

Aus dem Max Planck-Institut für Hirnforschung, Abteilung für Tumorforschung und experimentelle Pathologie und der Neurochirurgischen Universitätsklinik Köln
(Direktor: Prof. Dr. W. TÖNNIS)

Fermenthistochemische Untersuchungen an Meningiomen * **

Von
H. NASU

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 8. Juli 1963)

Über das Vorkommen der histochemisch nachweisbaren Fermente — besonders hydrolytischer — in den Meningiomen liegen bereits Arbeiten von LANDOW et al. (1942), WOLF et al. (1943), FRIEDE (1956), BÜTTGER (1957), BÜTTGER et al. (1957), FEIGIN u. WOLF (1959) und UDVARHELYI et al. (1961) vor. Das biologische Verhalten dieser Enzyme im Meningiom ist aber noch nicht eindeutig geklärt. Es wurde daher bei einer großen Anzahl dieses Blastoms eine systematische Untersuchung vorgenommen, die sich neben hydrolytischen auch mit mehreren oxydativen Enzymen und Phosphorylasen befassen.

Material und Methodik

Es standen uns insgesamt 58 Meningiome zur Verfügung, von denen 39 von weiblichen und 19 von männlichen Patienten stammten; das Verhältnis weiblich zu männlich betrug 2:1. Der jüngste Patient war 7 Jahre alt und der älteste 72 Jahre. Die Lokalisation der Geschwülste: 17 an der Hirnbasis, 26 an der Konvexität des Großhirns und 15 spinal. Es darf gleich vorweggenommen werden, daß weder die Lokalisation noch das Alter noch das Geschlecht einen Einfluß auf den Ausfall der Nachweisreaktionen gehabt haben.

Zur enzymatischen Untersuchung wurden die kleinen Tumorstücke stets sofort nach der operativen Entnahme im Kryostaten 10 μ dick geschnitten und mit folgenden Methoden weiter behandelt.

Nachweis der alkalischen Phosphatase: 1. Calcium-Kobalt-Methode nach GOMORI (1946). Na- β -glycerophosphat als Substrat, Echtblausalz B und Variaminblausalz B (GÖSSNER 1958) als Kupplungspartner.

Nachweis der sauren Phosphatase: 1. Bleiphosphat-Methode nach GOMORI (1950), Na- β -glycerophosphat als Substrat. 2. Kupplungsreaktion nach GROGG u. PEARSE (1952). Na- α -naphthylphosphat als Substrat; Diazoniumsalze, Echtblausalz B und Echtrotsalz ITR (GÖSSNER 1958).

Nachweis der unspezifischen Esterase: Kupplungsreaktion mit Kombination von β -Naphthylacetat und Echtblausalz B; α -Naphthylacetat und Viriaminblausalz B, Echtblausalz B und Echtblausalz BB (NASU 1961).

* Herrn Prof. Dr. W. TÖNNIS zum 65. Geburtstag gewidmet.

** Durchgeführt mit dankenswerter Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Nachweis der oxydativen Enzyme (Tetrazolium-Reductase): DPNH¹, TPNH, Na-Lactat (DPN), L-Äpfelsäure (DPN), Na-L-glutamat (DPN), Äthylalkohol (DPN) Na-DL-isocitrat (DPN und TPN), Na-succinat (mit und ohne Menadion) als Substrat; Tetrazoliumsalze, Nitro-BT und MTT (NACHLAS et al. 1957; PEARSE 1957; NASU et al. 1962).

Nachweis der Phosphorylase und Transglykosylase: 1. Polysaccharid erzeugend; Sichtbarmachung durch Jod und PAS (TAKEUCHI u. KURIAKI 1955; TAKEUCHI 1958; GUHA u. WEGMANN 1961; MÜLLER u. NASU 1962). 2. Phosphat spaltend; Bleiphosphat-Methode nach v. DEIMLING et al. (1960).

Neben nativen Kryostatschnitten wurden für die Metallion-Methoden (alkalische und saure Phosphatase sowie Phosphorylase nach v. DEIMLING et al.) noch Formol-fixierte (Formol, 1:1, gepuffert neutral, 4°C), für den Phosphorylase-Nachweis (erste, polysaccharid-erzeugende Methode) auch Äthanol-(100%, -20°C)-fixierte (MÜLLER u. NASU 1962) Kryostatschnitte verwendet.

Kontrollschnitte: 1. Einstellen ohne Substrat, 2. Bebrütung ohne Cofactor (Coenzyme für Dehydrogenasen; Glykogen, AMP, ATP für Phosphorylase). 3. Mit spezifischen Inhibitoren (NaF für saure Phosphatase), 4. Inaktivierung durch Hitze.

Befunde

Die Kontrollschnitte blieben bei fast allen Enzymreaktionen negativ; positive Fälle werden an entsprechender Stelle erwähnt.

Alkalische Phosphatase (43 Fälle)

Die Ergebnisse der beiden durchgeführten Methoden stimmten lediglich mit Ausnahme der Kernbefunde miteinander überein (siehe unten). Obwohl die meisten Meningiome eine hohe Aktivität dieses Ferments enthalten, sind die Befunde in den einzelnen Tumoren nicht einheitlich. Hier sind im wesentlichen drei Reaktionstypen zu unterscheiden: das ganze Parenchym positiv (A); teilweise positiv (B); völlig negativ (C).

