

Institut für Anatomie, Histologie und Embryologie der Medizinischen Universität in Szeged
(Direktor: Prof. A. Gellért.)

DIE UNSPEZIFISCHE ESTERASE-AKTIVITÄT DER SENSORISCHEN UND VEGETATIVEN GANGLIEN*

Gyula Sávay, Bertalan Csillik und Ottília Bondray

(Eingegangen am 7. August 1952)

Das Studium der esterolytischen Fermente ist im Laufe der letzten Jahre auch für die histochemische Forschung zugänglich geworden. Bekanntlich lassen sich diese Enzyme (neben den Phosphatasen und Sulfatasen) in drei Hauptgruppen einteilen: 1. Lipasen, 2. Cholinesterasen, 3. unspezifische Esterasen (Ali-Esterasen). Die Cholinesterasen sind ebenfalls nicht einheitlich: eine ihrer Gruppen katalysiert hauptsächlich die Hydrolyse des Acetylcholins (spezifische Cholinesterase), während die andere Gruppe die übrigen Ester des Cholins abbaut (unspezifische Cholinesterase).

Über die Funktion der *Lipasen* im Nervensystem ist nichts bekannt [4, 11]. Das Vorkommen von *Cholinesterasen* in sensorischen und sympathischen Ganglien mit seiner eigenen Methode untersuchend gelangte *Koelle* [8, 9] zu der Schlussfolgerung, dass jede Cholinesterase die gleiche Funktion besitzt: die spezifische ebenso wie die unspezifische Cholinesterase spielt bei der Bildung und Übertragung des Nervenreizes eine wichtige Rolle. Auffallend ist jedoch, dass nach Ansicht dieses Verfassers die Cholinesterase nicht allein in den sympathischen Ganglien, sondern sozusagen in sämtlichen sensorischen Ganglien vorkommt. Zur Erklärung dieser Erscheinung setzt *Koelle* voraus, dass die Cholinesterase in diesem Fall eine präventive Bedeutung besitzt, insofern sie dazu bestimmt sei, das zwischen den pseudounipolaren Zellen frei werdende Acetylcholin abzubauen. *Nachlas* und *Seligman* berichten über das Vorkommen *unspezifischer Esterasen* im Ganglion coeliacum von Ratten und in den Ganglienzellen im Auerbach-Plexus von Hunden [11].

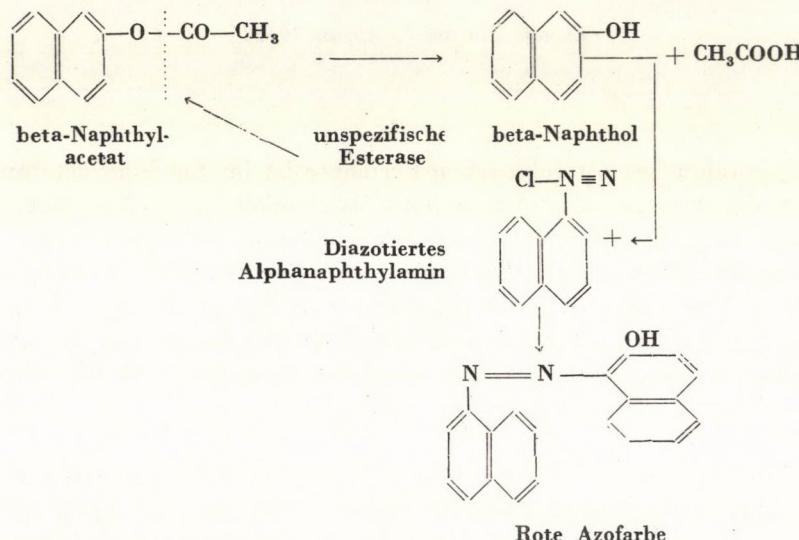
Auf Grund dieser Tatsachen hielten wir es für zweckmäßig, das Vorkommen der unspezifischen Esterasen in den sensorischen und vegetativen Ganglien sowie ihre Funktion einer genaueren Prüfung zu unterziehen.

