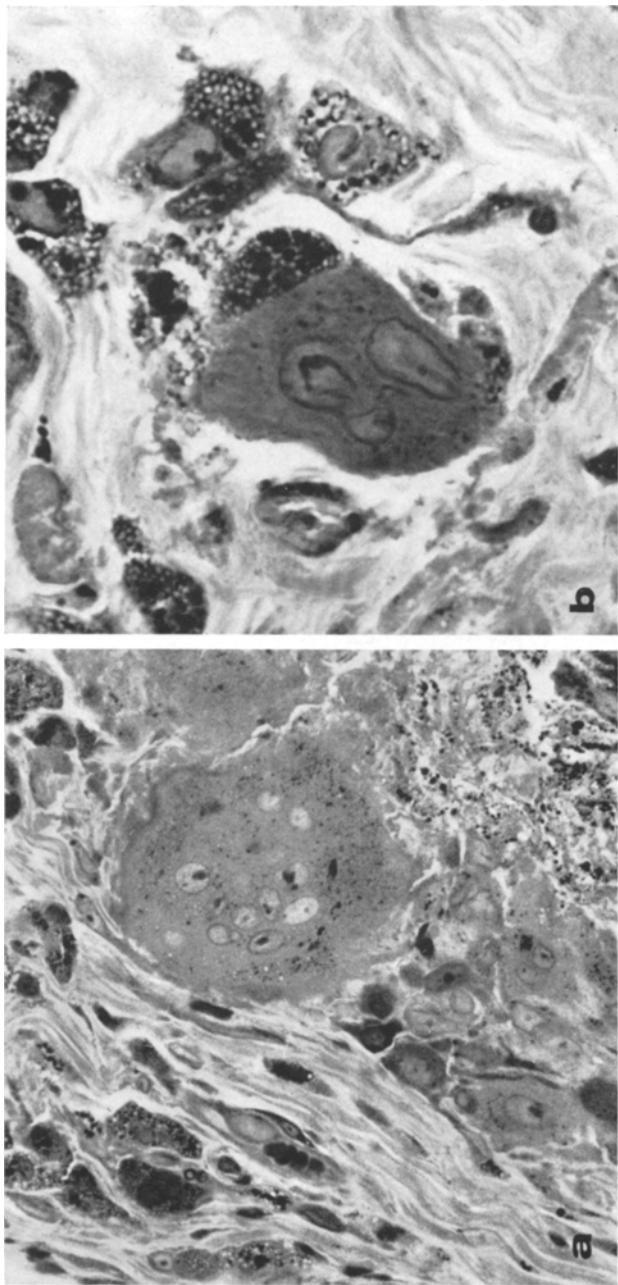


Abb. 2 a und b. Riesenzellen und Brüzzündungsinfiltrat im Semidünnschnitt. (a) Große Riesenzelle am Rande einer Keratincyste (rechts unten) mit erkennbaren Granula. In der Umgebung Bindegewebe mit Fibroblasten, einkernigen Makrophagen und Lymphozyten. Fall 2, Toluidinblau, 1200×. (b) Riesenzelle in Assoziation mit einkernigen Makrophagen. Diese besitzen deutliche Granula und Vacuolen, Fall 2, Toluidinblau, 1200×

Tabelle 2. Elektronenoptisch nachweisbare Zelldifferenzierung von Tumorzellen und Riesenzellen

	Tumorzellen	Mehrkernige Riesenzellen	Einkernige Makrophagen
Zell-membran	glatt, nur vereinzelte Verzahnungen, zahlreiche kurze Desmosomen (Rutheniumrot-positiv)	dichte fingerförmige und tentakelartige Cytoplasmaausläufer mit saurer Phosphatase-Aktivität, Interdigitationen mit einkernigen Makrophagen (Riesenzellbildung ?) an Orten erhöhter Phagocytose, großflächige Membrankontakte mit kleinen Lymphocyten (immunologische Interaktion ?), zahlreiche Invaginationen mit Hornlamellen, Zelldetritus und Keratinresten, <i>keine Desmosomen</i>	wie Riesenzellen
Cyto-plasma	spärlich, <i>Tonofibrillenbündel</i>	reichlich, <i>keine Tonofibrillen</i>	wie Riesenzellen
Orga-nellen	wenig Mitochondrien, spärliches endoplasmatisches Reticulum, Golgifelder nicht sicher nachweisbar, zahlreiche freie Ribosomen und Polyribosomen, vereinzelte Lysosomen, in einigen Zellen polymorphe Keratohyalin-granula	zahlreiche Mitochondrien, gut entwickeltes rauhes endoplasmatisches Reticulum, Golgifelder nachweisbar, zahlreiche Lysosomen, in verschiedenen Entwicklungsstadien (unterschiedliche Größe, Form und Inhalt; sekundäre Lysosomen mit Rutheniumrot-positivem Material) häufig mit gut nachweisbarer saurer Phosphatase-Aktivität, Pinocytosevesikel	wie Riesenzellen, aber größere, stark polymorphe Lysosomen und zahlreiche Pinocytosevesikel (Zeichen erhöhter Aktivität)
Kern	pleomorph, groß, meist ovalär dichte Nucleolen, pleomorph, Mehrfach-anschnitte, Kernchromatin diffus, locker, keine Chromatin-kondensate, Caryolemm mit deutlichen Poren	nur geringe Größen-schwankungen, meist ovalär, vereinzelt tiefe Einkerbungen, lockeres Nucleolen, lockeres Caryoplasma, gut darstellbares Caryolemm	wie Riesenzellen

Phosphatase war auffällig, daß die Reaktion in den Riesenzellen unterschiedlich intensiv ausfielen.

