

Aus dem Institut für Neuropathologie der Universität Bonn
und dem Rheinischen Hirnforschungsinstitut
(Direktor: Professor Dr. G. PETERS)

**Der Nachweis einer oxydativen Stoffwechselsteigerung
in der „primär gereizten“ Spinalganglienzelle
am Verhalten der Bernsteinsäuredehydrogenase ***

Von

HAROLD KLEIN

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 15. Juni 1960)

Einleitung

Die von NISSL als „primäre Reizung“ bezeichnete Reaktion der Nervenzelle, die er an motorischen und sensiblen Nervenzellen feststellte, wenn er den peripheren Fortsatz durchtrennte, wird als Ausdruck einer Stoffwechselanpassung an die veränderten Lebensverhältnisse der Zelle angesehen. Diese zunächst nur aus der morphologischen Veränderung und der Beobachtung ihres zeitlichen Verlaufs geschlossene Deutung gewinnt durch moderne Untersuchungen immer mehr auch ein chemisches Fundament. Für unsere Vorstellungen sind die Untersuchungen über den Nucleoproteidstoffwechsel (CASPERSON; HYDEN u. a.) und die Ergebnisse biochemischer Untersuchungen an Zellfraktionen grundlegend geworden. Auch die am Stoffwechsel beteiligten Enzyme wurden untersucht. Neben Angaben über Art und Menge eines Enzyms ist die Kenntnis der Lokalisation in den einzelnen Zellbestandteilen wichtig. So hat die Feststellung, daß die Fermente des oxydativen Stoffwechsels, die oxydative Phosphorylierung und der Fettsäureabbau in den Mitochondrien lokalisiert sind, diese Zellorganellen sehr in den Vordergrund gerückt und damit eine Verbindung zur morphologischen Forschung hergestellt^{14,19}.

Die Enzyme machen als Proteine einen beträchtlichen Teil der Gesamtproteine der Zelle aus^{20,26} und unterliegen einem intensiven Eigenstoffwechsel, der unter normalen Verhältnissen so gesteuert ist, daß ein bestimmtes Aktivitätsniveau, d. h. eine bestimmte Menge des jeweiligen Enzyms, ständig für die Zelle zur Verfügung steht. Mit den biochemischen und histochemischen Methoden kann — methodisch bedingt — nur die

* Herrn Professor Dr. P. STÖHR und Frau Professor Dr. E. HAGEN (Bonn, Anatomisches Institut) danke ich für die Möglichkeit zur Benutzung des Kryostaten.

maximale Aktivität eines Enzyms festgestellt werden. Nach Berechnungen liegen die vorhandenen Enzymmengen der Zelle weit über den für den aktuellen Stoffwechselumsatz benötigten²⁶. Eine Anpassung der Zelle an eine veränderte Stoffwechselsituation dürfte darum zunächst ohne eine Vermehrung von Enzymen möglich sein. Rückschlüsse von der nachgewiesenen Enzymmenge auf die Höhe des intravital ablaufenden Stoffwechsels können daher nur sehr bedingt gezogen werden. Für die Untersuchung, ob bei sehr großer Anforderung nicht doch eine Steigerung einzelner Enzyme auftritt, was indirekt auf eine intravitale Stoffwechselsteigerung deuten würde, erweist sich die „primäre Reizung“ der Nervenzelle als sehr geeignet. Als vitale Reaktion mit der Möglichkeit der Rückbildung ist sie von äußeren Stoffwechseleinflüssen praktisch frei und gibt so ein Bild der selbständigen Anpassung der Zelle an eine veränderte Situation.

Wir wählten für unsere Untersuchung den Nachweis der Bernsteinsäuredehydrogenase an Spinalganglienzellen der Ratte nach Durchtrennung des N. ischiadicus. Die Bernsteinsäuredehydrogenase schien uns besonders geeignet, da sie als Teilferment des Citronensäurecyclus eine wichtige Rolle im oxydativen Stoffwechsel, der mit der Energiegewinnung der Zelle verbunden ist, einnimmt.

Material und Methode

Der Nachweis der Bernsteinsäuredehydrogenase (= Succinodehydrogenase = SD) wurde durch eine von SELIGMAN u. RUTENBURG angegebene Methode zur enzymhistochemischen Darstellung dehydrierender Fermente in frischen Gewebs schnitten mit Hilfe von Tetrazoliumsalzen möglich³⁷. In jüngster Zeit ist es gelungen, durch Abwandlungen der Methode auch verschiedene DPN- und TPN-abhängige Dehydrogenasen nachzuweisen^{11,30,31}. Nach biochemischen Untersuchungen stellt man sich den Transport des abgespaltenen Wasserstoffs über die zugehörigen Flavinenzyme vor, ehe er eine Reduktion des Tetrazoliumsalzes zum farbigen Formazan bewirkt².