Die Methode zum Nachweis der unspezifischen Esterase-Aktivität lässt sich im wesentlichen wie folgt zusammenfassen (Einzelheiten siehe *Nachlas* und *Seligman* 10).

In eiskaltem Azeton fixierte Gewebestücke werden nach Paraffineinbettung,

* Diese Arbeit wurde mit Unterstützung der Ungarischen Akademie der Wissenschaften ausgeführt.

Schnitt usw. bei entsprechenden Puffern ($\text{pH} = 7,0-7,2$) in einem Milieu inkubiert, das beta-Naphthylacetat und diazotiertes alpha-Naphthylamin enthält. Während der Inkubation spaltet die unspezifische Esterase das beta-Naphthylacetat, so dass beta-Naphthol frei wird, das mit in der Inkubationslösung befindlichen Diazotat einen in Wasser unlöslichen Azofarbstoff bildet, die am Ort der Enzymaktivität erscheint. D. h.



Im Hinblick auf die Zersetzung der Diazoniumsalze stabilisieren **Nachlas** und **Seligman** das Diazotat mit 1,5-Naphthalin-disulfonat. Aus unseren Untersuchungen geht hervor, dass diese zeitraubende Prozedur überflüssig ist, da sich das Diazotat im Eisschrank praktisch beliebige Zeit ohne Zersetzung aufbewahren lässt. So ist die Herstellung der Inkubationsstoffe wesentlich billiger und einfacher.

Mit Hilfe dieses Verfahrens untersuchten wir die unspezifische Esterase-Aktivität der spinalen und vegetativen Ganglien an Kaninchen, Hunden und Katzen.

In den *spinalen Ganglien des Kaninchens* stellten wir folgendes fest: Die Mehrzahl der spinalen Ganglienzellen sowie sämtliche Nervenfasern und Zellkerne wirken negativ. Unter den negativen Ganglienzellen kommen indessen verstreut eckige (polygonale) Ganglienzellen vor, die gelegentlich kleine Gruppen bilden und eine charakteristische, intensive Reaktion ergeben. Diese positiv reagierenden Ganglienzellen lassen sich auf Grund ihrer Lagerung und Form mit den von *F. Kiss* beschriebenen dunklen (chromophilen) Ganglienzellen identifizieren (7,2). (Abb. 1., 2.)

In den *spinalen Ganglien des Hundes* fanden wir etwas abweichende Verhältnisse. Hier geben nämlich auch die in der Umgebung der positiv reagierenden Ganglienzellen befindlichen perizellulären Formationen eine Reaktion, welche diesen Ganglienzellen ein charakteristisches »eingerahmtes« Äusseres verleiht (Abb. 3).

Die Frage wurde aufgeworfen, ob die Abweichungen, die zwischen der Esterase-Aktivität der spinalen Ganglien von Kaninchen und jener von Hunden festgestellt wurden, nicht etwa mit dem Unterschied beim Töten der Tiere zusammenhängen. Im Verlauf unserer Untersuchungen töteten wir nämlich die Kaninchen durch Verblutung, die Hunde dagegen mit Aether- bzw. Chloroform-Narkose. Deshalb untersuchten wir auch die spinalen Ganglien der in Chloroform-Narkose aufgeopferten Kaninchen sowie der durch Luftembolie getöteten und verbluteten Hunde. Eine Abweichung von den früheren Befunden wurde nicht festgestellt, so dass die Annahme, dass die bei Hunden beobachteten perizellulären Formationen durch die Narkosewirkung zustande kämen, verworfen werden muss. Eine Erklärung dieses Befundes vermögen wir vorläufig nicht zu geben.

