

Enzymhistochemischer Beitrag zur Histogenese des Medulloblastoms

GEORG W. KREUTZBERG

Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München
(Deutsche Forschungsanstalt für Psychiatrie)

FILIPPO GULLOTTA

Institut für Neuropathologie der Universität Bonn

Eingegangen am 19. Dezember 1966

Vergleichende pathomorphologische Untersuchungen haben zu einer neuen Betrachtungsweise des sogenannten Medulloblastoms geführt. Seine neuroektodermale Genese kann danach abgelehnt werden. Es handelt sich vielmehr um eine mesenchymale Geschwulst, nämlich ein overgrowth-Sarkom (GULLOTTA, 1965—1966).

In der vorliegenden Studie wird untersucht, inwieweit das enzymhistochemische Verhalten des Medulloblastoms im Schnittpräparat und in der Gewebekultur diese Auffassung zu stützen imstande ist. Durch Darstellung spezifischer Enzyme, sowie durch Vergleich mit einem umfangreichen unter identischen Versuchsbedingungen untersuchten Material erwarteten wir weitere Argumente zur Histogenese der Medulloblastome.

Material und Methode¹

Unter einem Gesamtmaterial von 530 kultivierten Hirntumoren fanden sich 13 Tumoren der Medulloblastom-Gruppe. Das Operationsmaterial wurde in der bereits beschriebenen Weise bearbeitet (KREUTZBERG et al., 1966). An den Schnittpräparaten und an den Gewebekulturen wurden folgende Enzyme untersucht: NADH-Tetrazolium-Reduktase (NADH-R) und NADPH-Tetrazolium-Reduktase (NADPH-R) sowie die Dehydrogenasen der Milchsäure (LDH), Bernsteinsäure (SDH) und Glutaminsäure (GADH). Zum histochemischen Nachweis wurden die Methoden von NACHLAS et al. (1957, 1958a und b) angewandt. Die Monoaminoxidase (MAO) wurde nach GLENNER, BURTNER u. BROWN, die alkalische und saure Phosphatase sowie Acetylcholinesterase (ACHE) und Butyrylcholinesterase (BCHE) nach GOMORI (1952) nachgewiesen.

Die Tumoren wurden in Reagensgläser mit der Rollertechnik gezüchtet (KERTING, 1961). Zwei der 13 Tumoren zeigten keine Proliferation.

Ergebnisse

Histologisch entsprachen 12 Tumoren dem kleinzelligen Typ. Einer wurde als Mischtumor klassifiziert (siehe GULLOTTA, 1966, 1967). Das

¹ Für die Überlassung des Operationsmaterials sind wir Herrn Professor Dr. F. K. KESSEL (Neurochirurgische Abteilung des Städtischen Krankenhauses Münchens rechts der Isar) und Herrn Professor Dr. P. RÖTTGEN (Neurochirurgische Universitätsklinik Bonn) sowie ihren Mitarbeitern zu besonderem Dank verpflichtet.

Proliferationsverhalten in der Gewebekultur entspricht weitgehend den von KERSTING (1965) und GULLOTTA (1967) mitgeteilten Beobachtungen. Auch in unseren Fällen konnte ein rasches Wachstum der Zellkolonien nur bei jenen Tumorformen beobachtet werden, die histologisch als sogenannte umschriebene Arachnoidalarkome (FOERSTER u. GAGEL) klassifiziert werden können und nach unserer Auffassung nichts anderes als differenzierte oder reife Medulloblastome sind.