Wir benutzten eine von NACHLAS et al. mitgeteilte Verbesserung des Nachweises der SD durch Verwendung eines neuen Tetrazoliumsalzes (Nitro-BT)²⁹. Die Methode hat dadurch an Empfindlichkeit gewonnen und ermöglichte z.B. im Nervengewebe den Nachweis einer zunächst nicht festgestellten Enzymaktivität in der Glia und den Satellitenzellen der Spinalganglien³³. Sie soll auch eine Darstellung der Mitochondrien erlauben²⁹.

Bei 26 männlichen und weiblichen ausgewachsenen Ratten wurde der rechtsseitige N. ischiadicus durchtrennt und ein etwa 1 cm langes Stückreseziert (Op. in Nembutal Abbot 0,15 ml). Die Abb. 1 orientiert über die anatomischen Verhältnisse und die Schnittstellen. Die im Bild angegebenen Variationen der Durchtrennung dienten dazu, die Spezifität der Veränderungen in den primär gereizten Ganglienzellen zu beweisen. Einmal hätten die beobachteten Veränderungen durch unspezifische Einflüsse bedingt sein können, zum anderen lassen sich selbst bei hoher Durchtrennung des Nerven nie alle Afferenzen ausschalten, so daß nie alle Zellen eine Veränderung zeigen (nur etwa 85%³⁵). Die vorgenommenen Variationen lassen die Aussage zu, daß die aufgetretenen Veränderungen der SD-Aktivität auf die Neurotomie des zugehörigen Axons zurückzuführen sind.

In einem Zeitraum von 2 Tagen bis zu 131 Tagen nach der Operation wurde das Verhalten der SD an den betroffenen Spinalganglien untersucht. Die Ganglien wurden den mit Leuchtgas getöteten Tieren lebenfrisch entnommen, sofort mit Kohlensäure eingefroren und innerhalb 1 Std in einem Kryostaten in Serien 14 μ dick geschnitten und auf Objektträger aufgenommen, wozu ein sehr kurzes Auftauen nötig war. Eine sofortige Inkubation war nicht möglich. Die fertigen Schnitte wurden 3–4 Std auf Kohlensäureschnee aufbewahrt, aufgetaut und dann mit der Inkubationslösung betropft. Die Schnitte wurden 60–70 min bei 38–40° C in einem Brutschrank inkubiert. Der Schrank hatte eine maximale Luftfeuchtigkeit, so daß ein Verdunsten der Inkubationsflüssigkeit und damit eine Änderung der Konzentrationen vermieden werden konnte. Diese Methode hat sich bei uns bewährt. Die angewandte Inkubationslösung bestand aus: 2 mg Nitro-BT, 1,0 ml Succinatnatrium 0,2 M sowie 3 ml Phosphatpuffer nach SÖRENSEN (0,2 M, pH 7,4–7,6).

Die Endkonzentration von 0,15 M Phosphatpuffer erwies sich uns nach Vorversuchen als die günstigste. Zur Inkubationslösung wurden meist zwei Tropfen 0,1 M KCN-Lösung hinzugefügt.

Um eine Darstellung der Mitochondrien zu verbessern, gaben wir bei einigen Versuchen in dem Gedanken, die auftretende Schwellung der Mitochondrien hinauszuzögern, ATP in einer Endkonzentration von 0,003 M zur Inkubationslösung hinzu^{7,28}.

Einen Vergleichsmaßstab für den Ausfall der Farbreaktion an den betroffenen rechtsseitigen Spinalganglien hatten wir an den entsprechenden, in gleicher Weise behandelten und mit derselben Inkubationslösung inkubierten linksseitigen normalen Spinalganglien. Darüber hinaus wurden zahlreiche Kontrollen der Enzymreaktion ausgeführt. Sie werden bei der Auswertung genauer besprochen.

Von den verarbeiteten Spinalganglien zweigten wir jeweils beim Auftauen einige Schnitte ab und färbten sie nach Fixierung mit Kresylviolett und Sudan Schwarz B (Fixierung nach REGAUD).