An vegetativen Ganglien stellten wir folgendes fest:

Ganglion coeliacum. Die Bindegewebekapsel des Ganglions ergibt eine schwache Reaktion. Sämtliche Ganglienzellen weisen Esterase-Aktivität auf, jedoch ist diese in den einzelnen Zellen nicht von gleicher Intensität. Von wenigen Ausnahmen abgesehen, reagieren sämtliche Ganglienzellen nicht derart intensiv wie die chromophilen Zellen der spinalen Ganglien. Die Zellkerne sind negativ. Im Ganglion ergibt auch der Interzellularraum die Reaktion. Mit starker Vergrösserung untersucht, lässt sich feststellen, dass im Interzellularraum die Positivität der Reaktion von den marklosen Nervenfasern verursacht wird. (Abb. 4). Während der grösste Teil des Ganglions lediglich mittelmässig intensiv reagiert, kommen in isoliert gelagerten mikroskopischen Ganglien auch Zellen vor, deren Esterase-Aktivität derjenigen der chromophilen Zellen der spinalen Ganglien nahekommt.

Die Ganglienzellen des *Auerbach'schen Plexus* zeigen in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von *Nachlas* und *Seligman* eine intensive Esterase Aktivität.

Das *Ganglion stellatum* und die *Ganglien des sympathischen Grenzstranges* weisen ein dem Ganglion coeliacum entsprechendes Bild auf, mit dem Unterschied, dass wir in ihrer Umgebung keine Mikroganglien mit ähnlich intensiver Reaktion feststellen konnten, wie wir sie neben dem Ganglion coeliacum beobachteten.

Das *Ganglion oticum* wurde zusammen mit einem kleinen Stückchen des *N. mandibularis* und des *Gasser'schen Ganglions* herausgenommen. Die Ganglienzellen des Ganglion oticum reagieren mit derselben Intensität wie die übrigen vegetativen Ganglien. Das *Gasser'sche Ganglion* bietet dasselbe Bild wie die spinalen Ganglien.

Das *Ganglion ciliare* (Katze) zeigt ein von den übrigen vegetativen Ganglien abweichendes Bild. Während die Zellen der übrigen vegetativen Ganglien

sozusagen ausschliesslich nur eine mittelmässige unspezifische Esterase-Aktivität aufweisen, zeigen im Ganglion ciliare fast sämtliche Zellen eine ausserordentlich intensive Reaktion, die derjenigen der chromophilen Zellen der spinalen Ganglien gleicht. Die Multipolarität einzelner Ganglienzellen lässt sich insofern gut beobachten, als auch die Fortsätze eine unspezifische Esterase-Aktivität aufweisen. Der Interzellularraum ergibt keine so intensive Reaktion wie z. B. im Ganglion coeliacum anzutreffen ist; lediglich die perizellulären Geflechte zeigen eine Aktivität (Abb. 5, 6).

Im Gebiet des Zentralnervensystems konnte keine unspezifische Esterase-Aktivität mit obigem Verfahren nachgewiesen werden.

Auf Grund dieser Untersuchungen lassen sich die Ganglienzellen des peripheren Nervensystems vom Gesichtspunkt der Esterase-Aktivität in folgender Reihenfolge zusammenstellen: chromophile Zellen der sensorischen Ganglien (spinale und Gasseri) = Zellen des Ganglion ciliare > Mikroganglion des Ganglion coeliacum > sympathische Ganglienzellen (Ganglion coeliacum, stellatum oticum, Grenzstrangganglien). Die Aktivität der hellen (nichtchromophilen) Zellen der sensorischen Ganglien ist praktisch gleich Null.

Wie schon erwähnt, weisen die innerhalb der vegetativen Ganglien befindlichen marklosen Nervenfasern eine Esterase-Aktivität auf. Ebenso reagieren auch die postganglionären Remak'schen Fasern intensiv. Dies war z. B. beim Ganglion oticum gut zu beobachten, wo der kräftige Stamm des N. mandibularis völlig esterase-negativ wirkt (markhaltige Fasern) und nur die sich vom Ganglion zum Nerv anschliessenden postganglionären Oticum-Fasern in elektiver Weise die Reaktion aufweisen (Abb. 7). *Soweit uns bekannt, stand bisher kein histologisches Verfahren zur Verfügung, das die marklosen Fasern elektiv nachgewiesen hätte.* Nach unseren Erfahrungen entspricht die Diazonium-Reaktion den Kriterien einer elektiven »Färbung« der marklosen Fasern.

