

## MIKROKINEMATOGRAFISCHER BEITRAG ZUR PROBLEMATIK DER ENTSTEHUNG UND VERMEHRUNG DER MAKROPHAGEN IN NERVENGEWEBEKULTUREN

I. STANEK

(Eingegangen am 25. Juni 1960)

Freie phagocytierende Elemente, Makrophagen im Gewebe des Zentralnervensystems entstehen, wie bekannt, vor allem aus Mikrogliazellen (HORTEGA DEL RIO, 1919—1922; PENFIELD, 1928 u. a.), es wird aber ziemlich allgemein auch eine Möglichkeit ihrer Entstehung aus Endothelzellen der Kapillaren anerkannt, besonders im Verlaufe gewisser Phasen einiger pathologischen, mit Gewebszerfall verbundenen Prozesse. Viele Autoren sind ausserdem der Meinung, dass man die Fähigkeit der Phagocytose auch anderen Gliazellarten, insbesondere den Astrocyten zuschreiben muss (SCHOLZ, 1957; SNESSAREV, 1946; u. a.). Doch ist die Frage, ob sich solche fixe Astrocyten in freie Makrophagen umwandeln können, bis heute strittig und die Mehrzahl der klassischen Histopathologen lehnt solche Umwandlung ab.

Unsere früheren Arbeiten haben unter anderem eine Aufmerksamkeit dem vergleichenden Studium der verschiedenen Zellarten in Wachstumszonen der Kulturen von normalem und pathologisch verändertem Nervengewebe verschiedener Provenienz gewidmet. In diesen Kulturen hatten wir eine Möglichkeit, die Anwesenheit grosser, of sternartig verzweigter flacher Zellen mit blassem Cytoplasma und ovalem, an Chromatin armen Kern, als eine der Grundstrukturen der Wachstumszone dieser Explantate zu beschreiben [4, 5, 6, 7]. Über diese Zellen äusserten wir damals (1950, 1951) die Ansicht, dass es beim Beurteilen aller morphologischen Merkmale und biologischen Eigenschaften im Vergleich mit anderen, in Explantaten anwesenden Zellen möglich sei, diese Elemente als Zellen astrocytären Ursprungs zu identifizieren; diese Ansicht wurde später durch die Arbeiten von POMERAT [10] bekräftigt.

In solchen Explantaten (z. B. aus der Kleinhirnrinde von 6 Mon. alten menschlichen Fötussen), deren Rand bei Umpflanzung durch Quetschen oder Umschneiden stärker traumatisiert wurde, konnte man diese astrocytären Elemente öfters beobachten, indem sie eine intensive Phagocytose der Zelltrümmer zutage brachten. Etliche dieser grossen flachen Randzellen zeigten ein deutliches Bestreben zum Freimachen von den umgebenden fixen Zellen, zum Einziehen ihrer Ausläufer und zur Auswanderung ins umgebende Medium.

(S. z. B. die Abb. 30, 31, 32 in unserer Arbeit 6, oder die Abb. 16, 17, 18 in der Arbeit 8). Diese Beobachtungen führten zur Annahme, dass unter gewissen Bedingungen, bei gesteigerten Ansprüchen auf Abbau und Entfernung der Zerfallsprodukte im beschädigten Gewebe, die Aufgabe der Makrophagen auch durch die Tätigkeit der astrocytären Elemente übernommen werden kann.

Im Bestreben, eine Möglichkeit solcher direkten Umwandlung der grossen flachen Randzellen in freie Makrophagen zu beweisen, haben wir diese Zellen mit Hilfe der Mikrokinematographie systematisch untersucht. Es ist gelungen, den erwähnten Prozess zu verfilmen.

Unsere früheren Arbeiten [6, 7, 8, 9] befassten sich ausserdem auch mit der Frage der Vermehrung von Makrophagen in Kulturen des Zentralnervengewebes. Es konnte festgestellt werden, dass ausser der Neubildung der Makrophagen aus fixen Zellen (besonders in den ersten Phasen der Kultivation) sich die freien Elemente auch durch Teilung vermehren können. Wir haben dabei auf die Tatsache aufmerksam gemacht, dass eine mitotische Teilung in diesem Zusammenhang eine relativ sehr seltene Erscheinung ist, während die für eine direkte Teilung der Gliamakrophagen zeugenden Merkmale öfters zu sehen sind. Da wir bisher in der Literatur keine Angaben über eine direkte mikrokinematographische Darstellung der Amitose des Gliamakrophagen gefunden haben, versuchen wir sie kurz zu beschreiben.