Die Schnitte mit der Enzymreaktion wurden nach der Inkubation in 0,9% NaCl-Lösung gewaschen, in 10% Formalin über Nacht fixiert und dann durch eine aufsteigende Alkoholreihe in Caedax eingebettet. Durch den Alkohol wird eine



Abb.1. Darstellung der verschiedenen Schnittstellen an der präparierten Ratte. I Normale Schnittführung, II Schnittführung bei den Kontrollen. Das distale Spinalganglion des N. ischiadicus zeigt keine Veränderung

geringfügig vorhandene rötliche Farbe aus den Schnitten herausgelöst. Sie soll durch Verunreinigung des verwandten Farbstoffes bedingt sein¹⁸. Die Darstellung der enzymaktiven Strukturen ändert sich dadurch nicht, wie ein Vergleich bei Gelatineeinbettung gezeigt hat. Im übrigen führt die Einbettung in Gelatine bei späterer zimmerwarmer Aufbewahrung der Präparate zu einem Kristallausfall, der die Schnitte für eine photographische Auswertung unbrauchbar macht.

Die von uns angewandte Technik (Kryostat), bei der die Schnitte gefroren und später wieder aufgetaut werden müssen, soll zu funktionellen Änderungen der Mitochondrien führen^{34,18}. Es ist bekannt, daß durch Kälte die oxydative Phosphorylierung entkoppelt wird, über die die Zelle die Energie zur Erhaltung ihrer Struktur gewinnt. Auch können notwendige Coenzyme durch das Auftauen herausgelöst werden. So nahe es lag, diese Schwierigkeiten durch eine Inkubation des ganzen, frisch entnommenen Spinalganglions zu umgehen, so enttäuschend waren die Versuche. Es waren keine brauchbaren Ergebnisse zu erzielen. Das liegt sicher zum großen Teil an der sehr geringen Penetrationsfähigkeit des Nitro-BT⁴. Bei unseren 14 μ dicken Schnitten bestand diese Gefahr nicht, so daß für die Reaktion der Farbstoff in genügender Konzentration am Reduktionsort vorhanden war. Biochemische Untersuchungen haben auch die Unempfindlichkeit der SD gegen Kälte gezeigt. Zu ihrer Wirksamkeit ist kein lösliches Coferment nötig. Die SD ist fest an die Struktur der Mitochondrien gebunden und ihre Aktivität ist auch an Bruchstücken der Mitochondrienmembran noch nachweisbar^{1,14,40}. Bei unserer Untersuchung spielte darum der Zustand der Mitochondrien für den Nachweis der Enzymaktivität keine entscheidende Rolle.

Ergebnisse

Die Aktivität der SD zeigt sich an normalen Spinalganglionzellen der Ratte als eine gleichmäßige, körnig-stäbchenförmige, dunkelblaue Anfärbung des Zellplasmas, während der Zellkern freibleibt (Abb. 4 u. 5). Dabei lassen sich bei der angewandten Inkubationszeit von 60—70 min auch deutlich kleinere farbstärkere Zellen von großen hellen Zellen unterscheiden, so daß die von der normalhistologischen Beobachtung her bekannte Unterteilung in „kleine dunkle“ und „große helle“ Zellen sich auch hier findet³⁵ (Abb. 2a, 3a). Die dargestellten Satellitenzellen der Ganglionzellen erkennt man an den freibleibenden Kernen, die kranzartig die Ganglionzelle umlagern. Sie liegen vor allem den großen Zellen so dicht an, daß es aussieht, als ginge das Plasma der Satellitenzellen in das der Nervenzellen über. Sie imponieren bei dieser Darstellung zusammen mit der Ganglionzelle als eine Einheit. Daß ein schmaler Randsaum dargestellter Aktivität die Satellitenzellen umschließt, kann man gut an Anschnitten der großen Nervenzellen sehen, wo die freibleibenden Kerne wie Vakuolen im Randgebiet liegen (Abb. 5). In den austretenden Axonen erkennt man im ganzen Verlauf reichlich längliche, in Axonrichtung gelegene und etwas gruppenartig angeordnete dunkelblaue Elemente, die nach ihrer Anordnung und Größe Mitochondrien entsprechen können. Sie zeichnen den Verlauf der Axone deutlich nach. Eine Aktivität der Schwannschen Zellen ist bei der angewandten Inkubationszeit nicht erkennbar; sie tritt bei längerer Inkubation aber auf.