Das Ganglion ciliare weist auch hinsichtlich der postganglionären Fasern gegenüber den übrigen vegetativen Ganglien eine Abweichung auf. Bei diesem sind nämlich die postganglionären Fasern esterase-negativ, was sich dadurch erklären lässt, dass die postganglionären Fasern des Ganglion ciliare im Gegenzatz zu den postganglionären Fasern der übrigen vegetativen Ganglien markhaltig sind.

Diskussion

Die biologische Bedeutung der unspezifischen Esterase ist bis zum heutigen Tage nicht genügend geklärt; über ihre Rolle im Nervensystem wissen wir fast gar nichts. Wenn man indessen einerseits in Betracht zieht, dass die unspezifischen Esterasen (Ali-Esterasen) Acetylcholin in viel geringerem Masse hydrolysieren als die Cholinesterasen, und andererseits bedenkt, dass mit obiger Methode in jenen Nervenelementen, die bekanntlich über eine langsame

Reizleitung verfügen (vegetatives Nervensystem, marklose Fasern, chromophile Zellen der sensorischen Ganglien)* eine Enzymaktivität nachgewiesen werden konnte, ergibt sich von selbst der Gedanke dass die geringere Acetylcholin-Hydrolyse dieses Enzyms mit der langsameren Reizleitung zusammenhängt. Diese Vorstellung dürfte mit der Theorie Szentagothai's [14] über die funktionelle Differenzierung der Nervenzellen in Einklang stehen.

Bei histochemischen Untersuchungen stösst naturgemäß die Identifizierung der Enzyme auf ernste Schwierigkeiten, um so mehr, als ein und dasselbe Enzym in verschiedenen Geweben, in anderer Umgebung, sich verschiedenartig verhalten kann. Auffallend war es, dass sich z. B. die in den Drüsenzellen nachweisbare unspezifische Esterase-Aktivität mit Physostigmin nicht beeinflussen liess, während die in den Nervengeweben nachgewiesene Esterase-Aktivität mit der selben Methode von Physostigmin in der Konzentration von 2×10^{-3} M gelähmt wurde. Im Hinblick darauf, dass die Empfindlichkeit gegenüber Physostigmin für die Cholinesterasen kennzeichnend ist, während die unspezifische Esterase gegenüber Physostigmin keine Empfindlichkeit aufweist [1] und weiterhin nach einigen Autoren [13], sowie unseren eigenen Untersuchungen beta-Naphthylacetat auch von der Cholinesterase hydrolysiert wird, erscheint es als wahrscheinlich, dass die mit der Nachlas-Seligman'schen Methode im Nervengewebe nachgewiesene Enzymaktivität eigentlich einem Cholinesterase-Typus entspricht, der auf Grund seiner Physikochemischen Eigenschaften oder aber infolge der speziellen Kolloid-Labilitätsverhältnisse des Gewebemilieus der angewandten histologischen Prozedur gegenüber Widerstand leistet. Dies bedeutet gleichzeitig auch, dass wir auf diesem Wege (durch entsprechende Modifikation der Methode) zu einem für den histochemischen Nachweis der Cholinesterasen geeigneten Verfahren gelangen können. Unsere diesbezüglichen Untersuchungen sind im Gange.

Für die Herstellung der zur Inkubationslösung benötigten Chemikalien wollen wir Prof. G. Fodor und dr. M. Sebő (Universitätsinstitut für Organische Chemie, Szeged) auch an dieser Stelle unseren Dank aussprechen.

Zusammenfassung

Mit Hilfe der zum histochemischen Nachweis der unspezifischen Esterase dienenden Methode von Nachlas und Seligman wurde folgendes festgestellt:

1. Die Mehrzahl der spinalen und sonstigen sensorischen Ganglienzellen ist esterase-negativ, doch finden sich auch positive Zellen, die unserer Ansicht nach mit den Kiss'schen dunklen (chromophilen) Zellen identisch sind.
2. Sämtliche sympathischen Ganglien weisen eine mittelmässige Esterase-Aktivität auf. Zwischen der Aktivität der einzelnen sympathischen Ganglienzellen bestehen graduelle Unterschiede.

