

Enzym- und immunhistochemische Darstellung von Zellen des Mononukleären Phagozytensystems (MPS) bei der Katze

C.K. Hofmann

Zusammenfassung: Mit dem Ziel, Marker für die lichtmikroskopische Darstellung von Zellen des Mononukleären Phagozytensystems (MPS) der Katze zu etablieren, wurden enzym- und immunhistochemische Methoden, die bei Mensch, Ratte und Maus bereits als Makrophagen-Marker eingesetzt werden, an insgesamt acht Katzen getestet und für die Anwendung bei dieser Spezies modifiziert. Ein Vergleich der bekannten physiologischen Gewebeverteilung von Makrophagen mit der in Leber, Lunge, Milz und Lymphknoten gesunder Katzen erhaltenen Markierung ermöglichte die Beurteilung der Marker. Mit der enzymhistochemischen Methode der "simultanen Azokupplung" wurden unspezifische Esterasen mit den Substraten Alpha-Naphthyl-Acetat, Alpha-Naphthyl-Butyrat und Naphthol-AS-Acetat und die saure Phosphatase an Schnitten von in Paraffin und in den Kunststoff GMA eingebetteten Organen der Katze nachgewiesen. Dabei wurden verschiedene Reaktionszeiten, pH-Werte der Reaktionsansätze, Konzentrationen der verwendeten Substrate und Kupplungssubstanzen und bei der sauren Phosphatase zwei unterschiedliche Kupplungssubstanzen getestet und die Verfahren entsprechend der Ergebnisse für die Katze modifiziert. Die Reaktionszeiten wurden bei allen Enzymen im Vergleich zu den bei der Ratte erforderlichen Zeiten stark verlängert, soweit Hintergrundfärbung und Verschmutzungen mit Farbniederschlägen die Erkennung des Reaktionsproduktes nicht zu stark beeinträchtigten. Auch bei längerer Reaktionszeit fielen die mit den Enzymnachweisen erzielten Färbungen in den Kunststoffschnitten von Katzenorganen schwach aus. Relativ am stärksten waren die Reaktionen beim Nachweis der Alpha-Naphthyl-Butyrat-Esterase (ANB) und der sauren Phosphatase (SP). Bei der zum Vergleich herangezogenen Ratte, die bei allen Enzymen deutlich kräftigere Reaktionen besonders der Makrophagen aufwies, ergaben dagegen die Alpha-Naphthyl-Acetat- und die Naphthol-AS-Acetat-Esterase (ANA und NASA) die besten Ergebnisse. Makrophagen zeigten in den Organen der Katzen nur zum Teil eine meist geringe Aktivität der untersuchten Enzyme. Außer ihnen reagierten unter anderem bei den unspezifischen Esterasen häufig die Hepatozyten in der Leber und bei allen Enzymen das Bronchiolusepithel in der Lunge positiv. Bei ANB trat außerdem ein punktförmiges Reaktionsprodukt in wenigen Lymphozyten auf, und SP-positiv reagierten einige interdigitierende Retikulumzellen in den thymusabhängigen Gebieten von Milz und Lymphknoten. Die in ähnlicher Verteilung auftretenden Reaktionen in Paraffinschnitten fielen bei allen Enzymen gegenüber denen in Kunststoffschnitten nochmals deutlich schwächer aus. Aufgrund der schwachen Färbung der Makrophagen und der Verwechslungsmöglichkeit mit Enzym-positiven Zellen, die nicht zum MPS gehören, kann der enzymhistochemische Nachweis der unspezifischen Esterasen sowie der sauren Phosphatase in Kunststoff- und Paraffinschnitten nicht als Markierungsmethode für MPS-Zellen der Katze empfohlen werden. Mit immunhistochemischen Methoden wurden gegen menschliche Makrophagen-Strukturen gerichtete Antikörper auf Kreuzreaktionen bei der Katze untersucht. Dazu wurden an Paraffinschnitten von Leber, Lunge, Milz und Lymphknoten der Katze mit der indirekten Immunperoxidase-Methode und/oder der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode vor allem verschiedene Verdünnungsstufen und Inkubationszeiten des ersten Antikörpers getestet, um die Methoden für die Katze anzupassen. Mit dem Antiserum gegen menschliches Alpha-1-Antichymotrypsin war bei allen getesteten Variationen der immunhistochemischen Methoden in keinem der untersuchten Schnitte von Katzenorganen eine Reaktion zu erzielen. Das Antiserum gegen menschliches Lysozym sowie der Antikörper MAC 387 zeigten Kreuzreaktionen bei der Katze. Mit beiden Antikörpern waren in den Katzenorganen sehr kräftig gefärbte neutrophile Granulozyten neben nur vereinzelt schwach reagierenden Makrophagen zu beobachten. Das Antiserum gegen Lysozym ist also ebenso wie der Antikörper MAC 387 bei der Katze nur zur Markierung von neutrophilen Granulozyten geeignet. Mit dem gegen menschliche MHC Klasse II-Antigene gerichteten Antikörper TAL-1B5 waren ebenfalls Kreuzreaktionen bei der Katze zu erzielen. Positiv reagierten wenige bis einige Makrophagen in allen untersuchten Organen, daneben färbten sich besonders kräftig die Antigen