Von 15 untersuchten endotheliomatösen Fällen lassen 10 eine mäßig bis stark positive Reaktion im ganzen Parenchym erkennen (A). Sie ist häufig an den zwiebelschalenförmig angeordneten Zellnestern verstärkt (siehe unten beim Psammom). Die Reaktionsprodukte erscheinen meist im ganzen Cytoplasma gleichmäßig verteilt (Abb. 1a). Mit stärkerer Vergrößerung erkennt man aber gelegentlich ihre feinfasrige Anordnung. In einigen Tumoren sind sie hauptsächlich in der Zellperipherie anzutreffen, wobei sie scheinbar an der Zellgrenze zu Faserbündeln zusammenfließen und als Ganzes ein Netzwerk bilden. In der Mitte der Maschen sieht man außerdem runde bzw. ovale positive Gebilde. Nach den gegengefärbten Präparaten handelt es sich hierbei nicht um Kerne, sondern anscheinend um Golgi-Felder. Die Kerne sind bei der Kupplungsreaktion stets negativ. Bei der Ca-Co-Methode — vor allem an den formolfixierten Präparaten — ergab sich dagegen eine Kernfärbung, die meist in der Umgebung der intensiv positiven Stellen zu beobachten ist. Im Karyoplasma befinden sich neben einem deutlich geschwärzten Nucleolus noch unregelmäßig große positive Granula, die aber kleiner als die Nucleoli sind. Über die Befunde der sogenannten Kernvacuolen wird in einer weiteren Arbeit berichtet. Im Vergleich zum Parenchym reagieren die Gefäße meist nur sehr schwach positiv oder völlig negativ. Die Reaktion beschränkt sich in jedem Fall auf das Endothel. Die Tumorzellen in der Gefäßumgebung erscheinen gelegentlich stärker als die übrigen.

Bei den 5 übrigen Geschwülsten handelt es sich um regressiv — meist cystisch — veränderte Meningiome (2 davon enthalten mehrere Mitosen). Sie zeigen im Gegensatz zu den obigen 10 nur zum Teil positive Partien, die aus inselartig oder um die Gefäße angesammelten Parenchymzellen bestehen (B). Die übrigen Bezirke, auch wenn sie mit üblichen histologischen

¹ Folgende Abkürzungen wurden verwendet: DPN = oxydiertes, DPNH = reduziertes Diphosphopyridinnucleotid; TPN = oxydiertes, TPNH = reduziertes Triphosphopyridinnucleotid; DPNH-D, TPNH-D = Di, Triphosphopyridinnucleotid-Diaphorase; LDH = Lactat-Dehydrogenase; MDH = Malat-Dehydrogenase; GDH = Glutamat-Dehydrogenase; IDH = Isocitrat-Dehydrogenase; ADH = Alkohol-Dehydrogenase; SDH = Succinodehydrogenase; AMP = Adenosinmonophosphat; ATP = Adosintriphosphat; G-1-P = Glucose-1-Phosphat.

Methoden noch keine Veränderung zeigen, bleiben völlig negativ. Die Gefäße treten meist durch ihre deutliche Endothelimpregnation aus dem negativen Parenchym hervor.

In den 17 fibromatösen Meningiomen zeigten 15 eine äußerst stark positive Reaktion (A), die bereits makroskopisch viel intensiver als in den endotheliomatösen erscheint. Sie ist in erster Linie an den deutlich ausgebildeten Fasern zu finden und ihre Intensität läuft etwa dem Reichtum an Fasern parallel (Abb.1b). Während die Kollagenfasern selbst keine Aktivität

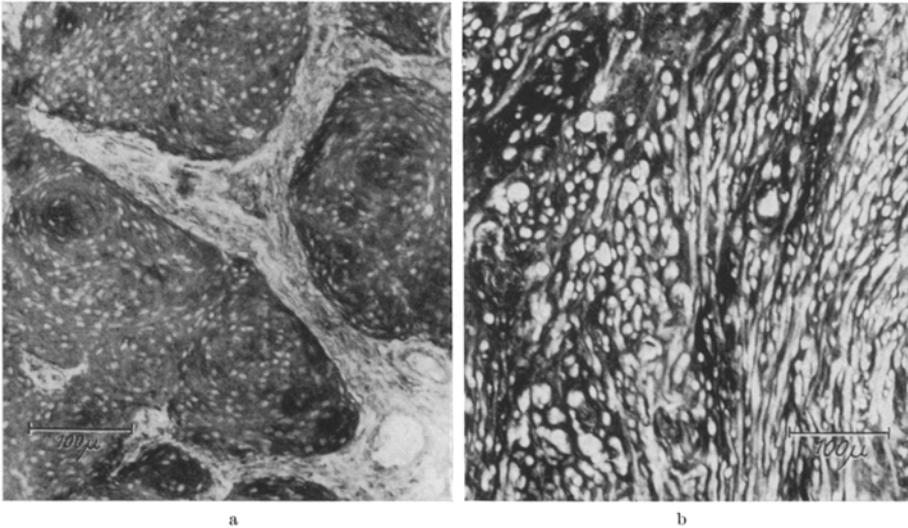


Abb.1 a und b. Alkalische Phosphatase (Kupplungsmethode) ohne Gegenfärbung. a Path.-Nr. 9171, endotheliomatös. Positive Reaktion im Parenchym, Gefäße (rechts unten) negativ. b Path.-Nr. 8262, fibromatös. Intensiv positive Reaktion an Fasern

erkennen lassen, sind die ihnen unmittelbar anliegenden Fasern stark imprägniert. Die Tumorzellen und Gefäße verhalten sich wie beim Reaktionstyp A im endotheliomatösen Meningiom. Von den 2 übrigen Tumoren ist einer stark verfettet, beim anderen ist es sowohl zu Cystenbildung als auch zu Verkalkung gekommen. Die positive Enzymreaktion ist beim ersteren lediglich in den noch nicht verfetteten Partien, beim letzteren in den Tumorzellen um die Verkalkung nachzuweisen (B).

Wie bereits erwähnt, trifft man häufig eine intensivere Imprägnation in den

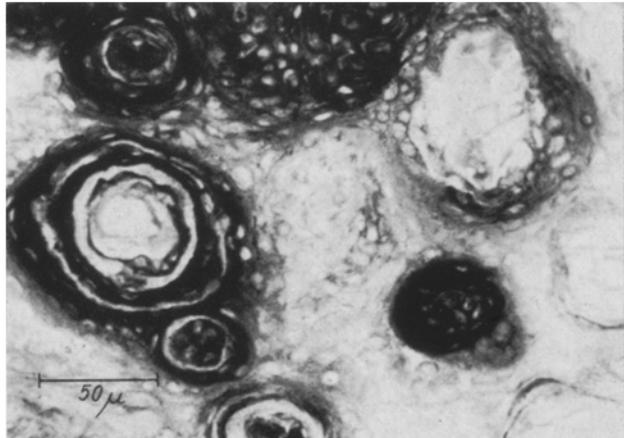


Abb. 2. Path.-Nr. 9158, vorwiegend fibromatös. Alkalische Phosphatase (Kupplungsmethode) ohne Gegenfärbung. In Schichten reagierende Psammome. Am rechten unteren Bildrand sieht man Kalkkugeln, deren Umgebung negativ ist

konzentrisch bzw. zwiebelschalenartig angeordneten Tumorzellen als in den übrigen. Ist es in dieser Architektur zu einer hyalinen Umwandlung oder als Psammom beschriebenen Verkalkung gekommen, so bieten sie folgendes Bild: die hyaline Substanz und Verkalkung selbst bleiben enzymatisch völlig negativ, von dem negativen Zentrum (Verkalkung) nach außen wechseln die negativen und positiven Schichten einander ab (Abb.2). Die Zellen um die

Psammome erscheinen meist stärker imprägniert als die übrigen, was jedoch für die weit fortgeschrittenen Verkalkungen nicht mehr zutrifft.