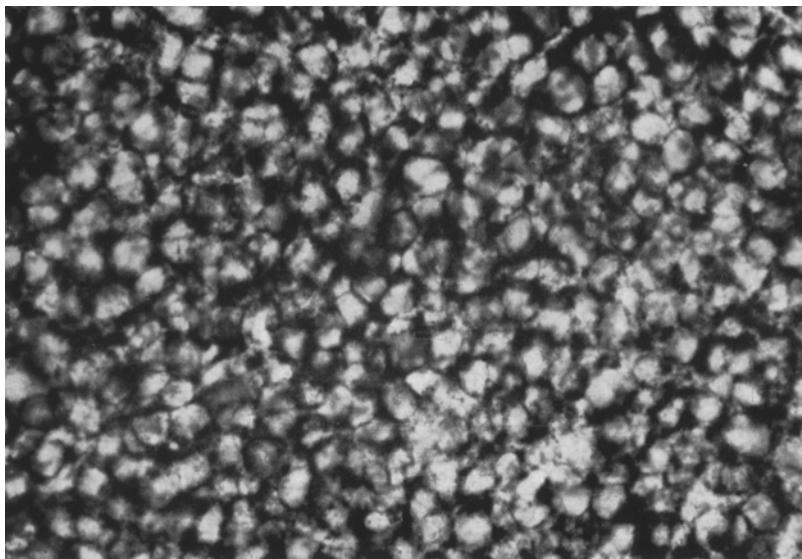


Abb.1. Kryostatschnitt eines Medulloblastoms (T 380). Gleichförmige Aktivität der NADH-Tetrazolium-Reduktase im Cytoplasma der Tumorzellen. Kerne frei. $450 \times$

Enzymhistochemisches Verhalten im Kryostat-Material. Unter den von uns untersuchten Enzymen des oxydativen Stoffwechsels war mit Regelmäßigkeit die Aktivität der NADH-R am stärksten. LDH war in allen Fällen schwächer als NADH-R, gewöhnlich aber etwas stärker als NADPH-R. Wesentlich schwächer war dagegen die SDH-Aktivität. Die Glutamat-Dehydrogenase (GADH) zeigte minimale Aktivität und war in einigen Tumoren nicht nachweisbar. Die Verteilungsmuster der Oxydoreduktasen-Aktivität war in der Regel gleichmäßig. Zwischen den einzelnen Tumorzellen waren Unterschiede minimal. Die Kerne waren frei von Formazan und die Aktivität vorwiegend im perikariellen Cytoplasma nachweisbar (Abb.1). Waren im Schnitt-Präparat ortsständige neuroektodermale Strukturen vom Tumorgewebe durchsetzt oder überwuchert, so konnten auch im histochemischen Bild stets die verschiedenen Zellarten an ihrer unterschiedlichen Enzymaktivität erkannt werden

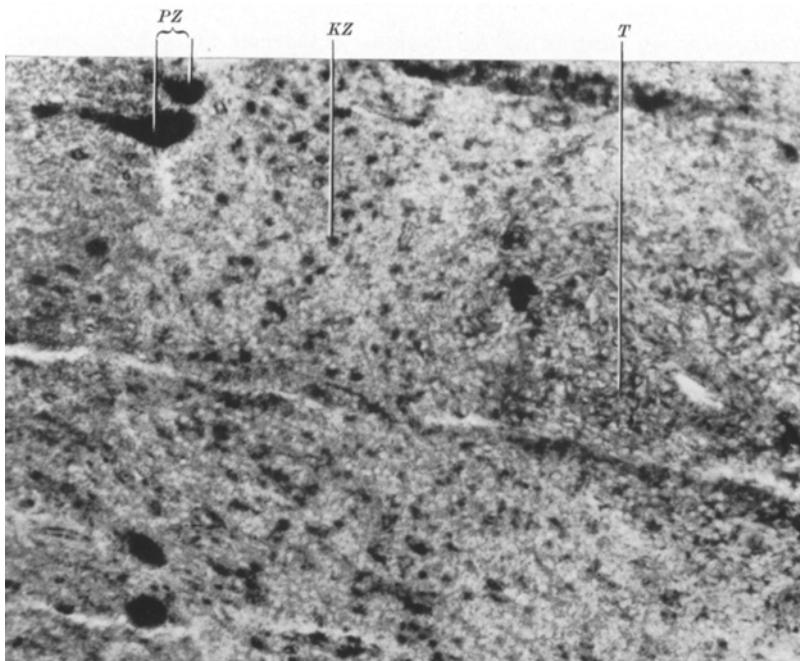


Abb. 2. Kryostatschnitt eines Medulloblastoms (T 152). Einwachsen des Tumors in die Kleinhirnrinde. Purkinje-Zellen (PZ), Körnerzellen (KZ) und Tumorzellen (T) zeigen verschiedene starke Aktivität an NADH-R. 180 ×