Im Semidünnabschnitt zeigten die Tumorzellen — besonders deutlich im Fall 2 — desmosomale Zellverbindungen, die an das Bild der Stachelzellschicht des Platten-

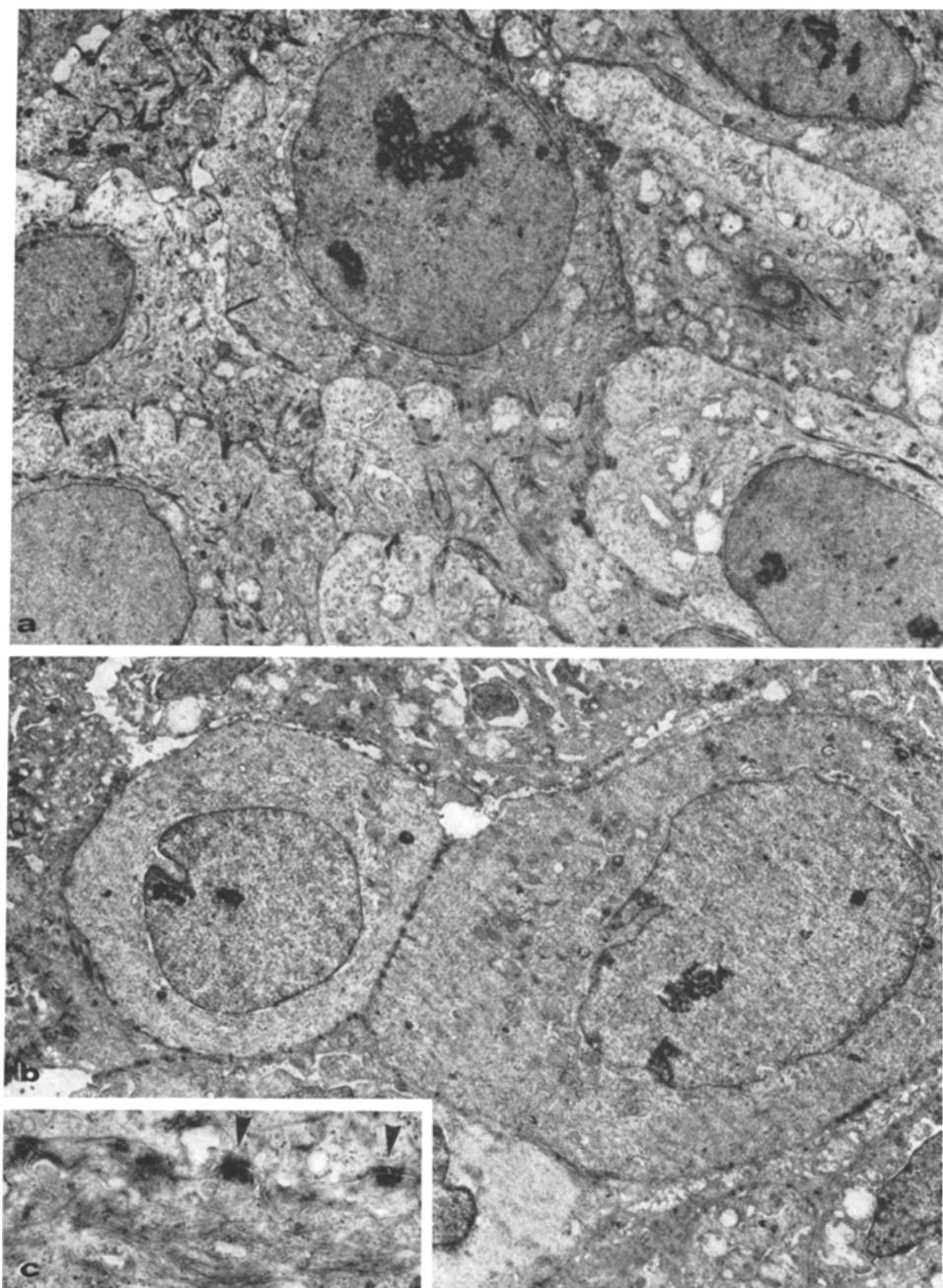


Abb. 3 a—c. Morphologie der Tumorzellen. a) Hochdifferenzierte Tumorzellen mit zahlreichen Tonofibrillen und Desmosomen (Fall 2,  $6600\times$ ). (b) Niedrig differenzierte Tumorzellen mit glatten dicht aneinanderliegenden Zellmembranen und Desmosomen (Fall 1,  $5600\times$ ). (c) Tumorzelle mit Tonofibrillen und Desmosomen (Pfeile; Fall 1,  $16100\times$ )