In einem sogenannten angiomatösen Tumor reagieren hauptsächlich die Gefäßendothelien stark, Abgesehen von den Zellen, die die Gefäße umgeben, zeigt sich keine Aktivität im Parenchym (C).

Nach dem Verhalten der alkalischen Phosphatase nehmen die 10 restlichen Meningiome (6 Rezidive vom endotheliomatösen Typ, 1 stark regressiv verändertes fibromatöses, 2 als rasch wachsend bezeichnete und 1 sarkomatös entartetes) eine Sonderstellung ein: das Endothel der Gefäße ist zwar ziemlich stark imprägniert, aber im Parenchym lassen sie jede positive Reaktion vermissen (C). Nur selten trifft man in den Zellen, die unmittelbar an die stark reagierenden Gefäße grenzen, eine schwache Anfärbung an. Alle diese Geschwülste weichen nicht nur enzymatisch, sondern auch histologisch durch den Reichtum an Mitosen und die Zellpolymorphie von den oben beschriebenen ab, ohne daß man etwa von Sarkomen sprechen könnte.

Natürlich sind zwischen den eingangs bezeichneten Reaktionstypen (A, B, C) Übergangsformen verschiedenen Grades zu finden, Sicher ist jedoch, daß zwischen den Zeichen raschen Wachstums und regressiver Veränderungen mit dem negativen Ausfall der alkalischen Phosphatasereaktion ein enger Zusammenhang besteht. Dagegen findet sich beim Verkalkungsprozeß meist ein umgekehrtes Verhältnis. In den 16 Tumoren, die zu den Reaktionstypen B und C gehören und keine oder spärliche alkalische Phosphatase enthalten, kam nie Verkalkung vor. Unter dem Typ B sind zwar 2 fibromatöse Tumoren verkalkt, aber die positive Reaktion ist hier lediglich auf die Partien um die Verkalkung beschränkt. Von den 25 Meningiomen (Typ A) sind 16 verkalkt. Daraus ist zu entnehmen: wenn ein Tumor verkalkt ist, enthält er stets alkalische Phosphatase, in den enzymatisch negativen Tumoren kommt keine Verkalkung vor.

Saure Phosphatase (35 Fälle)

Zunächst beschreiben wir die Befunde der formol-fixierten Präparate bei der Bleiphosphat-Methode. Im Gegensatz zur alkalischen Phosphatase sind hier kaum eindeutig klassifizierbare Reaktionsunterschiede zu finden. In den meisten endotheliomatösen (8 Fälle) und fibromatösen

(13 Fälle) Tumoren fallen sofort die Kerne der Parenchymzellen durch ihre granuläre Imprägnation ins Auge, die am ehesten dem Chromatin entspricht. Die Kernmembran und Nucleoli sind nicht deutlich dargestellt. Das Cytoplasma färbt sich schwach diffus an, dabei ist die perinucleare Zone meist hell geblieben, so daß die Kernkonturen scharf hervortreten. Mit stärkerer Vergrößerung findet man außerdem gelegentlich eine positive Reaktion in granulärer Form (Lysosomen?), über deren Lokalisation sich aber lichtmikroskopisch nichts Genaueres aussagen läßt (vgl. DE DUVE 1963). Im fibromatösen Meningiom sind die Fasern zwar angefärbt; auch wenn sie reichlich vorhanden sind, treten sie aber nicht so deutlich hervor wie beim Nachweis der alkalischen Phosphatase. Ebenso

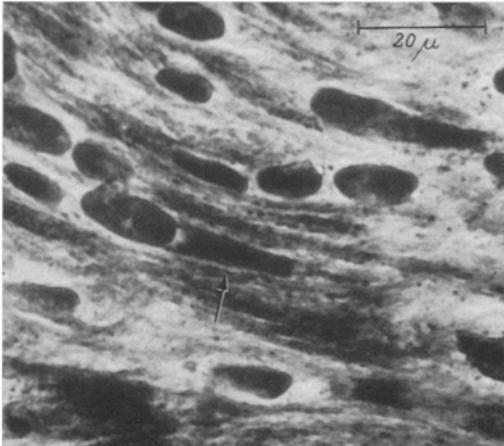


Abb. 3. Path.-Nr. 8141, fibromatös. Saure Phosphatase (Pb-phosphat-Methode). In Nähe der Kernpole starke Imprägnation (↑)

wenig sieht man eine auffällige Aktivitätsvermehrung in der zwiebelschalenförmigen Architektur und in der Psammomumgebung. Die Psammome selbst zeigen eine intensive Imprägnation, die aber durch eine unspezifische Reaktion zustande gekommen ist. Die Gefäße bleiben meist fast negativ. In wenigen Tumoren reagieren aber einige Stromazellen um die Gefäße stark.

Die oben beschriebenen Befunde treffen auch in einem angiomatösen, in den 4 regressiv veränderten sowie 9 rasch wachsenden Tumoren zu, obwohl die Reaktion hier schwächer als in den übrigen auftritt. Noch zu erwähnen ist, daß nur ein ausgesprochen regressiv verändertes fibromatöses Meningiom von den anderen stark abweicht: im Cytoplasma findet sich eine intensive Imprägnation, die meist an den Polen der länglich geformten Kerne zu finden ist (Abb. 3). Auch die Fasern sind hier etwas stärker angefärbt. Bei der Kupplungsmethode ist der Kern im Gegensatz zur Bleiphosphat-Methode stets negativ. Die Befunde des Cytoplasmas entsprechen den oben beschriebenen.