* Die von den chromophilen Zellen ausgehenden Nervenfasern sind laut Ranson [12] marklos, so dass diese Zellen ebenfalls zu den Neuronen mit langsamter Reizleitung gehören.

3. Die Ganglienzellen des parasympathischen Ganglion ciliare ergeben eine Reaktion von gleicher Intensität wie die spinalen chromophilen Zellen.

4. Die postganglionären marklosen Nervenfasern weisen ebenfalls Esterase-Aktivität auf, während die mit Markscheide versehenen Nervenfasern negativ reagieren.

5. Auf dem Gebiet des Zentralnervensystems lässt sich eine unspezifische Esterase-Aktivität nicht nachweisen.

6. Es wird angenommen, dass das im peripheren Nervensystem mit der Nachlas-Seligman'schen Methode nachgewiesene Enzym in die Gruppe der Colinesterasen gehört.

LITERATUR

1. Ammon, R.: (1943) Die Hemmungskörper der Cholinesterase. *Erg. d. Enzymforschung.* 9. 35.
2. Bikov: (1947) Hirnrinde und innere Organe. Moskau.
3. Cohen, R. B., Nachlas, M. M. und Seligman, A. M.: (1951) Histochemical demonstration of Esterase in malignant tumors. *Cancer Research.* 11. 709.
4. Gomori, G.: (1945) The microtechnical demonstration of sites of lipase activity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 58. 362.
5. Gomori, G.: (1948) Histochemical demonstration of sites of Cholinesterase activity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 68. 354.
6. Issekutz, B.: (1951) *Pharmakologie, Toxikologie und Arzneiverordnung.* Budapest. (Ungarisch.)
7. Kiss, F.: (1932) Sympathetic elements in the cranial and spinal ganglia. *J. Anat.* Vol. 66. Part. 4.
8. Koelle, G. B.: (1950) The histochemical differentiation of types of Cholinesterase. Their localisations in tissues of the cat. *J. Pharm. Exp. Ther.* 100. 158.
9. Koelle, G. B. und Friedenwald, J. S.: (1949) A histochemical method for localising Cholinesterase activity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 70. 617.
10. Nachlas, M. M. und Seligman, A. M.: (1949) The histochemical demonstration of esterase. *J. Nat. Cancer Inst.* 9. 415.
11. Nachlas, M. M. und Seligman, A. M.: (1949) The comparative distribution of esterase in the tissues of five mammals by a histochemical technique. *Anat. Rec.* 105. 677.
12. Ranson zit. Schaffers's *Essentials of Histology.* 14. Aufl. 1945, S. 180.
13. Ravin, H. A., Tsou, K. C. und Seligman, A. M.: (1951) Colorimetric estimation and histochemical demonstration of serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.* 191. 343.
14. Szentágothai, J.: (1952) Ein Versuch zur natürlichen Systematisierung der Gewebeelemente des Nervensystems. *Mitt. d. Med. — Wiss. Abt. d. Ung. Akad. d. Wiss.*, III. 4. 365. (Ungarisch.)
15. Törő, I.: (1947) *Histologie.* Debrecen. (Ungarisch.)
16. Zavarzin und Rumiantsev: (1946) *Histologie.* Moskau. (Russisch.)
17. Zbarskij, B. I., Iwanow, I. I. und Mardaschew, S. R.: (1952) *Biologische Chemie,* Budapest. (Ungarisch.)

АКТИВНОСТЬ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЭСТЕРАЗЫ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ И ВЕГЕТАТИВНЫХ ГАНГЛИЙ

Д. Шавай, Б. Чиллик и О. Бондрай

Резюме

Применяя метод Нахлас—Селигман-а, используемый для гистохимического определения неспецифической эстеразы, авторы устанавливают следующее:

1. Большинство спинномозговых и других чувствительных ганглиозных клеток дает отрицательную реакцию на эстеразу, но можно обнаружить и клетки, дающие положительную реакцию. По мнению авторов, эти клетки тождественны темным (хромофильным) клеткам Киш-а.