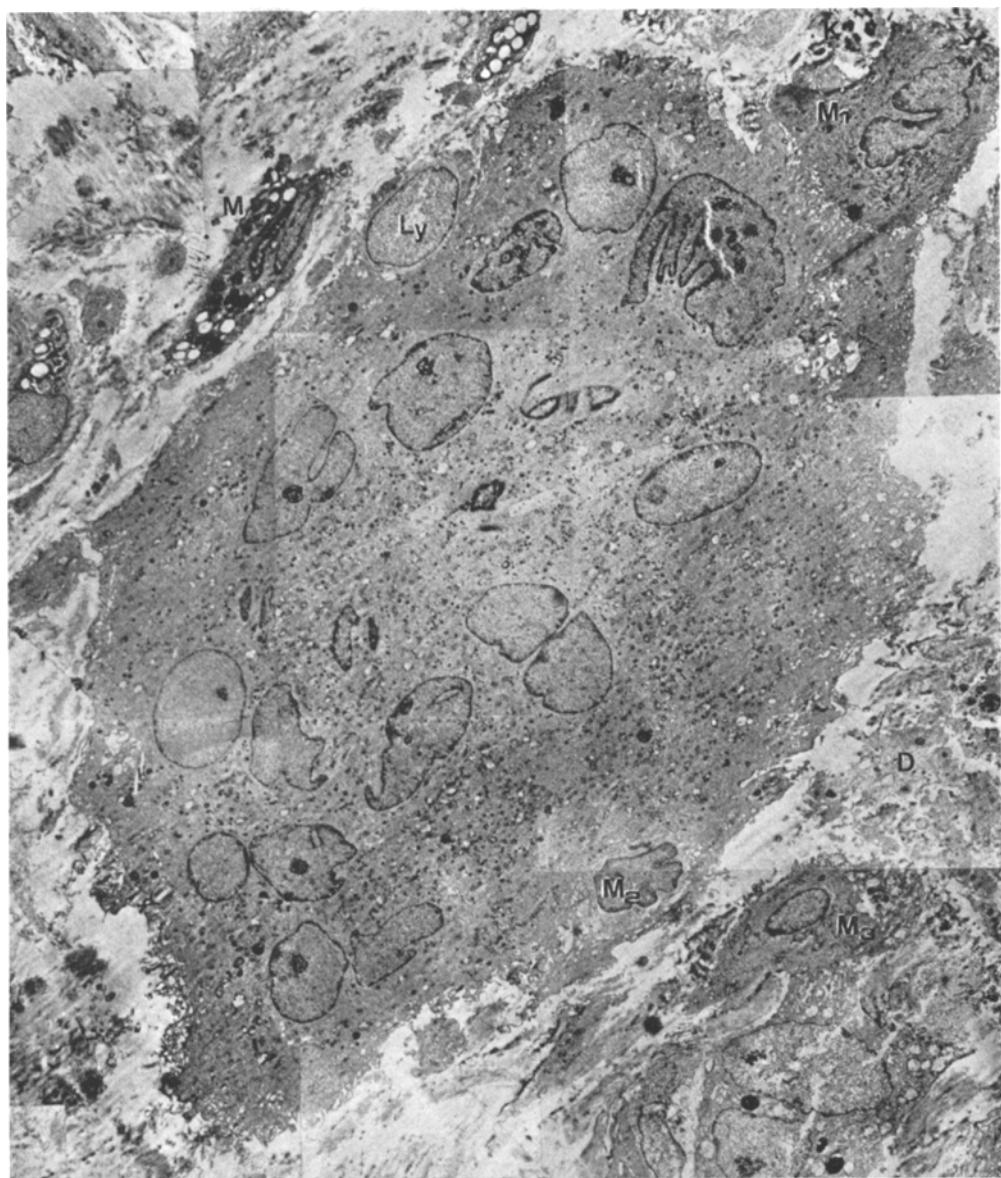


Abb. 4. Montage einer Riesenzelle aus mehreren Einzelaufnahmen. Unzählige sehr kleine Lysosomen im Cytoplasma. Fingerförmige Cytoplasmaprojektionen an der Oberfläche. Assoziation mit zwei einkernigen Makrophagen ( $M_1$  und  $M_2$ ). Membrankontakt zu einem kleinen Lymphocyt (Ly).  $M$  = einkerniger Makrophag in der Umgebung.  $D$  = Detritus.  $K$  = Keratinfragmente. Unten rechts zweikernige Riesenzelle mit wenigen größeren Lysosomen und Assoziation mit einem weiteren Makrophagen ( $M_3$ ). Fall 2, unkontrastiert,  $2400\times$

epithels erinnern. Die mehrkernigen Riesenzellen lassen derartige Verbindungen vermissen. Sie liegen mit großen cytoplasmareichen Zelleibern meist in kleinen Gruppen um Areale mit Keratinresten (Abb. 2a). Einige zeigen eine dichte Gra-

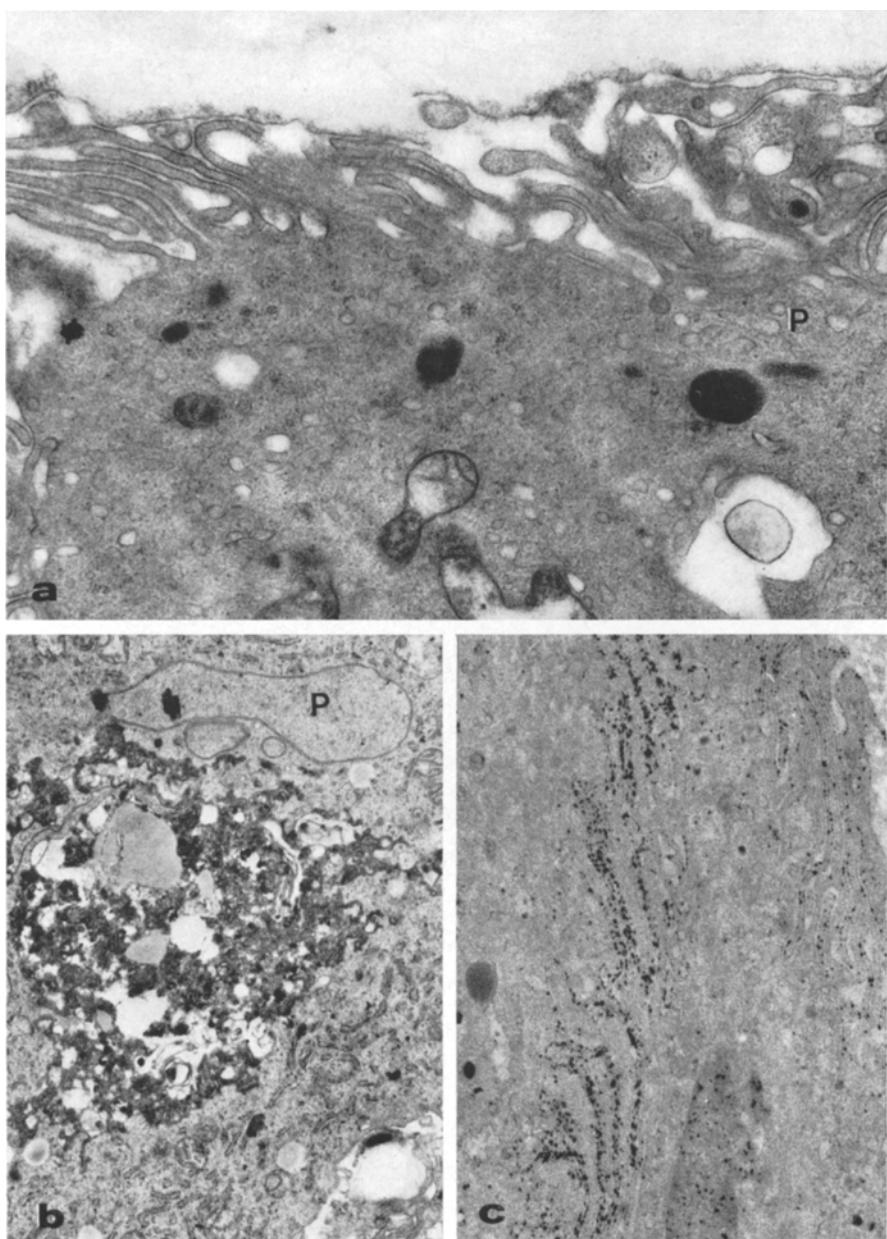


Abb. 5 a—c. Zelloberfläche der Riesenzelle. (a) Tentakelartige Cytoplasmaprojektionen. Im Cytoplasma Lysosomen und Pinocytosevesikel (P).  $17\,250\times$ . (b) Invagination des Cytoplasmas mit Zelldetritus und Keratinfragmenten (Makroendocytose). Im Cytoplasma rauhes endoplasmatisches Reticulum und ein konfluierter Pinocytosevesikel (P).  $7\,300\times$ . (c) Nachweis von saurer Phosphataseaktivität an der Zelloberfläche. Feinkörniger Bleiniederschlag. Unkontrastierter Schnitt,  $11\,900\times$

nulierung und sind kleiner, die peripher gelegenen Riesenzellen sind oft sehr viel größer und besitzen ein schwach angefärbtes Cytoplasma mit nur vereinzelten Granula. In der Umgebung liegen zahlreiche einkernige Makrophagen mit dichten Granula und Vacuolen, daneben einzelne Mastzellen und Lymphocyten (Abb. 2a).