Die Diskrepanz bei den Kernbefunden zwischen Metallion- und Kupplungsmethode für alkalische und saure Phosphatase ist hinsichtlich ihrer Enzymspezifität vorläufig nicht eindeutig zu erklären.

Unspezifische Esterase (36 Fälle)

ist im Meningiom sehr schwach, vor allem in fast allen fibromatösen 18 Fällen sieht man nur spärlich Reaktionsgranula im Parenchym. Jedoch in der Hälfte der 11 endotheliomatösen und der 7 Rezidiv- bzw. rasch wachsenden Tumoren tritt sie etwas stärker auf. Die zwiebelschalenförmigen Zellarrangements und Schichtkörper bieten keine Besonderheiten. Nur vereinzelt kommen stark positive Zellen vor, die sich häufig zwischen Parenchym und Stroma befinden. Die Reaktionsgranula sind meist im Cytoplasma gleichmäßig verteilt. Der Kern bleibt in jedem Fall negativ. Die Gefäße zeigen ebenso keine Reaktion. Nur in wenigen Fällen sind um die Gefäße einige stark positive Zellen festzustellen.

Oxydative Enzyme (40 Fälle)

Das Verteilungsmuster der Aktivität im Parenchym ist bei allen untersuchten Enzymen gleich. Unterschiedlich war lediglich die Intensität der Reaktion, deren Abnahme in den meisten Fällen folgender Reihe entspricht: DPNH-D, TPNH-D, LDH, IDH-DPN, MDH, GDH, SDH, IDH-TPN und ADH. Besonders die letzten drei Fermente kommen sehr schwach

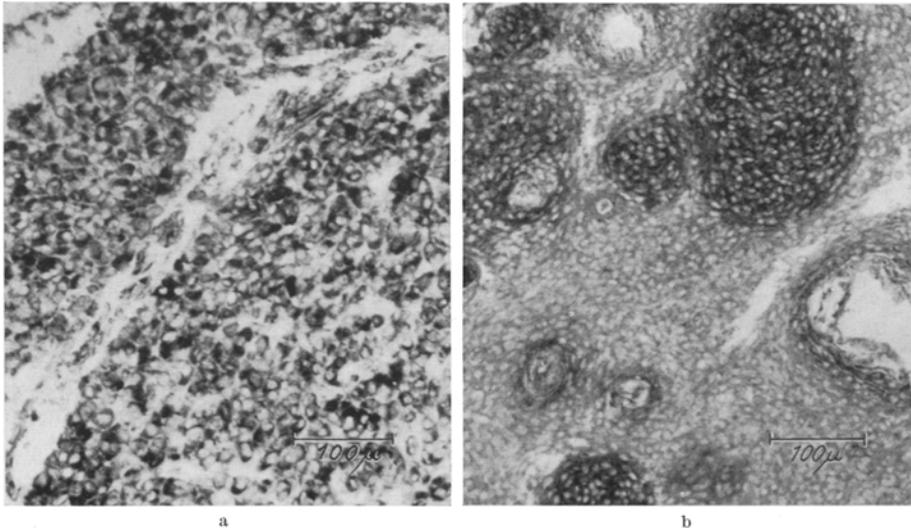


Abb. 4. a Path.-Nr. 9003, rasch wachsend. LDH (Nitro-BT), ohne Gegenfärbung. Die Meningiom-typische Architektur ist noch zu erkennen. b Path.-Nr. 8878, endotheliomatös. TPNH-D (Nitro-BT), ohne Gegenfärbung. Stärker reagierende Zellinseln

vor, sie fehlen sogar in mehreren Tumoren vollkommen. Die Inkubation nur mit Coenzymen (DPN, TPN) läßt gelegentlich auch eine schwache Anfärbung erkennen. Abgesehen von der Form der gebildeten Formazane ergeben die Nitro-BT- und MTT-Methode im wesentlichen identische Bilder (siehe unten) (Abb. 4a und b).

Im folgenden beschreiben wir nur die Befunde beim Nachweis der LDH. Die meisten Meningiome zeigen eine mäßig stark positive Reaktion. Obwohl man sich hier keine absolut quantitative Aussage erlauben kann, reagieren 7 Rezidiv- bzw. rasch wachsende Tumoren stärker als die übrigen. Die positive Reaktion ist meist in allen Tumorzellen gleichmäßig stark nachzuweisen. Nur in 2 Fällen findet sich eine etwas reichlichere Formazanbildung an Zellinseln, die meist von den Gefäßen entfernt liegen. Am Rande der Cysten und Nekrosen sieht man gelegentlich auch etwas vermehrte Reaktionsgranula, die aber zum Teil artefiziell gebildet worden sind. Die Formazane befinden sich im Cytoplasma nicht gleichmäßig verteilt, sondern sind besonders bei der Nitro-BT-Methode oft perinucleär — teils um den Kern herum, teils kappenartig — lokalisiert (Abb.5). Auch die MTT-Monoformazane sind an den perinuclearen Stellen dichter angesammelt als in den übrigen Cytoplasma-Anteilen, dies fällt aber wegen ihrer stets gleichmäßig runden Form nicht so deutlich ins Auge wie bei der Nitro-BT-Methode. Etwas schwächer reagieren die Fasern, an denen die Nitro-BT-Diformazane wiederum in ungleich gestalteter Form erscheinen und die MTT-Monoformazane regelmäßig in der Verlaufsrichtung aneinander gereiht sind. Der Kern bleibt negativ.