Neben den enzymaktiven nervösen und den ihnen zugehörigen Strukturen findet sich eine Aktivität der SD auch in den Endothelzellen und

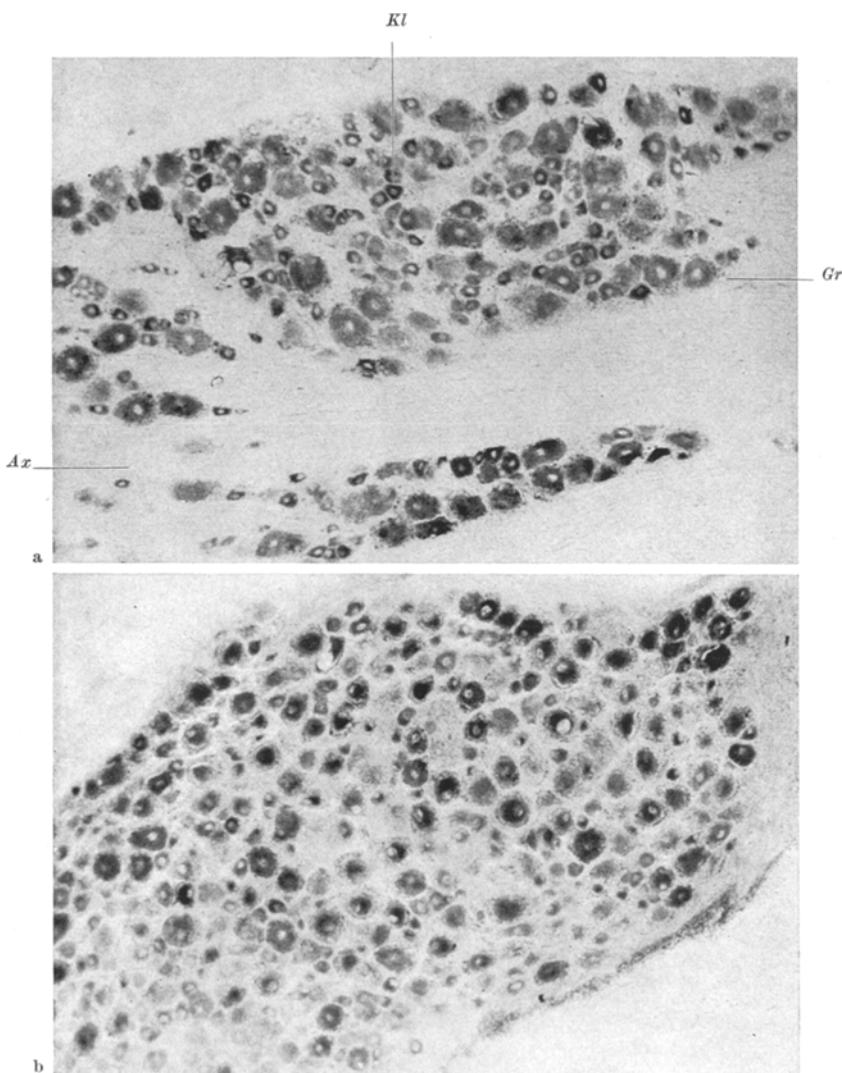


Abb. 2. a Spinalganglion. Bernsteinsäuredehydrogenase (SD). Normalbild: *Kl* kleine dunkle Zellen; *Gr* große helle Zellen mit Kranz von Satellitenzellen; *Ax* Axone. b Spinalganglion, SD, 21 Tage post operationem. Zunahme der Enzymaktivität und Konzentrierung um den Kern

den Muskelzellen größerer Gefäße als kappenartig den Kernen aufsitzende Granula.

Die mit ATP inkubierten Schnitte zeigen allgemein eine deutlich körnigere Darstellung im Zellplasma (Abb.4). Eine Steigerung der Farbintensität ist dagegen nur manchmal offensichtlich.

Bei allen Reaktionen traten dazu Ansammlungen schwärzlicher, oft länglicher Elemente im Zellplasma einzelner Nervenzellen auf (Abb.4). Abwandlungen der Inkubationslösung hatten keinen Einfluß darauf. Sie sollen hier nur festgehalten werden. Ihre mögliche Bedeutung wird später besprochen.