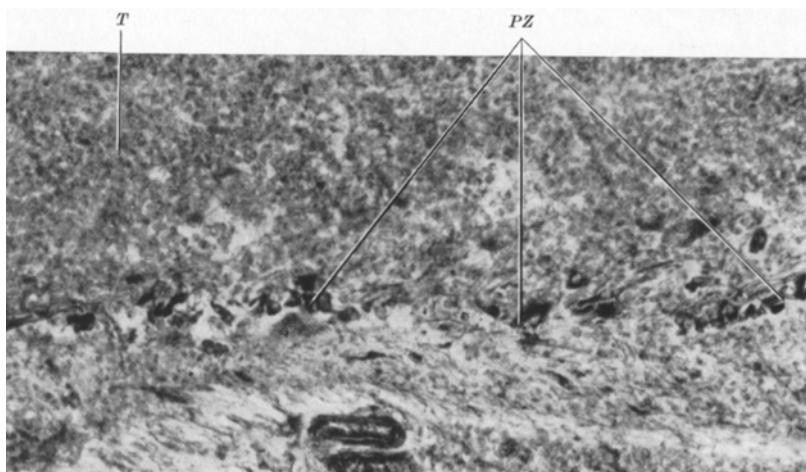


Abb. 3. Kryostatschnitt eines Medulloblastoms (T 128). Die Tumorzellen (T) haben das ortsständige Gewebe überwuchert und zu einer Zusammendrängung von Nervenzellen im Bereich der Purkinje-Zellschicht (PZ) geführt. Diese sind immer noch an ihrer besonders hohen NADH-R-Aktivität zu erkennen. 140 ×

(Abb. 2 und 3). Nervenzellen (Purkinje-Zellen und Golgi-Zellen) zeigten z. B. eine höhere Aktivität an NADH-R, SDH, GADH und saurer Phos-

phatase als Tumorzellen. Bei der LDH ist dieser Unterschied jedoch deutlich schwächer. Auch die Körnerzellen sind im enzymhistochemischen Bild klar von den Tumorzellen zu unterscheiden. Reaktive Astrocyten sind unter anderem durch relativ hohe GADH-Aktivität gekennzeichnet. Makrophagen besitzen eine höhere Aktivität an saurer Phosphatase.

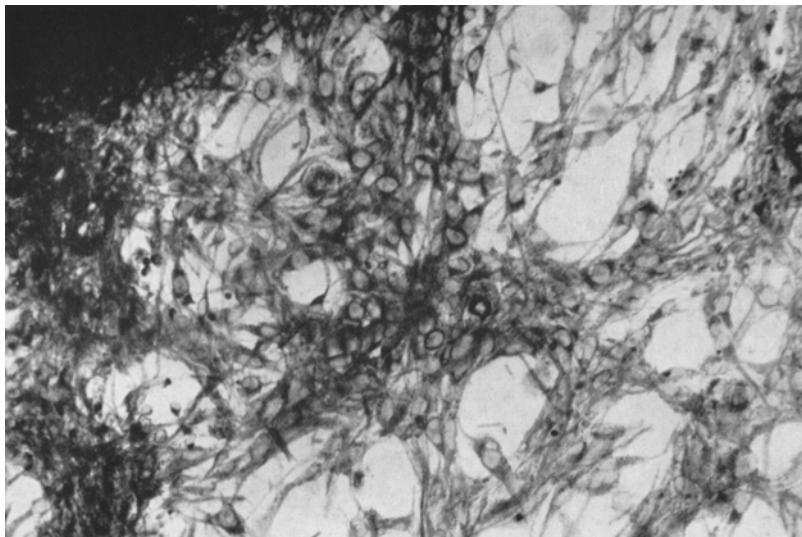


Abb.4. Gewebekultur eines kleinzelligen Medulloblastoms (T 52). Typisches Bild am 6. Tag der Kultivierung. Die Aktivität der NADH-R zeigt eine uniforme Verteilung im Cytoplasma der Tumorzellen. 140 \times

In 3 Fällen wurde die Monoaminoxidase (MAO) untersucht, sie war negativ. Negative Resultate ergaben sich auch beim Nachweis der Acetylcholinesterase und Butyrylcholinesterase in den Tumorzellen. Die saure Phosphatase zeigte eine äußerst geringe Aktivität, die sich in feinen Körnern in den Tumorzellen manifestierte. Die alkalische Phosphatase zeigte eine Aktivität in den im Tumor gelegenen Gefäßen. Die Geschwulstzellen waren dagegen negativ.