### Material und Methodik

Als Kultivationsmaterial wurde teils die Hirnrinde junger Kaninchen und Ratten benutzt, teils Gehirnfragmente von 10–12 Tage alten Hühnerembryonen. Etwa 1–2 mm grosse Gewebstückchen explantierten wir entweder im hängenden Tropfen, oder wurden mehrere Fragmente im Hühnerplasmakoagulum auf länglichen Deckgläser in flüssigem Medium in rotierenden Röhren kultiviert. Die Methodik war im allgemeinen unserem in früheren Arbeiten benutzten Verfahren ähnlich.

Für die Beobachtung im Phasenkontrast und besonders für die mikrokinematographische Registration bei starken Vergrösserungen wurden die geeigneten Kulturen in eine improvisierte planparallele, etwa 0,2–0,3 mm hohe Kammer umgepflanzt. Die Kammer bestand aus zwei durch eine feine auf die Ränder angestrichene Paraffinschicht zusammengeklebten Deckgläser. Dieses Verfahren hat sich für unsere kurzfristige (höchstens 24stündige) Beobachtung, bzw. für die mikrokinematographische Aufnahmen als befriedigend erwiesen und ermöglichte bequemes Filmen auch bei Benützung einer homogenen Immersion (Phasenkontrast, Zeiss, Jena). Die Beobachtung und Verfilmung erfolgte im Thermostaten eigener Konstruktion oder auf einem heizbaren Tisch (Reichert, Wien) bei 37° C ab.

Für die Mikrokinematographie haben wir eine Zeitrafferapparatur mit Elektronenlampen benützt (Konstruktion der Fa. Tesla, Pardubice), die Aufnahmen wurden mit einer 16 mm Agfa-Movicon Kamera gemacht. Intervalle zwischen den einzelnen Aufnahmen betragen 8–10 Sek. Als Material diente der 16 mm Inversionsfilm Agfa Isopan F. Technische Zusammenarbeit: Dr. M. RAPOŠ und J. UHER.

### Eigene Beobachtungen

1. Verlauf der Umwandlung der fixen Randzelle in einen freien Makrophag. Explantat aus der Hirnrinde eines jungen Kaninchens (Abb. 1 und 2):



*Abb. 1.* Mikrokinematographische Darstellung der Entstehung eines Makrophagen aus fixer Randzelle einer Kultur von Kaninchenhirnrinde. Ausgewählte Bilderreihe aus einem 16 mm Filmstreifen. (Homogene Immersion, Phasenkontrast. — Negative Kopie. — Die Zeitabstände ab Ausgangsstadium sind in Minuten und Sekunden angegeben)

Die flachen verzweigten Zellen am Rande des Mutterstückes stellen hier eine öfters vorkommende Zellart dar. Ihre dicken Ausläufer hängen mit anderen Zellen der Umgebung zusammen. Das Cytoplasma enthält phagozytierte Zellfragmente und Bestandteile des Zelldetritus aus dem Rande der Kultur. Nach etwa 20 Minuten beginnt sich ein ins Medium hervorragender Ausläufer der Zelle allmählich zu verlängern, unter starker Aktivität des Oberflächen-cytoplasmas der Zelle. Dieser Ausläufer wird nach weiteren 25 Minuten ziem-