Die Veränderungen der Spinalganglienzellen im SD-Bild beginnen an den großen Zellen am 3. Tag post operationem mit einer leichten Veränderung der Färbung in den Randgebieten der Zelle. Am 4. Tag ist diese Veränderung deutlich erkennbar als eine Konzentrierung um den Zellkern. Eine Aktivitätszunahme — gemessen an der Farbintensität — ist noch nicht sichtbar. Diese Steigerung der Enzymaktivität tritt erst mit dem 6.—7. Tag hervor, wenn die Anhäufung um den Zellkern deutlich ausgeprägt ist und auch eine geringe Verlagerung des Zellkernes zum Rand hin ersichtlich wird. Die Enzymaktivität ist dann manchmal halbmondförmig betont um den Kern gelagert. Eine gewisse Randzeichnung der großen Zellen bleibt immer sichtbar und ist auf den schmalen Protoplasmasaum der Satellitenzellen zurückzuführen, die besser sichtbar werden (Abb.3 b). Eine Zunahme der Enzymaktivität in diesen Satellitenzellen ist nicht eindeutig festzustellen, ist aber an manchen Präparaten aus frühen Stadien wahrscheinlich, besonders bei Inkubation mit ATP zusammen. Die Aktivitätszunahme in den großen Spinalganglienzellen ist um den 10.—15. Tag besonders deutlich (Abb.3b). Der Zellkern liegt am Rand und wird von einer dunkelblauen Ansammlung des Reaktionsproduktes umfaßt. Eine körnige Darstellung ist dann nicht mehr erkennbar.

Etwa nach 3 Wochen zeichnet sich eine beginnende, langsame Abnahme der gesteigerten Enzymaktivität an manchen großen Zellen ab, wenn auch die Mehrzahl der großen Zellen noch weiterhin eine starke Aktivität zeigt. Die räumliche Anordnung der Reaktion in der Zelle weist keine Änderung auf. Um die 4. Woche ist dann ein Rückgang der Intensität bei einem Teil der großen Zellen eindeutig vorhanden (vgl. Abb.3 b u. 3 c). Man erkennt eine etwas breitere Lagerung um den Kern, so daß jetzt in der Übersicht ein gleichmäßigeres Bild des Spinalganglions vorhanden ist. Die Rückbildung betrifft aber nicht alle großen Zellen. Ein Teil zeigt die beschriebenen Veränderungen weiter in voller Ausbildung und mit intensiver Enzymaktivität. Auffällig ist eine geringe Verkleinerung einzelner großer Nervenzellen. In diesem Bild treten im Verlauf von Monaten (bis 131 Tage untersucht) nur noch gewisse, langsam hervortretende Veränderungen auf. So sinkt die Enzymaktivität in den betroffenen Zellen schließlich unter eine „normale“ Intensität ab.