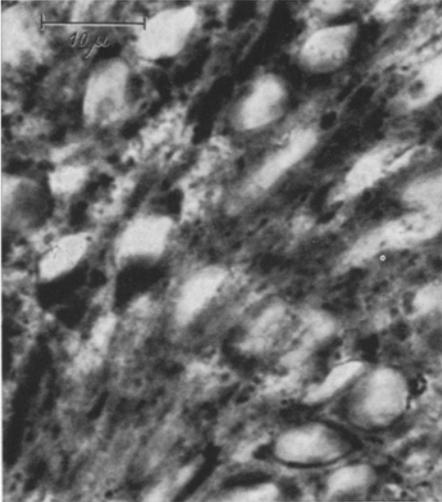


Abb. 5. Path.-Nr. 9346, fibromatös, LDH (Nitro-BT), ohne Gegenfärbung. Unregelmäßig perinucleär und an Fasern vorhandene Formazankomplexe

Ist es zur Kollagenfaser-, Cystenbildung und Nekrose gekommen, so finden sich keine positiven Reaktionen. Die Befunde der Psammomkörper entsprechen den bei der Darstellung der alkalischen Phosphatase beschriebenen. Die Gefäße sind beim Nachweis der DPN- und TPN-gebundenen Fermente meist deutlich dargestellt; besonders in einem angiomatösen Meningiom treten sie viel stärker auf als die Tumorzellen. Jedoch ist die Aktivität der SDH nie in den Gefäßen festzustellen.

Phosphorylase (27 Fälle)

Das beste Resultat zur Darstellung der gesamten Phosphorylase (a und b sowie Transglykolyase) erzielten wir mit der von uns angegebenen Methode (MÜLLER u. NASU 1962).

Die von TAKEUCHI (1958) angegebene Methode, die zur Differenzierung zwischen Phosphorylase und Transglykolyase dienen soll, erbrachte keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Wird Äthanol der Inkubationslösung zugefügt, so sind zwar die Reaktionsprodukte (Amylose-Typ) mit Jod-Lösung blau dargestellt — ohne Äthanol sind sie (Amylopectin-Glykogen-Typ) bräunlich-violett. Jedoch ist die Lokalisation der beiden gebildeten Polysaccharide identisch. Die beiden Enzyme kommen daher miteinander verknüpft vor. Die Kontrolle ohne Substrat und die präexistenten Polysaccharide (ohne Inkubation) sind mit Jodlösung stets farblos geblieben. Mit PAS sind dagegen die letzteren in manchen Fällen dargestellt.

Im folgenden wird über die Befunde der gesamten Phosphorylase berichtet. Das Meningiom enthält im Vergleich mit den anderen Hirntumoren am reichlichsten dieses Ferment. Sämtliche untersuchten Meningiome zeigten eine positive Reaktion. Sie tritt aber in einem angiomatösen und 6 rasch wachsenden Tumoren viel schwächer auf als in den übrigen. Obwohl sich zwischen den endotheliomatösen und fibromatösen Meningiomen keine deutlichen Unterschiede ergeben, zeigen die endotheliomatösen Partien dreier gemischter Typen eine etwas stärkere Reaktion als die fibromatösen Gebiete (Abb.6).

Die Reaktionsprodukte sind mit Ausnahme der Kernvacuolen auf das Cytoplasma sowie die Fasern beschränkt lokalisiert und erscheinen granulär oder feinfasrig (Abb.6b). Die genauere intracelluläre Lokalisation an bestimmten Strukturen ist hier nicht möglich, da die gebildeten Polysaccharide oft während der Inkubation dislokalisiert werden. Sowohl die

zwiebelschalenförmig angeordneten als auch die um die Psammome angesammelten Zellen fallen gegenüber den übrigen Tumorzellen nicht so deutlich auf wie bei der Darstellung der alkalischen Phosphatase. In den Psammomen selbst sieht man gelegentlich bizarre blau angefärbte Gebilde, deren enzymatische Spezifität vorläufig nicht eindeutig geklärt werden kann. Cystische Areale und Nekrosen zeigen keine Aktivität. Ebenso bleiben die Gefäße negativ. Nur selten trifft man große Gefäße, lediglich deren Muskulatur ist positiv.

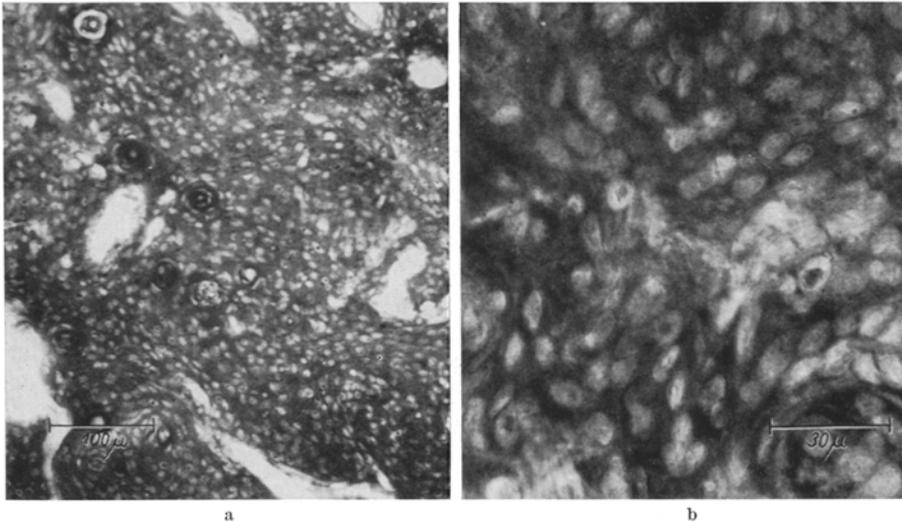


Abb. 6a und b. Path.-Nr. 9191 vorwiegend fibromatös., Phosphorylase (Jod), ohne Gegenfärbung. a Übersichtsbild. Das Parenchym zeigt eine stark positive Reaktion. Gefäße sind völlig negativ. b Bei stärkerer Vergrößerung erkennt man neben positivem Cytoplasma einige positive Kernvacuolen

Auch mit der Methode von v. DEIMLING et al. (1960) konnten wir die oben beschriebenen Befunde untermauern. Jedoch soll die Spezifität dieser Methode für die Phosphorylase noch weiter untersucht werden, da die nur mit AMP (ohne G-1-P) inkubierten Schnitte auch gelegentlich denen mit G-1-P identische Bilder erkennen lassen. Außerdem findet man eine positive Reaktion an den mit der ersten Methode negativ ausgefallenen Partien, z. B. an Gefäßen und bindegewebigen Stroma.