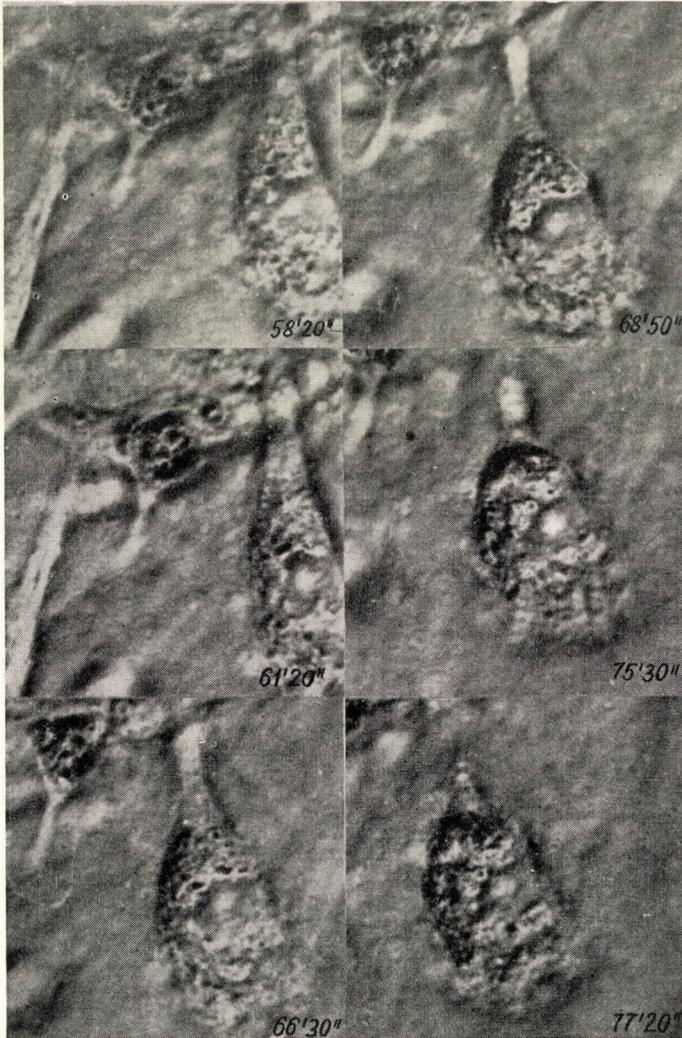


Abb. 2. Mikrokinematographische Darstellung der Entstehung eines Makrophagen aus fixer Randzelle einer Kultur von Kaninchenhirnrinde. (Fortsetzung der Abb. 1)

lich dick und sein Ende verbreitert sich in flächenhafte membranartige Gebilde, die sich nach der Art der undulierenden Membranen lebhaft bewegen. Gleichzeitig kommt es zur allmählichen Loslösung der übrigen Ausläufer der Zelle, die sich verkürzen und einziehen, so dass die Zelle nach etwa insgesamt 55 Minuten nur noch mit zwei Ausläufern mit dem Gewebe des Explantates zusammenhängt. Der ganze Zell-leib schiebt sich nach und nach aus dem Explantat ins umgebende Medium und wird allmählich birnensförmig. In weiteren etwa 10 Minuten löst sich dann der Zusammenhang mit dem Rande