2. Все симпатические ганглии показывают среднюю активность эстеразы. Отдельные симпатические ганглиозные клетки показывают активность различной интенсивности

3. Ганглиозные клетки парасимпатического ресничного узла дают реакцию, по интенсивности тождественную реакции спинномозговых хромофильтных клеток.

4. Постганглионарные безмякотные волокна также дают положительную реакцию, тогда как нервные волокна с миэлиновой оболочкой дают отрицательную реакцию. Постганглионарные волокна ресиничного узла с миэлиновой оболочкой дают отрицательную реакцию.

5. В центральной нервной системе не обнаруживается активность неспецифической эстеразы.

6. Авторы предполагают, что энзим, обнаруженный в периферической нервной системе при помощи метода Нахлас—Селигман-а, принадлежит к группе холинэстераз.

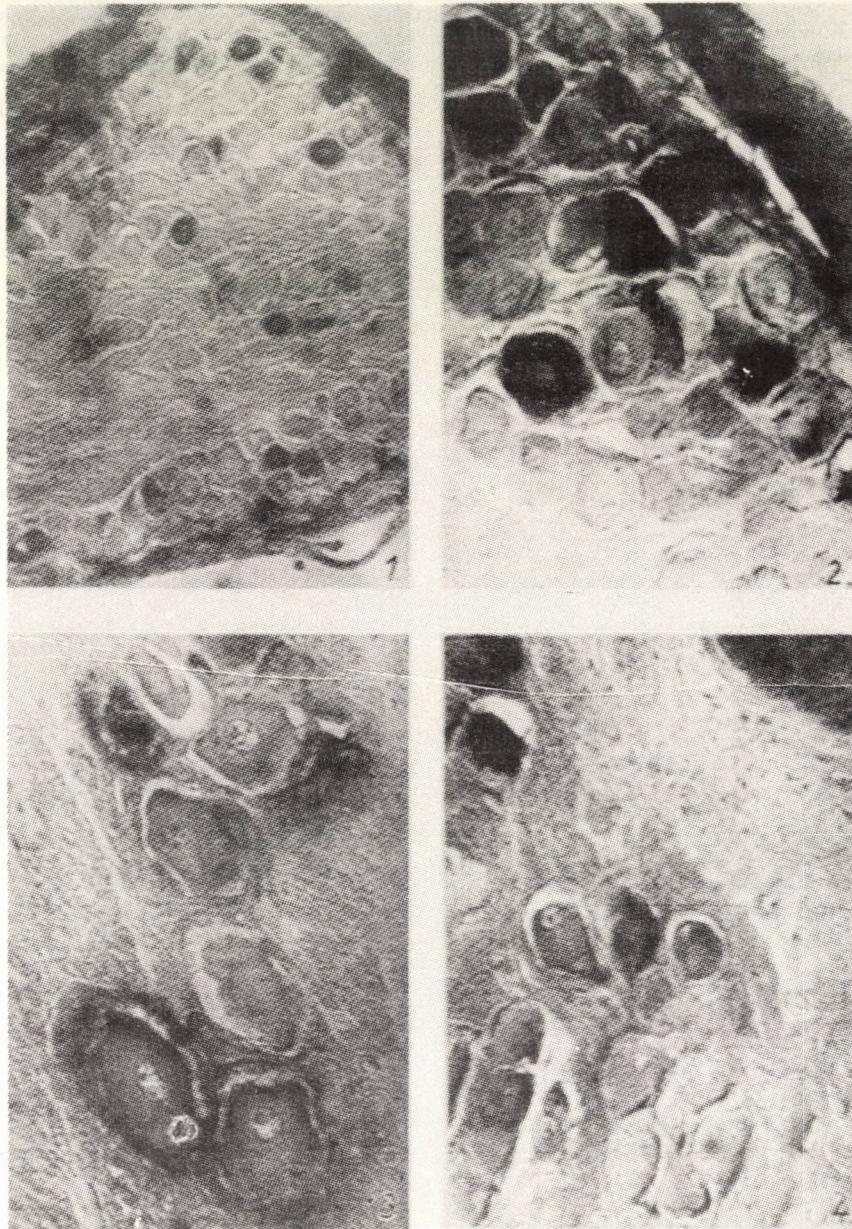


Abb. 1. Esterase-Aktivität im Spinalganglion des Kaninchens. Nachfärbung: lichtgrün
Abb. 2. Esterase-Aktivität im Spinalganglion des Kaninchens. Stark vergrössert