In der *Gewebekultur* blieb die Aktivitätssequenz des Schnittpräparates (NADH-R $>$ LDH $>$ NADPH-R $>$ SDH) konstant. Die Aktivität der GADH war minimal oder negativ. Im Gegensatz zu den Kryostat-Präparaten entwickelten die Tumorzellen in den Gewebekulturen eine stärkere enzymatische Pleomorphie. Insbesondere in den *in vitro* schnell wachsenden Tumoren vom Foerster-Gagel-Typ waren histochemisch erhebliche Unterschiede in der Oxydoreduktasen-Aktivität der einzelnen Tumorzellen zu erkennen (Abb.5). Wie im Schnittpräparat so war auch *in vitro* keine Aktivität der Cholinesterasen und der MAO in den Tumorzellen nachzuweisen.



Abb. 5. Gewebekultur eines kleinzelligen Medulloblastoms (T 204/B) am 6. Tag der Kultivation. Der Tumor zeichnete sich *in vitro* durch rasche Proliferation und Polymorphie des Zellbildes aus. Auch die Aktivität der NADPH-R lässt stärkere Unterschiede zwischen den einzelnen Tumorzellen erkennen („enzymatische Pleiomorphie“). 90 \times

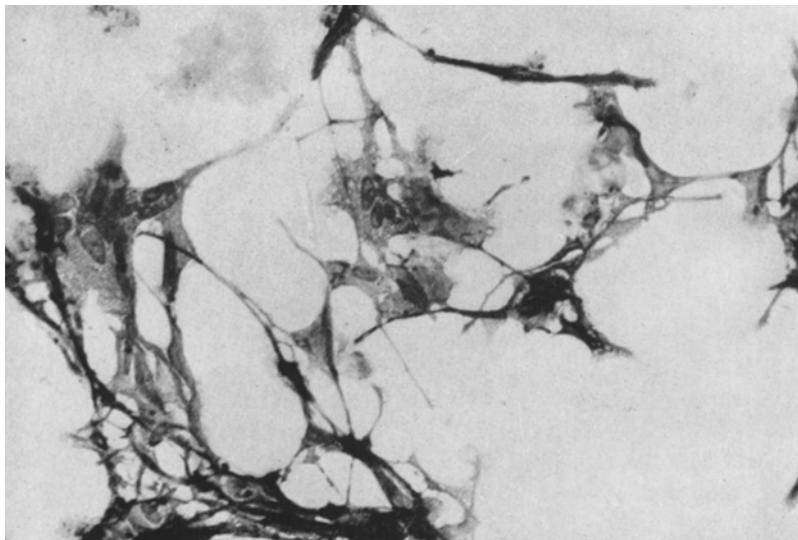


Abb. 6. Gewebekultur des Tumors von Abb. 2. Am 6. Tage ist in den Zellmembranen eine deutliche Aktivität der alkalischen Phosphatase nachweisbar. (Zellschrumpfung durch die histochemische Prozedur verursacht.) 140 \times

Ausgenommen einige Makrophagen war die saure Phosphatase in den Kulturen nur minimal aktiv. Im Gegensatz zu den Gewebsschnitten konnte *in vitro* jedoch eine deutliche Aktivität der alkalischen Phosphatase in den Zellmembranen der proliferierten Tumorzellen gefunden werden (Abb. 6).

Diskussion

Das Aktivitätsmuster der Oxydoreduktasen in Schnittpräparaten und Kulturen von Medulloblastomen zeigt prinzipiell keine Verschiedenheit von anderen, in unserem Material vorhandenen Tumoren. Sowohl die neuroektodermalen Gliome als auch Meningome, Lindau-Tumoren und Großhirnsarkome lassen stets eine hohe Aktivität der untersuchten Diaphoräsen und der LDH erkennen (KREUTZBERG et al., 1966). Im Gegensatz zu den meisten neuroektodermalen Tumoren wird jedoch in den Medulloblastomen nur eine minimale Aktivität der GADH gefunden. Obwohl dieses Enzym keinesfalls spezifisch für neuroektodermale Ge- webe ist, läßt doch seine Abwesenheit in den Medulloblastomen vermuten, daß es sich hier um einen histogenetisch andersartigen Tumor handeln könnte. Das gleiche kann auch von der MAO gesagt werden, die im Hirngewebe und in Kulturen von neuroektodermalem Gewebe stark vorhanden ist (SHIMIZU et al., 1957; O'steen u. CALLAS, 1964) und auch in Gliomen gewöhnlich noch nachweisbar ist.