Die Tabelle 2 stellt die *elektronenmikroskopischen* Beobachtungen an Tumorzellen und Riesenzellen gegenüber. Es lassen sich an der Mehrzahl der Tumorzellen (Fall 2 alle untersuchten Tumorzellen, im stärker anaplastischen Tumor von Fall 1 in den meisten Tumorzellen) glatt aneinander liegende Zellmembranen mit zahlreichen deutlich rutheniumrotmarkierten Desmosomen nachweisen (Abb. 3). Nur vereinzelt sind die Zellmembranen miteinander verzahnt. Das Cytoplasma ist organellearm und enthält unterschiedlich viele Bündel von Tonofibrillen (Abb. 3c). Im Fall 1 finden sich nicht in allen Tumorzellen Tonofibrillen. Tumorzellen mit Verhornungstendenz enthalten unterschiedlich viele, z.T. sehr große und polymorphe Keratohyalingranula (Fall 3). Die Zellkerne sind besonders im Fall 1 sehr unterschiedlich in der Größe, die Nucleolen sind groß und dicht, teilweise mehrfach angeschnitten.

Die Riesenzellen besitzen demgegenüber eine Zellmembran mit unzähligen teils fingerartigen, teils tentakelförmigen Cytoplasmaprojektionen (Abb. 4, 5, 6a). In tiefen Buchten der Zellmembran findet sich Zelldetritus, besonders Ribosomen und Keratinfragmente (Abb. 5b). Diese Invaginationen müssen als Makroendocytose aufgefaßt werden. Desmosomale Zellverbindungen fehlen. Das Cytoplasma der Riesenzellen ist organellenreich (Abb. 4 und 6). Es finden sich zahlreiche Mitochondrien, ein prominentes rauhes endoplasmatisches Reticulum (Abb. 5b und 6a) sowie unterschiedlich viele elektronendichte, membranbegrenzte Körper, zum Teil mit deutlicher Halobildung am Rande (Abb. 6a und b). Sie sind unterschiedlich groß und verschieden geformt. Im Inneren der Zelle sind sie meist klein, rund und mit deutlicher Halobildung (Abb. 6b), im Randbereich größer und unregelmäßig gestaltet (Abb. 6a). Diese Körper entsprechen morphologisch Lysosomen (Cohn und Fedorko, 1969; Daems *et al.*, 1969). Der Inhalt ist strahlendicht und offensichtlich selektiv Rutheniumrot markiert.

Bei der *ultrahistochemischen Darstellung* der sauren Phosphataseaktivität finden sich selektiv in den Lysosomen feingranuläre Bleiniederschläge (positiver Ausfall der Reaktion, Abb. 6c). Neben der intracellulär nachweisbaren Aktivität der sauren Phosphatase findet sich extracelluläre Aktivität, die deutlich an der äußeren Membran der Makrophagen und Riesenzellen lokalisiert ist. In der Nähe der Zellmembranen liegen außer den Lysosomen auch Pinocytosevesikel unterschiedlicher Größe (Abb. 5a und b, 6a).

Die *Riesenzellen* besitzen zahlreiche Kerne. Diese sind gleichmäßig groß und enthalten ein lockeres, homogenes Chromatin und prominente Nucleolen. Im Vergleich zu den Tumorzellen sind diese weniger strahlendicht. Ein Teil der Kerne zeigt tiefe Einkerbungen. Kernteilungsfiguren fehlen.

Interessant ist die Beobachtung, daß sich an einigen Riesenzellen eine oder auch mehrere assoziierte einkernige Makrophagen finden (Abb. 2b, 4 und 7). Die Zellen stehen über zahlreiche dichte und tiefe Membran-Interdigitationen miteinander in engem Kontakt. Bei diesen Interdigitationen ergibt sich häufig der Eindruck, daß Membranfusionen stattfinden, zumal an diesen Stellen keine