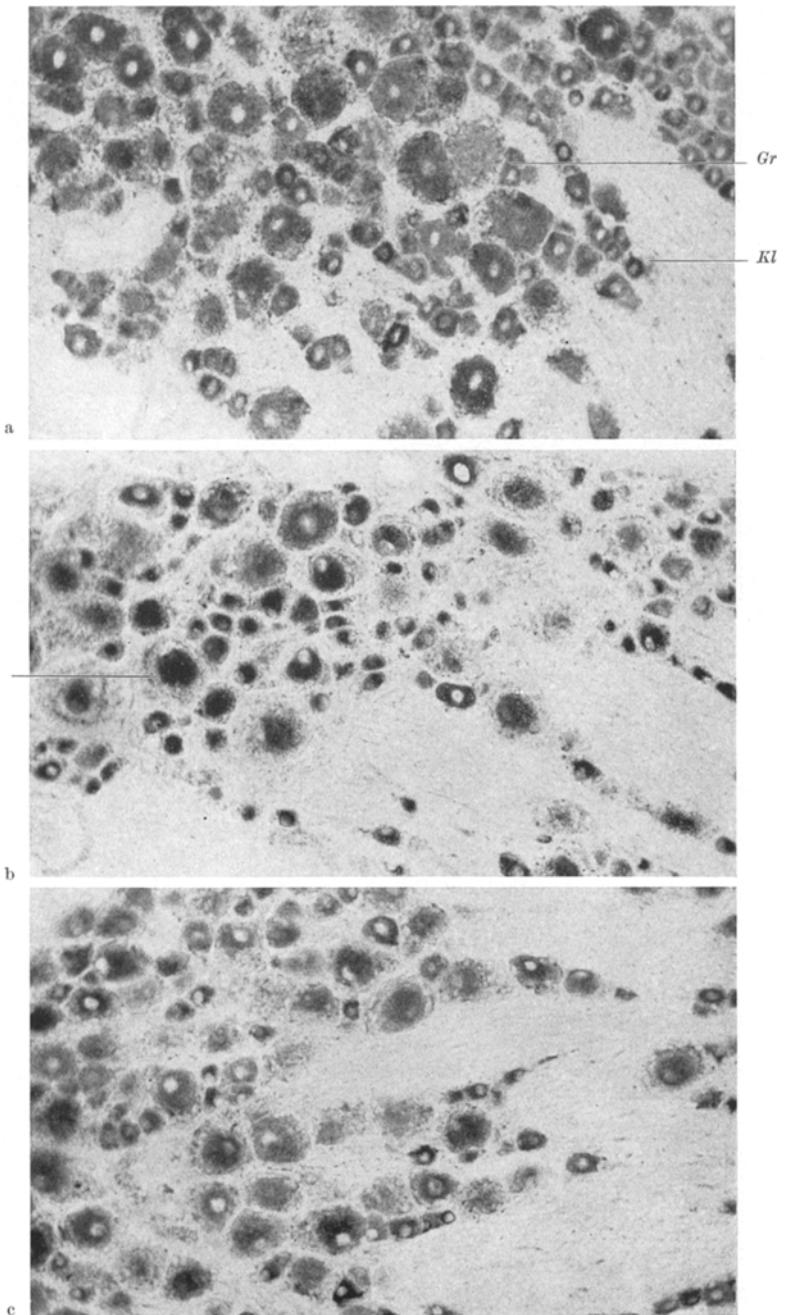


Abb.3. a Spinalganglion, Normalbild der SD, vgl. Abb.2a. b Darstellung der SD 13 Tage post operationem. Zunahme der Enzymaktivität in großen und kleinen Zellen. *Grs* große betroffene Zelle mit Randsaum. c 43 Tage post operationem. Langsame Abnahme der SD-Aktivität und „Normalisierung“ des Bildes an den großen Zellen

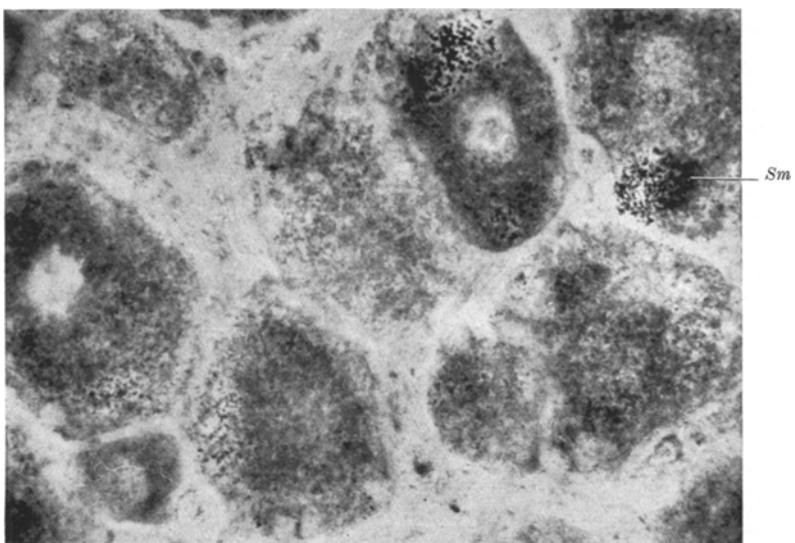


Abb.4. Spinalganglion, SD. Inkubation mit ATP. Unveränderte große Zellen. *Sm* schwärzliche Ansammlungen (Mitochondrien?)

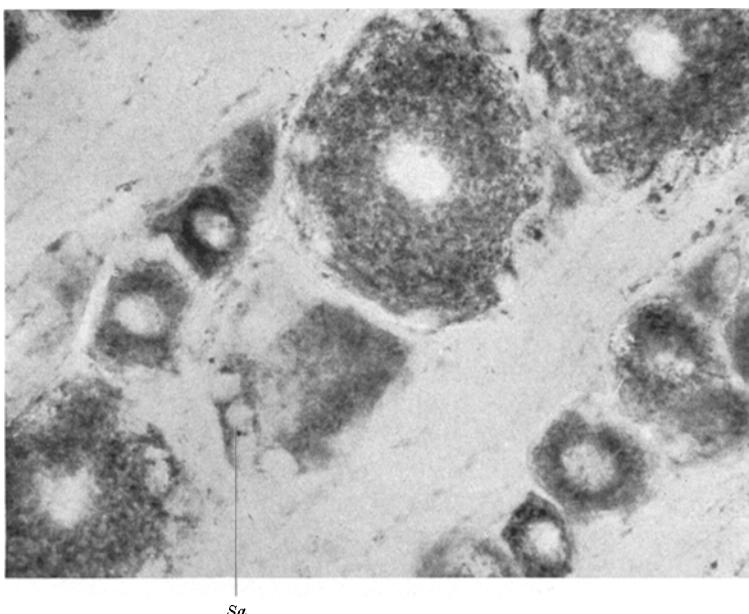


Abb.5. Spinalganglion, SD. Normale kleine und große Zellen. *Sa* Kerne der dicht anliegenden Satellitenzellen

Das wird im Übersichtsbild gut erkennbar. Die Kerne einer Anzahl großer Zellen verlagern sich wieder zur Mitte und man sieht auch fast normale, oft allerdings etwas verkleinerte Zellen. Ein Randsaum ist vielfach noch vorhanden. Einzelne große Zellen scheinen auch völlig geschwunden zu sein.