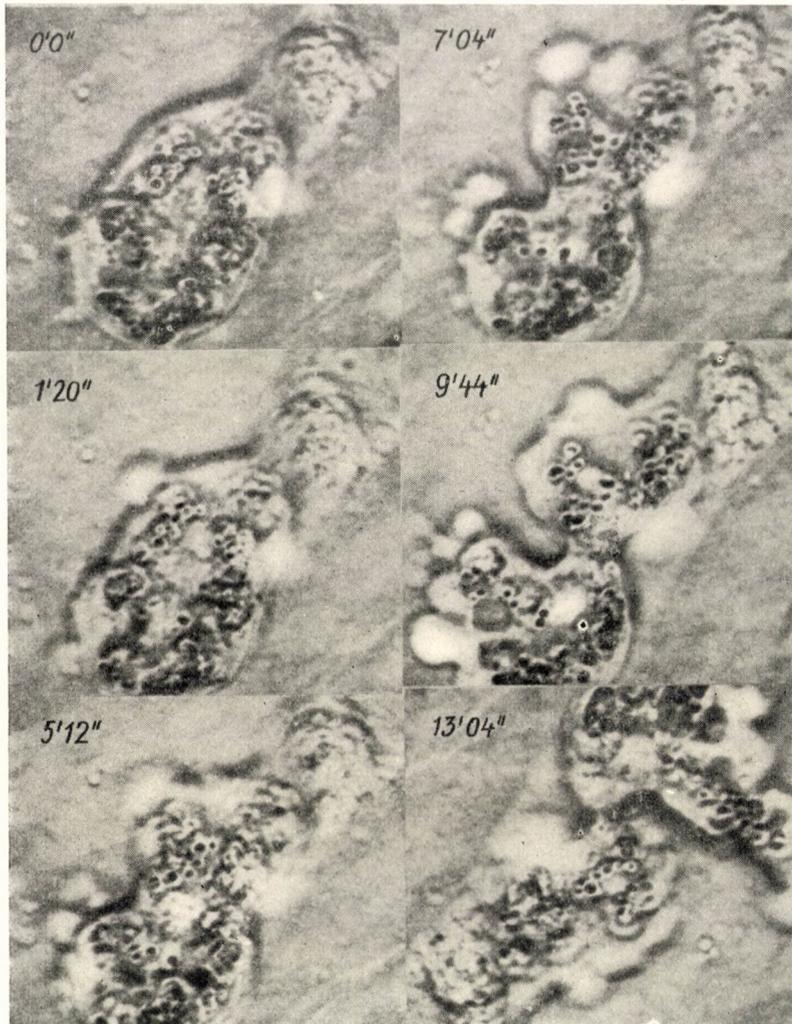


Abb. 3. Verlauf der amitotischen Teilung eines Makrophagen aus der Kultur vom Hirngewebe des Hühnerembryos. Ausgewählte Bilderreihe aus einem 16 mm Filmstreifen. (Homogene Immersion, Phasenkontrast. — Negative Kopie. — Die Zeitabstände ab Anfangsstadium sind in Minuten und Sekunden angegeben)

des Mutterstückes völlig ab, beschränkt sich zuerst auf einen einzigen dicken Ausläufer, der sich rasch verdünnt, bis endlich nach etwa 77 Minuten auch diese dünne Verbindung bricht und die Zelle vollkommen frei wird. Während der letzten Periode der Ablösung weist das Cytoplasma der Zelloberfläche eine intensive Aktivität im Sinne der Entsendung kurzer keilförmiger Ausläufer und undulierenden Membranen auf. Nach völliger Ablösung benimmt sich die

freigewordene abgerundete Zelle wie ein normalerweise in diesen Kulturen vorkommender Makrophag.

2. Verlauf der amitotischen Teilung in einem Makrophagen in Kultur aus dem Gehirngewebe des Hühnerembryos (Abb. 3 und 4).

Ein Makrophag mit annähernd ovoidem Kern, einer Anhäufung von Fettvakuolen und phagozytierten Zelltrümmern im Zellkörper, weist eine starke Oberflächenaktivität im Sinne der Entsendung und Wiedereinziehung kurzer, dicker und keilförmiger Ausläufer auf, die von Zeit zu Zeit auch eine flächenhafte Verbreiterung zeigen. Schon nach 1 Min. 20 Sek. erscheinen die ersten Zeichen der Zerschnürung am Kern und Zellkörper, was nach etwa 5 Minuten deutlich ausgeprägt wird. Unter starker Oberflächenaktivität, die aber nicht

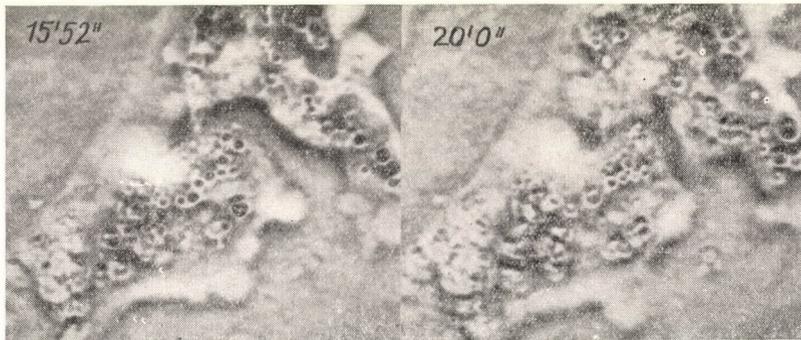


Abb. 4. Verlauf der amitotischen Teilung eines Makrophagen aus der Kultur vom Gehirngewebe des Hühnerembryos. (Fortsetzung der Abbildung 3)

stärker erscheint als bei einem gewöhnlichen Makrophagen, schreitet der Prozess der Zellzerschnürung weiter, so dass nach etwa 10 Minuten die beiden Tochterzellen bereits ausgebildet sind und zwischen ihren Zellkörpern nur noch eine kurze Cytoplasmabrücke besteht. Dieser Zusammenhang verengt sich nach weiteren 5 Minuten auf eine sehr kurze fadenförmige Verbindung, die dann rasch bricht, so dass nach etwa 20 Minuten die Zellteilung beendet ist. Die beiden Tochterzellen entfernen sich dann langsam voneinander, können aber auch längere Zeit beisammen bleiben. Im weiteren benehmen sich die beiden neugebildeten Zellen wie normale Makrophagen.