Auch bei der alkalischen Phosphatase zeigt unser Material eine Besonderheit. Im Gegensatz zu anderen, von uns bisher untersuchten Geschwülsten, entwickelten die Geschwulstzellen der Medulloblastome in der Gewebekultur eine vorwiegend an die Zellmembran gebundene Aktivität der alkalischen Phosphatase, obwohl das Enzym im Biopsiematerial nicht in den Tumorzellen nachgewiesen werden konnte.

Unsere histochemischen Befunde an oxydativen Enzymen sowie an den Phosphatasen decken sich weitgehend mit den Angaben der Literatur. FRIEDE fand 1959 bei einem Medulloblastom eine sehr geringe SDH-Aktivität. CHASON et al. (1963) berichten über eine hohe Aktivität an DPN-Diaphorase (= NADH-R) und LDH und fanden auch keinen wesentlichen Unterschied im Muster der Oxydoreduktasen zwischen anderen Gliomen und dem Medulloblastom. Ausnahmsweise fanden diese Autoren auch eine hohe SDH-Aktivität. Im übrigen wird der Befund einer starken DPND- und LDH-Aktivität gegenüber einer schwächeren der TPN-Diaphorase und einer negativen bis schwachen Aktivität der SDH von weiteren Autoren bestätigt (UDVARHELYI et al., 1962; NASU u. VIALE, 1962; VIALE u. ANDREUSSI, 1964). SCHIFFER et al. (1965) konnte in vier Medulloblastomen keine saure Phosphatase nachweisen mit Ausnahme von Arealen, in denen Hämorrhagien und regressive Veränderungen waren, wo er saure Phosphatase in perivaskulären Zellen fand. GLUSZCZ (1963) fand eine negative alkalische und saure Phosphatasereaktion in vier Medulloblastomen. Demgegenüber fand er eine hohe Aktivität der Aminopeptidase, was ganz im Gegensatz zu den übrigen, von ihm untersuchten neuroektodermalen Tumoren stand. Diese zeigten nämlich entweder keine oder nur eine sehr schwache Aktivität. VIALE u. IBBA (1964) fanden in Medulloblastomen keine Phosphorylase.

MÜLLER (1965) unterstreicht die histochemische Sonderstellung des Medulloblastoms und weist auf die auffallend starke Aktivität der Aldolase sowie auf den Mangel an Glykogen hin.

Unter den von uns untersuchten Enzymen kommt dem Nachweis der spezifischen und unspezifischen Acetyl- bzw. Butyrylcholinesterase besondere Bedeutung zu. Diese Enzyme gelten weithin als spezifisch für neuroektodermales Gewebe und könnten uns einen Aufschluß über die Genese des Tumors geben. In unserem Material fand sich nun ausnahmslos für beide Enzyme ein negativer Befund und zwar sowohl in der Gewebekultur als auch im Schnittpräparat. Lediglich einige dem Tumor einverlebte ortständige Nervenzellen bzw. Gliazellen zeigten im Schnittpräparat eine geringe Aktivität an Acetylcholinesterase bzw. vereinzelt an Butyrylcholinesterase. Diese Befunddeutung steht in gewissem Gegensatz zu PERRIA et al. (1964) und VIALE (1962). Diese Autoren fanden zwar durchwegs in den kleinen und differenzierten Zellen des Medulloblastoms auch eine fehlende Aktivität der Cholinesterasen. Jedoch sahen sie in einzelnen Elementen ebenso wie wir eine Acetylcholinesterase-Aktivität. Sie deuteten dies im Sinne einer teilweisen Differenzierung des Tumors von Medulloblasten-ähnlichen Zellen zu Spongioblasten bzw. Neuroblasten. Dagegen stimmen wir mit SCHIFFER überein, der sich auch histochemisch nicht von einer neuroektodermalen Differenzierung der Medulloblastome überzeugen konnte. Der negative Ausfall der Cholinesterasereaktion in den Gewebekulturen, in denen ausschließlich Tumorzellen gewachsen sind, läßt schließlich auch den Schluß zu, daß Medulloblastomzellen diese für neuroektodermales Gewebe charakteristischen Enzyme nicht enthalten.