Abb. 3. Esterase-Aktivität im Spinalganglion des Hundes
Abb. 4. Esterase-Aktivität im Ggl. coeliacum des Kaninchens

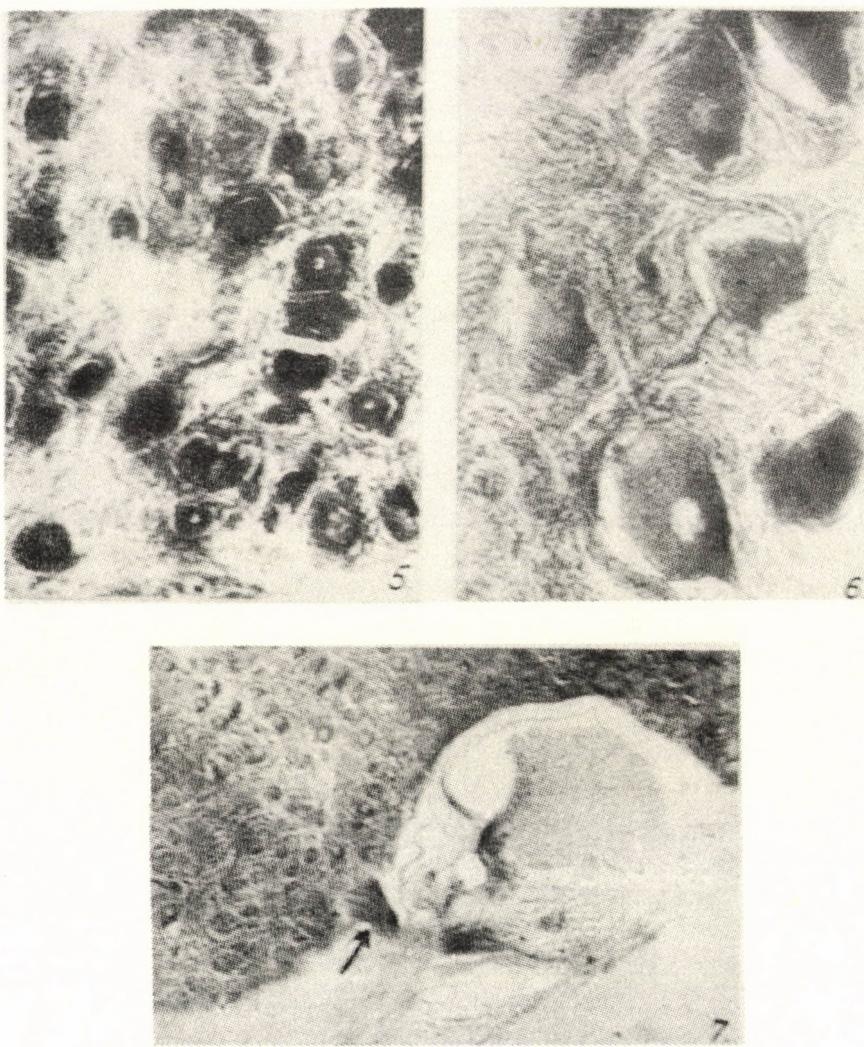


Abb. 5. Esterase-Aktivität im Ggl. ciliare der Katze

Abb. 6. Esterase-Aktivität im Ggl. ciliare der Katze. Stark vergrössert

Abb. 7. Esterase-Aktivität im Ggl. oticum und in dem mit dem N. mandibularis verbundenem postganglionären Bündel