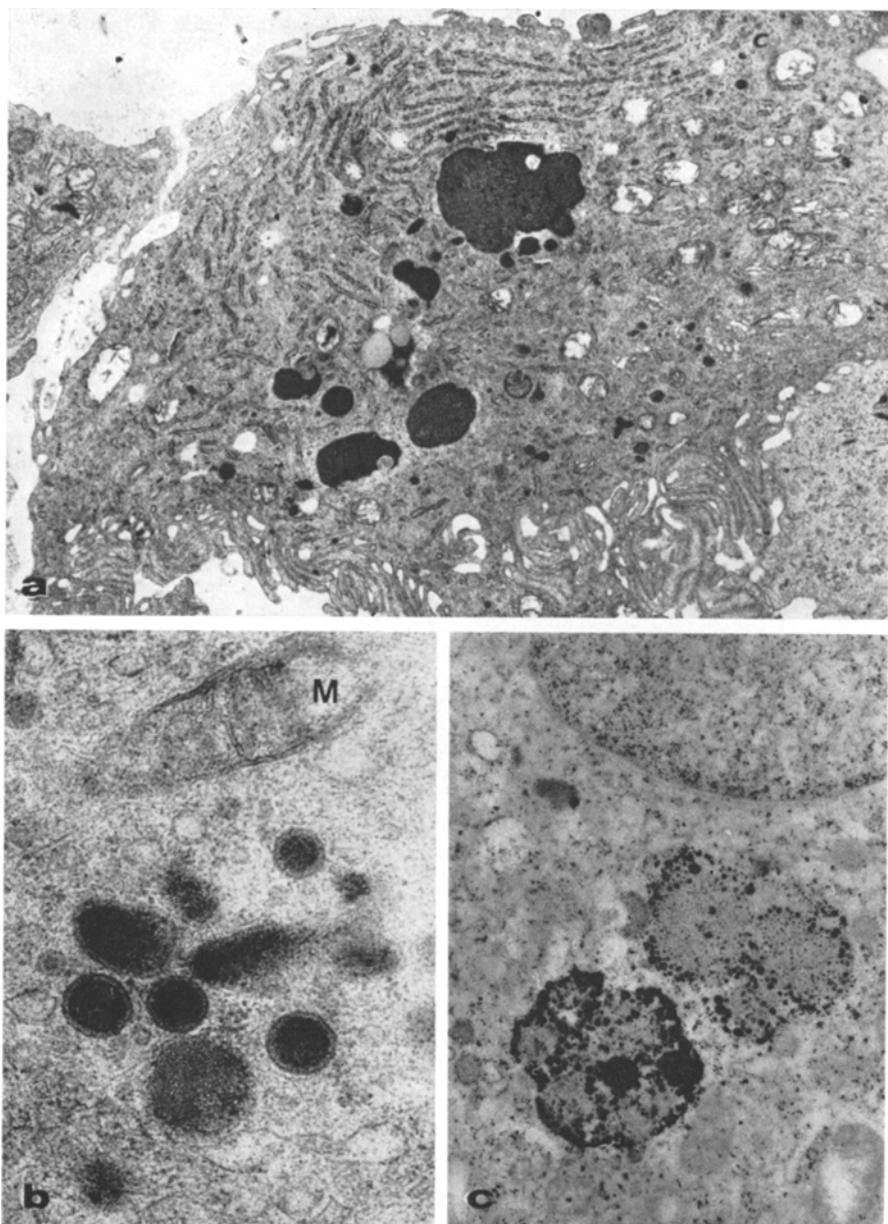


Abb. 6 a—c. Die Lysosomen der Riesenzellen. (a) Peripheres Cytoplasma einer Riesenzelle mit mehreren großen, sekundären, Rutheniumrot-positiven Lysosomen und gut entwickeltem rauhen endoplasmatischen Reticulum.  $6800\times$ . (b) Kleine, primäre Lysosomen im Innern der Zelle mit deutlicher Halobildung. M Mitochondrion.  $47250\times$ . (c) Nachweis von saurer Phosphataseaktivität in den Lysosomen. Feinkörniger Bleiniederschlag. Unkontrastierter Schnitt,  $6590\times$

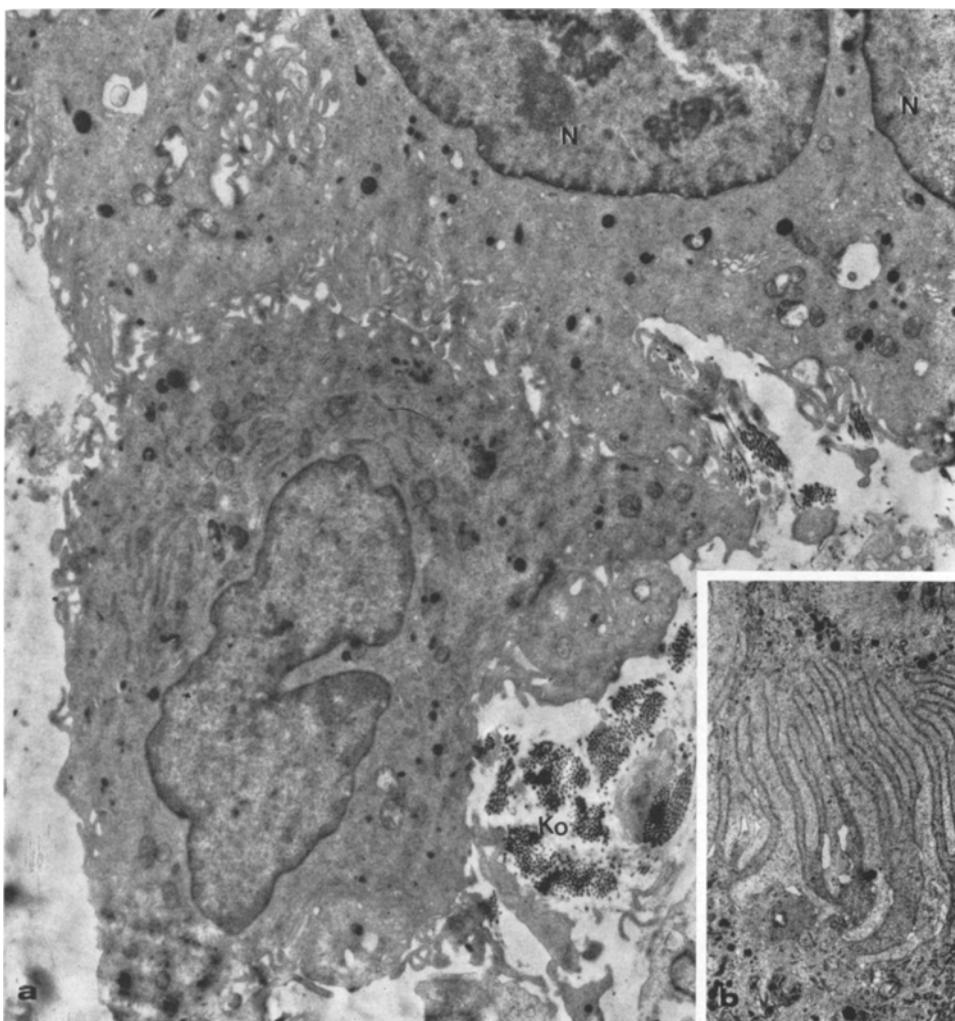


Abb. 7 a und b. (a) Assoziation eines einkernigen Makrophagen mit einer Riesenzelle (*N* Kernanschnitt). Zahlreiche Interdigititionen, zum Teil unscharfe Abgrenzungen. *Ko* Kollagenfibrillen.  $8300\times$ . (b) Interdigititionen mit noch gut erhaltenen Membranen.  $8500\times$

mit Rutheniumrot anfärbbare Glykokalyx nachweisbar ist. Derartige *Zellfusionen* finden sich auffälligerweise immer an Orten einer gesteigerten Phagocytose (Abb. 4).

An anderen Stellen stehen die Riesenzellen mit kleinen Lymphozyten in engem Kontakt, vereinzelt sind diese von Riesenzellen umschlossen und zeigen großflächige Membrankontakte (Abb. 4).

### Diskussion

In allen 3 Fällen konnten die von Burkhardt und Höltje (1975) als typisch nach BLM-Therapie beschriebenen Veränderungen am Tumor beobachtet werden.

Die Tumorzellen werden über eine Verhornung devitalisiert. Im Fall 3 bilden sich die typischen keratinfüllten Pseudocysten.

In allen 3 Fällen fanden sich Riesenzellen, teils im Randbereich von verhornten Tumorarealen, teils in kleinen Granulomen zusammenliegend. Während in den Fällen 1 und 3 nur wenige Riesenzellen im untersuchten Material nachweisbar waren, fanden sich im Falle 2 zahlreiche und zellreiche Riesenzellgranulome mit noch nachweisbaren Keratinlamellen oder -fragmenten im Zentrum.