Die kleinen, auch im SD-Bild dunkler gefärbten Ganglienzellen zeigen ein wesentlich eintönigeres Verhalten, doch ist es grundsätzlich mit dem der großen Zellen vergleichbar.

Schon am 2. Tag — also noch vor den großen Zellen — läßt eine große Anzahl kleiner Zellen eine halbmondförmige Konzentrierung der farbigen Granula um den randständigen Kern erkennen. Die Farbintensität ist zum Rand der Zelle abgemindert. Diese Veränderung ist am 3. Tag praktisch in allen kleinen Zellen vorhanden. Zugleich zeigt sich eine Zunahme der Enzymaktivität, die sich in den folgenden Tagen noch steigert (Abb. 3 b). Diese Reaktion der kleinen Zellen bleibt bis zur 3. Woche in gleicher Ausprägung erhalten. Von da an macht sich eine beginnende gleichmäßig farbschwächere Darstellung der kleinen Zellen bemerkbar. Vereinzelt besteht auch der Eindruck, daß kleine Zellen ausgefallen sind. Etwa nach 45 Tagen wird diese Verminderung deutlicher. Nach 70 Tagen ist sie ausgeprägt vorhanden. Damit gleichlaufend erkennt man eine Abnahme der Enzymaktivität in den noch erhaltenen kleinen Zellen. Sie behalten aber überwiegend ihre veränderte Form mit dem randständigen Kern. Der Zellausfall in späten Stadien wird im Nissl-Vergleichsbild deutlich an der lockeren Lagerung der erhaltenen Zellen und den Satellitenzellnestern.

In den Axonen tritt in der Nähe des Spinalganglions eine Änderung der Enzymaktivität nicht auf. Nur bei hoher Durchtrennung des Nerven kurz nach dem Austritt aus dem Wirbelkanal findet sich oberhalb der Schnittstelle als axonale Reaktion eine eindeutige Verbreiterung der Axone mit Vermehrung der dargestellten mitochondrienähnlichen Granula. Hierbei werden auch die Schwannschen Zellen sichtbar.

Besprechung

Ehe eine Deutung der Befunde gegeben wird, soll auf Kontrollen der Enzymreaktion eingegangen werden. Sie hatten zum Ziel, durch entsprechende Variationen der Inkubation die schon angeführten Überlegungen und Bedenken gegen die Methode zu zerstreuen und damit eine größere Sicherung der Befunde zu erreichen.

Die Inaktivierung der Schnitte durch Hitze (Wasser 80° C 10 min) und die Anwendung von Malonsäure (0,1 M) bei der Inkubation führten zu dem zu erwartenden negativen Ausfall der Reaktion. Eine Inkubation ohne Zugabe von Succinat als Substrat ergab dagegen farbkräftige Bilder wie bei normaler Inkubation. Wurden die Schnitte mit 0,9%

NaCl oder 0,15 M Phosphatpufferlösung (etwa 10 min) ausgewaschen, zeigte eine Inkubation ohne Substrat praktisch keine Darstellung mehr. Inkubierte man jedoch die ausgewaschenen Schnitte in einer normalen Inkubationslösung mit Succinat, waren die Spinalganglienzellen und die übrigen Strukturen wie gewöhnlich dargestellt, so daß bei der normalen Inkubation (ohne Auswaschen) endogen vorhandenes Substrat beteiligt sein muß.

Der Ausfall der Reaktion war unabhängig von einem Trocknen der Schnitte nach dem Auftauen. Kontrollen wurden bis zu 45 min durchgeführt. Bei den Versuchen wurde jedoch auf eine möglichst kurze Zeit Wert gelegt.