Besprechung der Befunde

In unserer Untersuchungsreihe an Hirntumoren nimmt das Meningiom hinsichtlich seines enzymatischen Verhaltens eine Sonderstellung ein. Zwar sind in diesem Blastom alkalische Phosphatase und Phosphorylase histochemisch reichlicher als in den Gliomen nachzuweisen; das Vorkommen von Esterasen und oxydativen Enzymen hingegen ist weniger ausgeprägt. Zunächst stellen wir unsere Ergebnisse schematisch dar (Tab. 1). Daraus gehen die oben beschriebenen Charakteristica besonders derjenigen Tumoren hervor, die keine rasch wachsenden Zeichen aufweisen und oft verkalkt sind.

Tabelle 1. Schematische Darstellung der Befunde

Meningiomtyp	Verkalkungen	Alkalische Phosphatase	Saure Phosphatase	Esterase	Oxydative Enzyme	Phosphorylase
rasch wachsend bzw. Rezidiv	— ∧	Gefäß — (++) ∧ ∨	+ ~ — ∧	+ ∨	+++ ∨	+ ∧
übrige	+++	+++ (+ —)	+	— ~ +	++	+++

Die biologische Bedeutung der alkalischen Phosphatase im Meningiom ist bereits in den eingangs zitierten Arbeiten vielfach diskutiert worden. LANDOW et al. (1942) haben über eine Korrelation zwischen dem Vorhandensein dieses Ferments und dem Vorkommen der Verkalkung in Meningiomen berichtet. Dies bestätigte auch unsere Untersuchung: *die verkalkten Tumoren enthalten stets alkalische Phosphatase, in den enzymatisch negativen Meningiomen kommt nie Verkalkung vor.*

Die alkalische Phosphatase wurde erstmals von ROBISON (1923) mit dem Verkalkungsprozeß in Zusammenhang gebracht. Nach ihm verbindet sich das durch dieses Ferment abgespaltene Phosphat mit Calciumionen, somit fällt Calciumphosphat aus, das einen wesentlichen Anteil des Kalkapatites bildet. Dieser Mineralisationsmechanismus ist aber in den letzten Jahren kritisiert und in den Hintergrund geschoben worden. SOBEL (1950) und BURGER u. SOBEL (1960) deuteten die Mineralisation als fermentunabhängig, da sie die Verkalkung ohne Inaktivierung der alkalischen Phosphatase hemmen konnten. Nach WALDMAN (1950) geschieht die Verkalkung trotz der Inhibierung dieses Ferments. PRITCHARD (1952) und BOURNE (1956) sehen die Rolle der alkalischen Phosphatase nicht in der Bereitstellung des Phosphates für die Mineralisation, sondern vielmehr in der Bildung der Matrix-Mucopolysaccharide. Inzwischen haben NEUMAN et al. (1951) und FLEISCH u. NEUMAN (1961) der alkalischen Phosphatase eine völlig andere Aufgabe zugeschrieben, nämlich daß sie das Calciumphosphatausscheidung hemmende Polyphosphat abspalte. Über die Bedeutung dieses Ferments beim Verkalkungsprozeß herrschen also verschiedene Meinungen, trotzdem sind genügend Tatsachen vorhanden, auf Grund deren man diesem Enzym eine überragende Rolle bei der Verkalkung zuschreiben muß (HENRICHSEN 1958; DULCE 1960a und b).

Vergleicht man unsere Befunde an den verkalkten Meningiomen mit denen an verknöchernden Geweben, so fallen hier weitgehend übereinstimmende Ergebnisse auf. Die letzteren enthalten ebenfalls reichlich alkalische Phosphatase, Phosphorylase sowie Glykogen und wenig oxydative Enzyme (GUTMAN u. YU 1950; MARKS u. SHORR 1950). Als Substrat für die alkalische Phosphatase spielen die Phosphorsäureester des Plasmas eine untergeordnete Rolle. Der Hauptanteil des Substrates wird vielmehr in den verkalkenden Geweben durch Phosphorylierung des Glykogens (Phosphorylase und glykolytische Enzyme) hergestellt (HOLTZ u. SCHÜTTE 1954). Beim Meningiom kann das reichliche Vorkommen von Glykogen (FRIEDE 1956; BÜTTGER 1959) und Phosphorylase auch in diesen Mechanismus einbezogen werden. Jedoch besagt dies nicht, daß diese beiden Faktoren lediglich dem Verkalkungsprozeß dienen, da sich bei der Darstellung der Phosphorylase keine eindeutig feststellbaren Unterschiede zwischen den verkalkten und nicht verkalkten Tumoren ergaben. FRIEDE (1956) und BÜTTGER (1959) beobachteten weiter beim Meningiom eine enge Beziehung von Glykogen bzw. PAS-positiven Substanzen zu dem Vorkommen der alkalischen Phosphatase. Zu diesem Problem berichten wir in einer weiteren Arbeit.

Wir fanden häufig eine deutliche Aktivitätszunahme der alkalischen Phosphatase in den zwiebelschalenförmig angeordneten Zellen sowie in der Psammomumgebung. Dagegen ist keine positive Reaktion mehr um jene Psammome nachzuweisen, deren Verkalkung weit fortgeschritten ist. Dies läßt uns zu der Auffassung neigen, daß die alkalische Phosphatase bei dem letzten Schritt der Mineralisation (Calciumphosphatausfällung) keine Rolle mehr spielt. Nach GUTMAN u. YU (1950) sind Hexosenester, die durch glykolytische Fermente hergestellt und übertragen werden, bei der Verkalkung als Substrat für die alkalische Phosphatase nicht entscheidend. Sie sahen die Rolle dieses Enzyms nicht nur in der Dephos-

phorylierung sondern auch Transphorylierung, die mit der Bereitstellung von sowohl energiereichen als auch -armen Phosphaten (nicht Hexosenestern) der Bildung des noch unbekanntes Matrix-Eiweißes dienen sollte. Andererseits ist die seit langem bekannte Theorie (FREUDENBERG u. GYÖRGY 1920; ROCHE u. DELTOUR 1943), nach der die Matrix-Phosphat-Bindung der Calciumphosphat-Ausfällung vorangehe, von BOYD u. NEUMAN (1951) erneut unterstützt worden. Auf Grund unserer Ergebnisse kann — wie gesagt — jene einfache Mineralisationstheorie nicht angenommen, sondern lediglich abgeleitet werden, daß diesem Enzym besonders beim Initialstadium der Verkalkung eine überragende Bedeutung zukommt, sei es für die Matrix-Eiweiß-Bildung, sei es für die Matrix-Phosphat-Bindung. Zu der Auffassung von NEUMAN u. Mitarb. (l. c.), daß die Phosphatase das die Verkalkung hemmende Polyphosphat abspalte, können wir vorläufig keine Stellung nehmen, da die von uns untersuchte Phosphatase Monophosphatase war. Saure Phosphatase, Esterasen und oxydative Enzyme spielen wahrscheinlich bei der Verkalkung keine wichtige Rolle.