Verschiedene Autoren (Lübbecke *et al.*, 1975; Pape *et al.*, 1975) haben die Riesenzellen nach BLM-Therapie als Tumorriesenzellen gedeutet. Allerdings wird auch von ihnen als Besonderheit hervorgehoben, daß diese meist peripher liegen und verhältnismäßig uniforme Kerne zeigen. Lübbecke u. Mitarb. (1975) sprechen von „früher Randreaktion“ der Tumorzellen. Wir hatten aufgrund unserer systematischen lichtmikroskopischen Beobachtungen (Burkhardt und Höltje, 1975) den Eindruck, daß es sich eher um phagocytierende Riesenzellen (vom Fremdkörperotyp) handelt.

#### *a) Enzymhistochemie*

Die Gegenüberstellung der Enzymmuster von Tumorzellen und Riesenzellen (Tabelle 1) ergibt bereits deutliche Unterschiede. Besonders charakteristisch für die Riesenzellen ist die hohe saure Phosphatase- und Leucin-Aminopeptidase-Aktivität (Abb. 1). Das Enzymmuster der Riesenzellen ähnelt damit den Makrophagen, bzw. den monocytoiden Zellen (Leder, 1967; Carr, 1973; Shoham *et al.*, 1974). Die beobachteten Differenzen erklären sich durch die Anpassung des Enzymmusters an variable Funktionszustände der phagocytierenden Zellen (Carr, 1973).

Die Tumorzellen weisen demgegenüber nur spärliche und inkonstante Aktivitäten auf. Differenzen zwischen den BLM-behandelten Tumoren und den unbehandelten, bzw. kombiniert behandelten Tumoren bestanden nicht. Saure Phosphatase-Aktivität findet sich nur in Tumorzellen mit fortgeschrittener Verhornung, niemals in unverhornten Zellen (wie es Tumorriesenzellen wären). Plattenepithelcarcinome verhalten sich somit ähnlich wie das normale Plattenepithel (vgl. Olson und Nordquist, 1966; Susi, 1968; Squier und Waterhouse, 1970).

Die Bedeutung und das Vorhandensein von Leucin-Aminopeptidase in Tumoren ist umstritten. Mohr (1967) wies an Ehrlich-Carcinomen der Maus und menschlichen Mamma- und Rectumcarcinomen eine starke LAP-Aktivität im Bereich der Destruktionszone nach. Willighagen (1973) betont den negativen Ausfall des LAP-Nachweises in Plattenepithelcarcinomen, Okamoto u. Mitarb. (1963) fanden in 34 oralen Plattenepithelcarcinomen keine LAP-Aktivität in Tumorzellen, sondern nur im umgebenden Stroma. Sie sehen darin eine Reaktion auf das invasive Wachstum und keinen Teilmechanismus der Tumorinvasion. Die von uns untersuchten Carcinome besitzen ebenfalls keine LAP-Aktivität, diese findet sich nur in den Makrophagen und Riesenzellen. Die fehlende SDH-Aktivität in Tumorzellen steht in Übereinstimmung mit den Befunden von Mori *et al.* (1964), Shklar (1966) und Cabrini (1973).

#### *b) Elektronenmikroskopie; Zelldifferenzierung von Riesenzellen und Tumorzellen*

Die wichtigsten Argumente für eine Einordnung der Riesenzellen als Makrophagen liefert insbesondere die elektronenmikroskopische Untersuchung (Tabelle 2).

Schon im Semidünnsschnitt weisen diese Zellen deutlich cytoplasmatische Granula auf, die sich im elektronenmikroskopischen Bild als primäre und sekundäre Lysosomen zeigen (Abb. 2 und 6). Der Nachweis von saurer Phosphatase-Aktivität in diesen Granula gilt als Beweis, daß es sich tatsächlich um Lysosomen und nicht um andere ähnliche cytoplasmatische Körper — z.B. Keratohyalin-granula [diese besitzen keine Membranbegrenzung und weisen keine saure Phosphatase-Aktivität auf (Squier und Waterhouse, 1970; Ugel, 1969)] — handelt (Daems *et al.*, 1969). Die Morphologie allein ist zwar charakteristisch, aber nicht „spezifisch“. Außerdem finden sich submembranöse Pinocytosevesikel, charakteristische Cytoplasmaausstülpungen, und eine Makroendocytose von Zelldetritus mit Keratinfragmenten (Abb. 5, 6). Elektronenoptisch kann saure Phosphatase-Aktivität außer in den Lysosomen auch an den äußeren Zellmembranen nachgewiesen werden (Abb. 5c). Letzteres ist als morphologischer Ausdruck einer Abgabe des Enzyms in das Interstitium zu werten. Diese Befunde beweisen eine lebhafte Phagocytose der Riesenzellen, zumindest in bestimmten Stadien ihrer Entwicklung.

Hinweise für eine derartige Aktivität fehlen in den Tumorzellen. Auch die Kernstruktur und -form, sowie der Gehalt an Organellen ist deutlich different und spricht insgesamt für eine grundsätzlich andere Differenzierung der Riesenzellen. Im Gegensatz zu den Tumorzellen besitzen die Riesenzellen keine Merkmale einer epithelialen Differenzierung (Desmosomen, Tonofibrillen, Keratohyalingranula; Abb. 3, Tabelle 2).

### c) Beobachtungen zur Genese und Funktion der Riesenzellen

Darüber hinaus geben die elektronenmikroskopischen Beobachtungen Hinweise zur Entstehung und funktionellen Dynamik der Riesenzellen.

Offensichtlich ist die Entstehung der Riesenzellen funktionsbedingt (funktionelle Genese). Sie entstehen im Gegensatz zur Tumorriesenzelle nicht durch Kernteilungen ohne nachfolgende Zellteilungen, sondern durch Assoziation und Fusion von Makrophagen (Abb. 2b, 4 und 7; Carr, 1973). Entsprechend fanden sich weder licht- noch elektronenmikroskopisch Mitosefiguren in den Riesenzellen. Nach unseren Beobachtungen findet der Vorgang der Fusion stets an Stellen einer erhöhten Phagocytose statt (Abb. 4). Nach Evans (1972) sowie Eccles und Alexander (1974) sind die Makrophagen in Tumoren monocytogen. Eine Proliferation im Tumor findet nicht statt. Unsere Befunde (Histologie, Enzymhistochemie und Elektronenmikroskopie) stimmen mit diesen Befunden überein.

Nach der Morphologie ist den einkernigen Makrophagen eine höhere funktionelle Aktivität zuzuschreiben. Die Zahl und Größe der Lysosomen nimmt kontinuierlich von kleineren Riesenzellen zu den extremen Formen der Riesenzellen mit der Größenzunahme ab. Auch Carr (1973) weist darauf hin, daß den makrophagocytogenen Riesenzellen möglicherweise eine verminderte funktionell-phagocytotische Bedeutung zukommt.