In diesem Zusammenhang dürfte die starke AChE-Aktivität in Ganglioneuromen von besonderem Interesse sein (KREUTZBERG et al., 1965). Dort nimmt die Enzymaktivität mit dem Differenzierungsgrad zu und ist in den reifen ganglioiden Elementen am höchsten. Aber auch in den noch unentwickelten Rundzellen, die als neuroblastische Elemente angesprochen werden, ist eine AChE-Aktivität nachweisbar (siehe Abb. 7). Analog dazu wäre, ausgehend vom herkömmlichen histogenetischen Konzept der Medulloblastome, auch bei diesen AChE zu erwarten gewesen.

Anhand unserer Befunde und durch Vergleich mit den Untersuchungen, die bisher an Medulloblastomen in der Literatur mitgeteilt wurden, läßt sich also sagen, daß im Prinzip das Muster der Oxydoreduktasen, deren Vorhandensein für jede Zelle eine *conditio sine qua non* bedeutet, keine wesentliche Abweichung von dem Enzymmuster in anderen Tumoren, seien es Gliome oder mesenchymale Tumoren, erkennen läßt. Dagegen unterscheiden sich die Enzymaktivitäten im Medulloblastom von denen der anderen neuroektodermalen Tumoren deutlich in bezug auf nicht essentielle Enzyme wie es die Phosphatasen und Aminopeptidase,

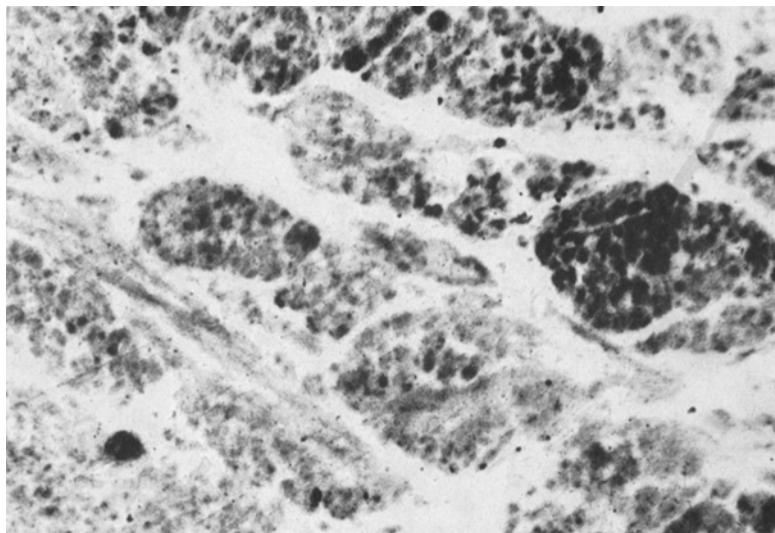


Abb. 7. Kryostatschnitt eines Ganglioneuroms. Unterschiedlich starke Aktivität der Acetylcholinesterase in Tumorzellen verschiedenen Differenzierungsgrades. Negativ in den bindegewebigen Septen.
140 ×

sowie die Cholinesterasen und die Monoaminoxydinasen darstellen mögen. Damit ergibt sich, daß von der Enzymhistochemie keinesfalls der Nachweis einer neuroektodermalen Entstehung gestützt werden kann. Die Unterschiede im Enzymhaushalt der Medulloblastomzelle zu den übrigen neuroektodermalen Geschwülsten legt dagegen nahe, daß es sich bei diesem Tumor um einen histogenetisch andersartigen Tumor handeln könnte.

Literatur

- CHASON, J. L., J. W. LANDERS, J. E. GONZALEZ, and G. BRUECKNER: Respiratory enzyme activity of human gliomas. A slide histochemical study. *J. Neuropath. exp. Neurol.* **22**, 471 (1963).
- FOERSTER, O., u. O. GAGEL: Das umschriebene Arachnoidal-sarkom des Kleinhirns. *Z. ges. Neurol. Psychiat.* **164**, 565 (1939).
- FRIEDE, R. L.: Histochemical Nachweis von Succinodehydrogenase in Biopsien von menschlichem Hirngewebe. *Virchows Arch. path. Anat.* **332**, 216 (1959).
- GLENNER, G. G., H. J. BURTNER, and G. W. BROWN: The histochemical demonstration of monoamine oxidase activity by tetrazolium salts. *J. Histochem. Cytochem.* **5**, 591 (1957).
- GLUSZCZ, A.: A histochemical study of some hydrolytic enzymes in tumors of the nervous system. *Acta neuropath. (Berl.)* **3**, 184 (1963).
- GOMORI, G.: Microscopic histochemistry. Chicago: Univ. Chicago Press 1952.
- GULLOTTA, F.: Über angeborene Mischgeschwülste des Kleinhirns. *Dtsch. Z. Nervenheilk.* **189**, 354 (1966).
- Vergleichenden Untersuchungen zur Morphologie und Genese der sogenannten Medulloblastome. Symposium: Probl. Comm. of Neurooncology, World Feder. of Neurology, Bern 4. 9. 1965. *Acta neuropath. (Berl.)* **8**, 76 (1967).