Unsere Untersuchung führte weiterhin zu einem auffälligen Befund. Eine Gruppe von Meningiomen, die durch Mitosenreichtum und Zellpolymorphie als „rasch wachsend“ bezeichnet werden kann, weicht auch enzymatisch von den übrigen stark ab: sie läßt keine Aktivität der alkalischen Phosphatase erkennen, Phosphorylase und saure Phosphatase kommen weniger vor. Dagegen sind Esterasen und oxydative Enzyme reichlicher zu finden. FEIGIN u. WOLF (1959) berichteten auch über ein malignes Meningiom, das kaum alkalische Phosphatase nachweisen ließ. BÜTTGER et al. (1957) beschrieben aber einen umgekehrten Befund: ein rasch wachsendes Meningiom zeigte alkalische Phosphatase reichlicher als die übrigen. Aus unseren Ergebnissen konnten wir dies nicht bestätigen.

Die erhöhte Aktivität der oxydativen Enzyme kann anscheinend als Ausdruck der Stoffwechselsteigerung, die mit dem raschen Wachstum zusammenhängt, angesehen werden. Dagegen ist es schwierig zu entscheiden, ob der Wegfall der Alkalische-Phosphatase-Aktivität mehr mit dem raschen Zellwachstum oder mehr mit dem Nicht-Vorhandensein der Verkalkung in Zusammenhang gebracht werden kann, da keiner dieser Tumoren verkalkt ist. Es muß daher weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben, zu einer völligen Aufklärung dieser charakteristischen Ergebnisse der rasch wachsenden Meningiome zu gelangen. Wir möchten hier lediglich dieser Gruppe von Meningiomen sowohl nach histologischem Befund als auch nach enzymatischem Verhalten eine Sonderstellung zuweisen und damit einen Anlaß zur Klärung der malignen Entartung dieses Blastoms geben.

Zusammenfassung

1. Es wird über den histochemischen Nachweis von alkalischer und saurer Phosphatase, unspezifischer Esterase, mehreren oxydativen Enzymen sowie Phosphorylase an 58 Meningiomen berichtet.

2. Im allgemeinen enthält das Meningiom alkalische Phosphatase und Phosphorylase reichlich, mäßig oxydative Enzyme und saure Phosphatase. Esterase ist nur spärlich nachzuweisen.

3. Es besteht ein enger Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein der alkalischen Phosphatase und dem Vorkommen der Verkalkung. Die Rolle dieses Enzyms beim Verkalkungsprozeß wird diskutiert.

4. Eine Gruppe von Meningiomen, die als „rasch wachsend“ bezeichnet wird, verhält sich enzymatisch stark abweichend von den übrigen. Die Tumorzellen dieser Gruppe zeigen keine Aktivität der alkalischen Phosphatase, weniger Phosphorylase und saure Phosphatase. Esterase und oxydative Enzyme kommen dagegen reichlicher vor.

Summary

1. Fifty-eight meningiomas were studied histochemically for the activity of alkaline and acid phosphatase, unspecific esterase, a number of oxidative enzymes and phosphorylase.

2. The meningiomas in general contain rich alkaline phosphatase and phosphorylase, moderate oxidative enzymes and acid phosphatase. Esterase is demonstrated only sparsely.

3. There was a close correlation between the appearance of alkaline phosphatase and the presence of calcification. The role of this enzyme in the process of the calcification is discussed.

4. A group of meningiomas, which is signed as “rapidly growing”, reveals an enzymatic pattern strikingly different from the others. The tumorcells of this group show no alkaline phosphatase, less phosphorylase and acid phosphatase. On the contrary, the activity of esterase and oxidative enzymes is stronger.

Literatur

- BOURNE, H. G.: The Biochemistry and Physiology of Bone. New York: Acad. Press Inc. Publ. 1956.
- BOYD, E. S., and W. F. NEUMAN: The surface chemistry of bone. V. The ion-binding properties of cartilage. *J. biol. Chem.* **193**, 243—251 (1951).
- BÜTTGER, H. W.: Untersuchung über die histochemisch nachweisbare saure und alkalische Phosphatase in Tumoren des Zentralnervensystems und seiner Häute. Inaug.-Dissertation. Köln 1957.
- Beiträge zur Histochemie der Hirntumoren. II. Mitteilung: Über PAS-positive Substanzen in Meningiomen. *Zbl. Neurochir.* **19**, 117—125 (1959).
- G. SCARLATO, W. MÜLLER u. D. KEMALI: Über das Vorkommen und die Verteilung der alkalischen und sauren Phosphatase in Meningeomen. *Dtsch. Z. Nervenheilk.* **176**, 67—76 (1957).
- BURGER, M., and A. E. SOBEL: Calcification in vitro and phosphatase activity. *J. Bone Jt Surg.* **42B**, 137—141 (1960).
- DEIMLING, O. v., E. MÖLBERT u. F. DUSPIVA: Elektronenmikroskopischer Nachweis eines Glukose-1-phosphat spaltenden Enzyms im Herzmuskel der Albinoratte. *Beitr. path. Anat.* **123**, 127—143 (1960).
- DULCE, H.-J.: Zur Biochemie der Verknöcherung. II. Enzymaktivitäten im hyalinen Knorpel, im verknöchernenden Knorpel und im Knochen. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **319**, 272—278 (1960a).
- Zur Biochemie der Verknöcherung. III. Mineralgehalt, Grundsubstanzzusammensetzung und Enzymaktivitäten im Callusgewebe und in rachitischen Knochen von Ratten. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **320**, 1—10 (1960b).
- DE DUVE, C.: Structure and functions of lysosomes. Funktionelle und morphologische Organisation der Zelle, p. 209—218. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1963.
- FEIGEN, I., and A. WOLF: The alkaline phosphomonoesterase activities of brain tumors. *Arch. Path.* **67**, 670—678 (1959).
- FLEISCH, H., u. W. NEUMAN: Die Rolle der Phosphatase und der Polyphosphate bei der Kalzifikation von Kollagen. *Helv. physiol. pharmacol. Acta* **19**, C17—C18 (1961).
- FREUDENBERG, E., u. P. GYÖRGY: Über Kalkbindung durch tierische Gewebe. I. *Biochem. Z.* **110**, 299—305 (1920).
- FRIEDE, R.: Über Glykogen und alkalische Phosphatase in Hirntumoren und ihre biologische Bedeutung. *Virchows Arch. path. Anat.* **328**, 469—480 (1956).