präsentierenden interdigitierenden Retikulumzellen in Milz und Lymphknoten. Außerdem reagierten die meisten B-Lymphozyten in den Follikeln und einzelne T-Lymphozyten in den thymusabhängigen Gebieten von Milz und Lymphknoten positiv. Da mit dem Antikörper TAL-1B5 nur ein Teil der Makrophagen zu markieren ist und in den lymphatischen Organen die positiven Lymphozyten die Erkennung der Makrophagen erschweren, kann auch dieser Antikörper nicht die Anforderungen an einen Makrophagen-Marker erfüllen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß erhebliche tierartige Unterschiede in der Enzymausstattung und bei Strukturmerkmalen von Makrophagen bestehen, die den Erfolg einer Übertragung auch modifizierter Markierungsmethoden auf eine andere Tierart stark beeinträchtigen können.

Summary: In order to establish cell markers of the mononuclear phagocyte system (MPS) in cats in light microscopy enzyme and immunohistochemical methods, which are known as macrophage markers in humans, rats and mice, were tested on eight cats and appropriately modified for this species. Comparing the results for liver, lung, spleen and lymph node of healthy cats with the physiological tissue distribution of macrophages in these organs made the evaluation of the markers possible. The activity of the nonspecific esterases alpha-naphthyl-acetate-, alpha-naphthyl-butyrate- and naphthol-AS-acetate-esterase (ANA, ANB and NASA) and acid phosphatase (SP) has been demonstrated in paraffin and plastic sections of cat tissues using the simultaneous coupling azo dye method. Varying incubation time, pH of the incubation mixture, substrate and coupling agent concentration as well as testing two different coupling agents for acid phosphatase led to modifications in these methods for this species. As far as background staining and dye precipitations allowed, incubation times have been increased for all enzymes compared to the incubation times necessary for rats. Even after prolonged incubation the staining of plastic sections remained faint. ANB and SP showed only moderately stronger reactions. Strong activity was observed with all enzymes in the rat used as reference. The best results for the rat were obtained with ANA and NASA. Only a part of the macrophages of the cat showed reactions which were mostly weak. Furthermore the liver cells reacted with nonspecific esterases and the bronchiolar epithelium in the lung was stained by all enzyme reactions. Additionally a dot-like reaction product was observed in some lymphocytes with ANB and several interdigitating reticulum cells in the thymus-dependent areas of spleen and lymph nodes were SP positive. The reactions obtained in paraffin sections showing a similar distribution pattern proved to be significantly weaker compared to those in plastic sections. Because of the faint staining of the macrophages and the positive cells which do not belong to the MPS, the enzyme histochemical demonstration of nonspecific esterases and acid phosphatase in plastic and paraffin sections can not be recommended as a marking method for cells of the MPS in cats. Antibodies against human macrophage structures were tested for cross-reactions in cat tissues with immunohistochemical methods. The antibodies were used with the indirect immunoperoxidase procedure and/or the avidin-biotin-peroxidase complex method on paraffin sections of liver, lung, spleen, and lymph node of the cat. Dilution and incubation time of the first antibody were varied in order to adjust these methods to this species. No reactions were obtained in sections of cat tissue with anti-human alpha-1-antichymotrypsin antisera in any tested immunohistochemical procedure. The anti-human lysozyme antisera as well as the antibody MAC 387 showed cross-reactions in cat organs. Here intensely stained neutrophil granulocytes and, just occasionally, weakly reacting macrophages have been demonstrated. Therefore only marking of neutrophil granulocytes seems to be feasible using the anti-human lysozyme antisera and the antibody MAC 387. The anti-human MHC class II-antigen antibody TAL-1B5 has been shown to cross-react with cat MHC class II-antigen. Several macrophages were stained in all examined organs. In spleen and lymph node the antigen presenting interdigitating reticulum cells reacted particularly strongly. Additionally most B-lymphocytes in the follicles and a few T-lymphocytes in the thymus-dependent areas of spleen and lymph node were positive. Since the macrophage population can only partially be stained with the antibody TAL-1B5 and positive lymphocytes in the lymphatic organs make it difficult to identify the macrophages, this antibody cannot meet the requirements for a macrophage marker. These results illustrate considerable species differences in enzyme production and structural characteristics which can hinder the transfer even of modified marking methods between species.