- GULLOTTA, F.: Il medulloblastoma: un sarcoma embrionale a localizzazione specifica. *Riv. Pat. clin. sper.* **7**, 145 (1966).
- Das sogenannte Medulloblastom. Monographie aus dem Gesamtgebiet der Neurologie und Psychiatrie, Heft 118. Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1967.
- KERSTING, G.: Die Gewebszüchtung menschlicher Hirngeschwülste. Monographien aus dem Gesamtgebiet der Neurologie und Psychiatrie, Heft 90. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1961.
- Die Gewebszüchtung der Medulloblastome. Symposium: Probl. Comm. of Neuro-oncology, World Feder. of Neurology, Bern 4. 9. 1964. *Acta neuropath.* (Berl.) **8**, 100 (1967).
- KREUTZBERG, G., E. LANGER u. M. MINAUF: Beitrag zur Enzymhistochemie und Gewebekultur des Ganglioneuroms. *Acta neuropath.* (Berl.) **4**, 392 (1965).
- M. MINAUF, and F. GULLOTTA: Enzyme histochemistry of human brain tumors and their tissue cultures with special reference to the oxidoreductases in the glioblastoma multiforme. *Histochemistry* **6**, 8 (1966).
- MÜLLER, W.: Histochemische Untersuchungen an menschlichen Medulloblastomen. Symposium: Probl. Comm. of Neurooncology, World Feder. of Neurol., Bern 4. 9. 1965. *Acta neuropath.* (Berl.) **8**, 96 (1967).
- NACHLAS, M. M., K. C. TSOU, E. DE SOUZA, S. C. CHENG, and A. M. SELIGMAN: Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new nitrophenyl substituted ditetrazolium. *J. Histochem. Cytochem.* **5**, 420 (1957).
- D. G. WALKER, and A. M. SELIGMAN: A histochemical method for the demonstration of diphosphopyridine nucleotide diaphorase. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 29 (1958a).
- — — The histochemical localization of triphosphopyridine nucleotide diaphorase. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 467 (1958 b).
- NASU, H., et G. L. VIALE: Recherches d'histo chimie enzymatique avec les sels de tetrazolium sur les gliomes. Proc. IV. Internat. Kong. Neuropath., vol. 1, p. 115. Stuttgart: G. Thieme 1962.
- O'STEEN, W. K., and G. CALLAS: Histochemical study of monoamine oxidase in central nervous system cultures. *Anat. Rec.* **150**, 257 (1964).
- PERRIA, L., G. VIALE, F. IBBA, L. ANDREUSSI e E. VIALE: Istocitochimica dei tumori endocranici. *Neuropsichiatria* **20**, 1 (1964).
- SCHIFTER, D., A. FABIANI, G. F. MONTICONE, and G. GABELLA: Histochemical study of acid phosphatase activity in cerebral tumors. *Acta neuropath.* (Berl.) **5**, 16 (1965).
- Persönliche Mitteilung.
- SHIMIZU, N., N. MORIKAWA, and M. OKADA: Histochemical studies of monoamine oxidase of the brain of rodents. *Z. Zellforsch.* **49**, 389 (1959).
- UDVARHELYI, G. B., J. S. O'CONNOR, and A. E. WALKER: A histochemical study of tumors of the central nervous systems. Proc. IV. Internat. Kong. Neuropath., vol. 1, p. 95. Stuttgart: G. Thieme 1962.
- VIALE, G. L.: Histochemische Untersuchungen über die Cholinesterasen in Hirngeschwülsten. *Acta neuropath.* (Berl.) **2**, 73 (1962).
- , and L. G. ANDREUSSI: Histochemical study of the oxidative activity in tumors of the nervous system. *Acta neuropath.* (Berl.) **4**, 538 (1965).
- , u. F. IBBA: Histochemische Untersuchungen über die Phosphorylasen in Hirngeschwülsten. *Acta neurochir. (Wien)* **12**, 475 (1964).