- GÖSSNER, W.: Histochemischer Nachweis hydrolytischer Enzyme mit Hilfe der Azofarbstoffmethode. Untersuchungen zur Methodik und vergleichenden Histotopik der Esterasen und Phosphatasen bei Wirbeltieren. *Histochem.* **1**, 48—96 (1958).
- GOMORI, G.: (1946), (1950); zit. bei PEARSE (1960).
- GROGG, E., and A. G. E. PEARSE: (1952); zit. bei PEARSE (1960).
- GUHA, S., and R. WEGMANN: Phosphorylase in chick-embryo liver. *J. Histochem. Cytochem.* **9**, 454—455 (1961).
- GUTMAN, A. B., and T. F. YU: A concept of the role of enzymes in endochondrial calcification. In: *Metabolic Interrelations, Transaction of the second conference*, p. 167—190 (Edt. REIFENSTEIN, E. C., jr.). New York: Josiah Mary Jr. Found. 1950.
- HENRICHSEN, E.: Alkaline phosphatase and calcification: Histochemical investigations on the relationship between alkaline phosphatase and calcification. Copenhagen: Ejnar Munksgaard 1958.
- HOLTZ, FR., u. E. SCHÜTTE: Knochengewebe und Verkalkung. In: *Physiologische Chemie. II/1 a*, S. 700—723. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1954.
- LANDOW, H., E. A. KABAT, and W. NEWMAN: Distribution of alkaline phosphatase in normal and in neoplastic tissues of the nervous system. *Arch. Neurol. Psychiat. (Chic.)* **48**, 518—530 (1942).
- MARKS, P. A., and E. SHORR: Factors which regulate the deposition of calcium and strontium in rachitic cartilage in vitro. In: *Metabolic Interrelations. Transaction of the second conference*, p. 191—202 (Edt. REIFENSTEIN, E. C., jr.). New York: Josiah Mary Jr. Found. 1950.
- MÜLLER, W., u. H. NASU: Zur Methodik des Phosphorylase- und Transglucosylase-Nachweises an Hirngewebe. Vortrag VIII. Symposium d. Arbeitsgem. Histochemie, Wien 1962. *Acta histochem. (Jena) Suppl. IV* (im Druck).
- NACHLAS, M. M., K.-C. TSOU, E. DESOUSA, C.-S. CHANG, and A. M. SELIGMAN: Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. *J. Histochem. Cytochem.* **5**, 420—436 (1957).
- NASU, H.: Über den histochemischen Nachweis hydrolytischer Enzyme im Kraniopharyngiom. Frankfurt. *Z. Path.* **71**, 182—190 (1961).
- G. A. APPONI u. G. L. VIALE: Histochemische Untersuchungen über oxydative Enzyme in der menschlichen Netzhaut. *Z. Zellforsch.* **56**, 188—196 (1962).
- NEUMAN, W. F., V. DISTEFANO, and B. J. MULRYAN: The surface chemistry of bone. III. Observations on the role of phosphatase. *J. biol. Chem.* **193**, 227—235 (1951).
- PEARSE, A. G. E.: Intracellular localization of dehydrogenase system using monotetrazolium salts and metal chelation of their formazans. *J. Histochem. Cytochem.* **5**, 515—527 (1957).
- *Histochemistry, theoretical and applied. II.* Edt. London: Churchill Ltd. 1960.
- PRITCHARD, J. J.: A cytological and histochemical study of bone and cartilage formation in the rat. *J. Anat. (Lond.)* **86**, 259—277 (1952).
- ROBISON, R.: The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification. *Biochem. J.* **17**, 286—293 (1923).
- ROCHE, J., et G.-H. DELTOUR: Mécanisme de la calcification osseuse et théorie des fixateurs du calcium. *Bull. Acad. Méd. (Paris)* **127**, 488—492 (1943).
- SOBEL, A. E.: The local factor in calcification. In: *Metabolic Interrelations, Transaction of the second conference*, p. 113—143 (Edt. REIFENSTEIN, E. C., jr.). New York: Josiah Mary Jr. Found. 1950.
- TAKEUCHI, T.: Histochemical demonstration of branching enzyme (amylase-1,4-1,6-transglucosidase) in animal tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **6**, 208—216 (1958).
- , and H. KURLAKI: Histochemical detection of phosphorylase in animal tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **3**, 153—160 (1955).
- UDVARHELYI, G. B., J. S. O'CONNOR, A. E. WALKER, E. R. LAWS jr., and S. KRANIN: A histochemical study of tumors of the central nervous system. In: *IV. Internat. Kongr. f. Neuro-path.* I, S. 95—102. Stuttgart: G. Thieme 1962.
- WALDMAN, J.: Effect of inactivation of enzymes on calcification of cartilage in vitro. In: *Metabolic Interrelations, Transaction of the second conference*, p. 203—220. (Edt. REIFENSTEIN, E. C., jr.). New York: Josiah Mary Jr. Found. 1950.
- WOLF, A., E. A. KABAT, and W. NEWMAN: Histochemical studies on tissue enzymes: III. A study of the distribution of acid phosphatases with special reference of the nervous system. *Amer. J. Path.* **19**, 423—439 (1943).