### Zusammenfassung

Mit Hilfe einer mikrokinematographischen Einrichtung und Phasenkontrast wurde die Entstehung der Gliamakrophagen aus grossen flachen Randzellen im Explantat von der Gehirnrinde eines jungen Kaninchens dargestellt, kurz beschrieben und dokumentiert. Da die erwähnten Randzellen des Mutterstückes vom Autor schon in früheren Arbeiten als Zellen astrocytären Ursprungs betrachtet wurden, glaubt der Autor bewiesen zu haben, dass sich unter gewissen Bedingungen (z. B. stärkere Ansprüche an phagozytäre Reinigungstätigkeit

im beschädigten Gewebe der Kultur und vielleicht auch *in vivo*) auch die Astrocyten in freie phagocytierende Zellen umwandeln können.

Als zweiter Beitrag wird der Verlauf einer amitotischen Teilung eines Makrophagen in Nervengewebekultur beschrieben und mikrokinematographisch registriert.

#### LITERATUR

1. PENFIELD, W. (1928): Neuroglia and Microglia, the Interstitial Tissue of the Central Nervous System. In Cowdry's Special Cytology, New York. Vol. II. — 2. SCHOLZ, W. (1957): Für die allgemeine Histopathologie degenerativer Prozesse bedeutsame morphologische, histochemische und struktur-physiologische Daten. In Lubarsch—Henke—Rössle: Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie. Springer, Berlin, Bd. 13., Teil I/A. — 3. Шесарев, П. Е. (1946): Общая гистопатология мозговой Павмы, Москва — 4. SLABEYCIUSOVÁ, M.—STANEK, I. (1950): Das Gewebe einiger Geschwülste des Zentralnervensystems, kultiviert *in vitro*. Biol. Listy, Suppl. II. — 5. SLABEYCIUSOVÁ, M.—STANEK, I. (1951): Einige Bemerkungen zur Kultivierung des normalen Zentralnervensystemgewebe *in vitro*, auf Grund eigener Experimente. Brat. lekár. Listy, 31, 60. — 6. STANEK, I.—MUNGYEROVÁ, G. (1953): Über die Zytophysologie des Gliamakrophagen. Biologia, 8, 375. — 7. STANEK, I. (1955): Contribution à l'étude sur la cytologie de la névroglie *in vitro*. Referat am VI. internationalen Anatomenkongress, Paris. — 8. STANEK, I. (1959): Makrophagen im Zentralnervensystem. Referat und Beitrag zur Problematik am II. internationalen Histologensymposium, Budapest. — 9. STANEK, I. (1960): Interaktion der Gliamakrophagen mit umgebenden Gewebe und Zelldetritus *in vitro*. Biologia (im Druck). — 10. РОМЕРАТ, С. М. (1952): Dynamic Neurogliology. Texas Rep. Biol. Med. 10, 885.

#### МИКРОКИНЕМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ К ПРОБЛЕМАТИКЕ ВОЗНИКНОВЕНИЯ МАКРОФАГОВ В КУЛЬТУРАХ НЕРВНЫХ ТКАНЕЙ

И. СТАНЕК

При помощи микрокинематографического приспособления и фазового контраста автор изобразил возникновение глиомакрофагов из крупных плоских краевых клеток в тканевой культуре коры головного мозга молодого кролика; в работе даются краткое описание развития макрофагов. Ввиду того, что упомянутые краевые клетки материнского куска уже в прежних работах автора были определены как клетки астроцитарного происхождения, автор считает, что он установлением непосредственного преобразования этих клеток в макрофаги предоставил дальнейшие данные о том, что в определенных условиях (напр. повышенные требования относительно фагоцитарной очистительной деятельности в поврежденной ткани культуры и, быть может, также *in vivo*) астроциты также могут преобразовываться в свободные фагоцитарные клетки.

В дальнейшем дается описание процесса прямого деления макрофагов в культурах нервной ткани.

#### MICROCINEMATOGRAPHY OF MACROPHAGES IN EXPLANTED NERVOUS TISSUE

I. STANEK

Phase-contrast microcinematography of the formation of glial macrophages from large, flat marginal cells in the explanted cerebral cortex of a young rabbit is presented. The said marginal cells have already been claimed to be of astrocytic origin in earlier publications of the author; the finding that these cells undergo a direct metamorphosis into macrophages furnishes a further support of the theory that, under certain conditions (*e. g.* stronger demands for phagocytic activity in the impaired explant, and probably *in vivo*), astrocytes may also develop into free phagocytes.

The amitotic division of a macrophage in explanted nervous tissue is also demonstrated.

Prof. Dr. Ivan STANEK, Bratislava, Sasnikova 4. CSR