Der häufige enge und großflächige Membrankontakt von Riesenzellen mit kleinen Lymphozyten (Abb. 4) spricht für eine celluläre Interaktion. Möglicherweise handelt es sich hierbei um den morphologischen Ausdruck eines immunologischen Phänomens im Sinne der Helferzelltheorie (Roos, 1970).

Bis zu einer gewissen Dosierung zumindest, scheint BLM die Makrophagen, die Riesenzellen und ihre Bildung nicht zu schädigen. Bei dem Reichtum an Riesenzellen kann man sogar an eine aktive Förderung der Riesenzellbildung durch BLM denken. Da nach neueren Vorstellungen der Hauptangriffspunkt der Cytostatica in therapeutischen Dosierungen an der Zellmembran und nicht am Kern (DNS) liegt, wäre es denkbar, daß Membranfusionen durch BLM induzierte Membranalterationen begünstigt werden. Normalerweise besteht eine Kontakt-Inhibition zwischen Makrophagen (Oldfield, 1963). Bei unbehandelten Plattenepithelcarcinomen findet man Riesenzellbildungen nur selten (vgl. Broders, 1920). Bei einer systematischen histologischen Untersuchung von 139 teils unbehandelten, teils cytostatisch behandelten Plattenepithelcarcinomen der Lippe fanden wir nur in 8 Fällen eine Riesenzellbildung, keinmal Riesenzellgranulome. Renault u. Mitarb. (1972) konnten bei 55 unbehandelten Plattenepithelcarcinomen keinmal entsprechende Veränderungen nachweisen.

Nach Bestrahlung von Plattenepithelcarcinomen (Hall und Friedmann, 1948) und auch nach Methotrexatperfusion (Desprez *et al.*, 1966) treten gelegentlich granulomatöse Reaktionen mit Riesenzellbildung auf. Eine Riesenzellbildung in dem Ausmaß, wie man sie nach BLM-Behandlung findet, wird jedoch im allgemeinen weder im Bereich behandelter noch un behandelter Tumoren beobachtet.

Der von uns festgestellte hohe Gehalt an ein- und mehrkernigen Makrophagen im Tumor und in seiner Umgebung unter BLM-Behandlung erscheint somit neben der Tumorverhornung einen wichtigen Faktor der BLM-Wirkung darzustellen. Er wird durch die fehlende oder geringe immunsuppressive und myelodepressive Wirkung des BLM (Ohno *et al.*, 1971; Boggs, 1974; Stacher und Lutz, 1974), ermöglicht. Eine vorhergehende oder gleichzeitige Behandlung mit Substanzen oder Methodiken, welche das Risiko einer Entdifferenzierung des Tumors oder eine Immunsuppression bewirken, erscheint hiernach bedenklich.

### Literatur

- Barka, T., Anderson, P. J.: Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as a coupler. *J. Histochem. Cytochem.* **10**, 741—753 (1962)
- Boggs, S. S.: Minimal bone marrow damage in mice given bleomycin. *Cancer Res.* **34**, 1938—1942 (1974)
- Broders, A. C.: Squamous-cell epithelioma of the lip. A study of 537 cases. *J. Amer. med. Ass.* **74**, 656—664 (1920)
- Burkhardt, A., Höltje, W.-J.: The effects of intraarterial bleomycin therapy on squamous cell carcinomas of the oral cavity. Bioptic and autoptic examinations. *J. Maxillofac. Surg.* **1975** (in print)
- Burstone, M.: New histochemical techniques for the demonstration of tissue oxydase (cytochrome oxydase). *J. Histochem. Cytochem.* **7**, 112—122 (1959)
- Cabrinii, R.: Histochemistry of early oral cancer. *Int. dent. J.* **23**, 100—107 (1973)
- Carr, I.: The Macrophage. A review of the ultrastructure and function. London-New York: Academic Press 1973
- Chambers, V. C.: The use of ruthenium red in an electron microscope study of cytophagocytosis. *J. Cell Biol.* **57**, 874—878 (1973)
- Cohn, Z. A., Fedorko, M. E.: The formation and fate of lysosomes. In: Dingle, J. T., and H. B. Fells, *Lysosomes in biology and pathology*, p. 43—63. Amsterdam and London: North-Holland 1969

- Daems, W. Th., Wisse, E., Brederoo, P.: Electron microscopy of the vacuolar apparatus. In: Dingle, J. T., and H. B. Fells, Lysosomes in biology and pathology, p. 64—112. Amsterdam and London: North-Holland 1969
- Davis, B. J.: Histochemical demonstration of erythrocyte esterases. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **101**, 90—93 (1959)
- De Robertis, E., Grasso, R.: Peroxidase activity of thyroid gland under normal and experimental conditions. Endocrinology **38**, 137—146 (1946)
- Desprez, J. D., Kiehn, C. L., Krizek, Th. J., Damm, H.: Histological and biochemical considerations in the treatment of oral cancer with preoperative methotrexate infusion. Plast. Reconstr. Surg. **38**, 336—341 (1966)
- Eccles, S. A., Alexander, P.: Macrophage content of tumors in relation to metastatic spread and host immune reaction. Nature (Lond.) **250**, 667—669 (1974)
- Eccles, S. A., Alexander, P.: Immunologically-mediated restraint of latent tumour metastases. Nature (Lond.) **257**, 52—53 (1975)
- Evans, R.: Macrophages in syngeneic animal tumours. Transplantation **14**, 468—473 (1972)
- Evans, R.: Preparation of pure cultures of tumor macrophages. J. nat. Cancer Inst. **50**, 271—273 (1973a)
- Evans, R.: Macrophages and the tumour bearing host. Brit. J. Cancer **28**, Suppl. 1, 19—25 (1973b)
- Fettig, O., Hilgarth, M., Hillemanns, H. G., Kaltenbach, J. F.: Bleomycin in der Gynäkologie. Fortschr. Med. **89**, 1373—1379 (1971)
- Hall, J. W., Friedman, M.: Histologic changes in squamous cell carcinoma of the mouth and oropharynx produced by fractionated external roentgen irradiation. Radiology **50**, 318—350 (1948)
- Hornová, J., Bilder, J.: Histology of orofacial tumors perfused with bleomycin. Neoplasma **21**, 599—605 (1974)
- Komiyama, A., Spicer, S. S.: Ultrastructural localization of a characteristic acid phosphatase in granules of rabbit basophils. J. Histochem. Cytochem. **22**, 1092—1104 (1974)
- Leder, L.-D.: Der Blutmonocyt. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1967
- Lillie, R. D.: Histopathologic technic and practical histochemistry, 3rd ed., p. 350—352. New York: McGraw-Hill 1965
- Lübbe, H., Schüle, H., Kehrer, F., Kraus, B.: Kombinationstherapie Operation — Bleomycin beim Plattenepithel-Carcinom der Mundhöhle. Vortrag auf der 25. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie vom 12.—16. Mai 1975 in Hamburg. Fortschr. Kiefer- u. Gesichtschir. **21** (1975) (im Druck)
- Luft, J. H.: Ruthenium red and violett. I. Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. Anat. Rec. **171**, 347—368 (1971a)
- Luft, J. H.: Ruthenium red and violett. II. Fine structural localization in animal tissues. Anat. Rec. **171**, 369—416 (1971b)
- Mohr, H.-J.: Die L-Leucinaminopeptidase (LAP) in Tumorzellen und ihre Bedeutung beim destruierenden Tumorwachstum. Frankfurt. Z. Path. **77**, 107—124 (1967)
- Mori, M., Mizushima, T., Oka, R., Okamoto, Y., Takita, Y.: Histochemical observations of succinic, malic, and lactic dehydrogenase in oral tumors. Oral Surg. **17**, 352—362 (1964)
- Nachlas, M. M., Crawford, D. T., Seligman, A. M.: The histochemical demonstration of leucine aminopeptidase. J. Histochem. Cytochem. **5**, 264—278 (1957a)
- Nachlas, M. M., Tsou, K.-W., De Sousa, E., Cheng, Ch. Ch., Seligman, A.: Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. J. Histochem. Cytochem. **5**, 420—436 (1957b)
- Ohno, R., Nishiwaki, H., Kawashima, K., Uetani, T., Hirano, M., Miura, M., Yamada, K.: Lack of immunosuppressive effect of bleomycin on the primary response of mice to sheep red blood cells. Gann **62**, 267—274 (1971)
- Okamoto, Y., Oka, R., Mori, M.: Histochemical study of aminopeptidase in tumors of the oral region. Oral Surg. **16**, 733—737 (1963)
- Oldfield, F. E.: Exp. Cell Res. **30**, 125 (1963). Zit. nach A. Harris. In: R. P. Cox (ed.), Cell communication. New York-London-Sydney-Toronto: Wiley and Sons 1974
- Olson, R. L., Nordquist, R. E.: Ultramicroscopic localization of acid phosphatase in human epidermis. J. invest. Derm. **46**, 431—435 (1966)

- Pape, H.-D., Schäfer, H.-E., Hörster, W.: Therapeutische Effekte und histologische Befunde bei der Anwendung des Cytostatikums Bleomycin. Vortrag auf der 25. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie vom 12.—16. Mai 1975 in Hamburg. Fortschr. Kiefer- u. Gesichtschir. **21** (1975) (im Druck)
- Pearse, A. G. E.: Histochemistry, theoretical and applied, 3rd ed., London: J. and A. Churchill Ltd. 1968
- Renault, P., André, P., Laccourreye, H.: Cancers pharyngo-laryngés traités par la bleomycin. Essai de contrôle histo-pathologique. Ann. Oto-laryng. (Paris) **89**, 229—238 (1972)
- Roos, B.: Makrophagen: Herkunft, Entwicklung und Funktion. In: Handbuch der allgemeinen Pathologie, Bd. VII, 3: Immunreaktionen. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1970
- Sasaki, M., Takeuchi, T.: Histochemical and electronmicroscopic observations of glycogen synthesized from glucose-1-phosphate by phosphorylase and branching enzyme in human muscle. J. Histochem. Cytochem. **11**, 342—348 (1963)
- Schwalbe, E.: Allgemeine Pathologie, S. 235—254. Stuttgart: Ferdinand Enke 1911
- Shklar, G.: Enzyme histochemistry of human oral carcinoma. Oral Surg. **21**, 764—769 (1966)
- Shoham, D., Ben David, E., Rozenszajn, L. A.: Cytochemical and morphologic identification of macrophages and eosinophils in tissue cultures of normal human bone marrow. Blood **44**, 221—233 (1974)
- Squier, C. A., Waterhouse, J. P.: Lysosomes in oral epithelium; the ultrastructural localization of acid phosphatase and nonspecific esterase in keratinized oral epithelium in man and rat. Archs. oral Biol. **15**, 153—168 (1970)
- Stacher, A., Lutz, D.: In-vitro-Untersuchungen zur immunsuppressiven Wirkung von Bleomycin und Adriamycin. Wien. klin. Wschr. **86**, 124—127 (1974)
- Susi, F. R.: Light- and electron-microscopic study of acid phosphatase in mouse oral mucosa. Oral Surg. **26**, 824—828 (1968)
- Suzuki, Y., Hisada, K., Hiraki, T., Ando, A.: Clinical evaluation of tumor scanning with <sup>57</sup>Co-bleomycin. Radiology **113**, 139—143 (1974)
- Ugel, A. R.: Keratohyalin: Extraction and in vitro aggregation. Science **166**, 250—251 (1969)
- Umezawa, H.: Chemie und Wirkungsmechanismus von Bleomycin. Vortrag anl. d. Bleomycin-Symp. München 22./23. Nov. 1973
- Umezawa, H.: Chemistry and mechanism of action of bleomycin. Fed. Proc. **33**, 2296—2302 (1974)
- Umezawa, H., Ishizuka, M., Maeda, K., Takeuchi, T.: Studies on bleomycin. Cancer (Philad.) **20**, 891—895 (1967)
- Wachstein, M., Meisel, E.: Histochemistry of the hepatic phosphatases at physiologic pH with special reference to the demonstration of bile canaliculi. Amer. J. clin. Path. **27**, 13—23 (1957)
- Willighagen, R. G. J.: Enzymhistochemie in der Diagnostik maligner Tumoren. Verh. dtsch. Ges. Path. **57**, 81—84 (1973)

A. Burkhardt  
 G. Bommer  
 J.-O. Gebbers  
 Institut für Pathologie  
 der Universität Hamburg  
 D-2000 Hamburg 20  
 Martinstr. 52 (UKE)  
 Bundesrepublik Deutschland

W.-J. Höltje  
 Chirurgische Abteilung (Nordwestdeutsche  
 Kieferklinik) der Universitätsklinik für  
 Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten der  
 Universität Hamburg  
 D-2000 Hamburg 20  
 Martinstr. 52 (UKE)  
 Bundesrepublik Deutschland