Von der SD ist eine feste Bindung an die Mitochondrien und eine ziemliche Indifferenz gegen äußere Einflüsse bekannt. Die Kontrollen, zusammen mit der spezifischen Hemmung durch Malonsäure, lassen sich darum nur so deuten, daß die SD die wasserstoffliefernde Reaktion für die Reduktion des Tetrazoliumsalzes katalysiert hat. Der durch biochemische Untersuchungen belegte Ablauf der Reduktion der Tetrazoliumsalze in der Zelle über die Flavinenzyme macht diese Aussage zunächst etwas fraglich. Aus diesem Grunde vermeiden manche Untersucher eine genaue Festlegung und sprechen nur von einer enzymatischen Reduktionswirkung der Zelle. Die Beteiligung der Flavinnucleotide an der Reaktion gewinnt aber einen anderen Aspekt, wenn man Untersuchungen heranzieht, die als wirksame Gruppe bei der SD ein fest verbundenes Flavinnucleotid wahrscheinlich gemacht haben^{31a}. Die Sonderstellung der SD — ihre Unabhängigkeit von den Flavinnucleotiden die in den Weg des Wasserstoffes von den Dehydrogenasen mit löslichem Coferment zu den Cytochromen eingeschaltet sind — ist daher möglicherweise nur scheinbar. Die Dehydrogenasen, die auf ein lösliches Coferment angewiesen sind, finden sich auch in großer Zahl in den Mitochondrien. Ihr Nachweis ist bei der angewandten Kryostatmethode aber von einer Zugabe von Coferment und reichlich entsprechendem Substrat abhängig, da das Frieren und Auftauen der Schnitte zu einer funktionellen Änderung der Mitochondrien führt³⁴. Die nachgewiesene Dehydrogenaseaktivität bei unseren Versuchen dürfte darum nur der SD zuzuschreiben sein.

Die Enzymdarstellungen zeigen eine Aktivitätszunahme der SD an den betroffenen Spinalganglienzellen. Sie ist bei den großen Zellen nach etwa 10—15 Tagen voll ausgeprägt und nimmt um die 4. Woche wieder ab, wobei einzelne Zellen mehrere Monate nach der Operation noch eine Steigerung erkennen lassen. Die von einigen Untersuchern betonte Empfindlichkeit und rasche Reaktion der kleinen Spinalganglienzellen nach Durchschneidung ihres peripheren Axons haben wir auch gesehen^{5,25}. Schon nach 2 Tagen ist eine Randständigkeit des Kernes und

halbmondförmige Anhäufung der Enzymaktivität vorhanden. Sie nimmt bis zum 4. Tag zu, um nach etwa 4 Wochen langsam abzunehmen. Auffällig ist der zahlenmäßig starke Ausfall der kleinen Zellen in späten Beobachtungsstadien.

Das Bild des Aktivitätsverhaltens der SD in den Spinalganglienzellen rundet sich ab durch die Befunde an den übrigen Strukturen. Durch zahlreiche frühere histologische Untersuchungen wird eine Stoffwechselbeziehung zwischen den spinalen Nervenzellen und ihren Satelliten für wahrscheinlich gehalten³⁵. Wir haben in frühen Stadien, vor allem bei Inkubation mit ATP zusammen, eine bessere und aktiver Darstellung der Satellitenzellen an den betroffenen Spinalzellen gesehen. Sie scheint uns aber nicht so zweifelsfrei, daß darauf auf eine eindeutige Beziehung zwischen einer Axondurchtrennung an der Nervenzelle und dem Stoffwechsel der Satellitenzellen geschlossen werden kann. Vielleicht lassen sich diese Verhältnisse bei einer anderen Tierspecies leichter und sicherer klären.

Die Verbreiterung der Axone oberhalb der Schnittstelle ist als axonale Reaktion bekannt und wird auf eine Schwellung zurückgeführt³. Eine Zunahme der Enzymaktivität an dieser Stelle, wie wir sie fanden, wurde auch von FRIEDE beim Nachweis der SD gesehen¹³. Bei einer Kompression der Fasern sah er eine Anhäufung oberhalb dieser Stelle, während unterhalb keine Enzymaktivität nachweisbar war. Er schließt daraus auf eine Wanderung des Enzyms im Axon (vgl. WEISS).

Die Lokalisation der SD in den Mitochondrien der Zelle ist durch Untersuchungen an Zellhomogenaten gesichert. Die ausgezeichneten Eigenschaften des neuen Farbstoffes Nitro-BT ermöglichen gleichzeitig mit dem Nachweis der SD eine Darstellung der Mitochondrien. Dafür sprechen auch die morphologischen Beobachtungen bei unseren Versuchen. Die Mitochondrien sind — auch nach elektronenoptischen Untersuchungen⁶ — in den Spinalganglienzellen der Ratte relativ klein, von ovalärer Gestalt und sehr zahlreich¹⁰. In den Axonen dagegen sind sie länglich und etwas gruppenartig in Richtung des Faserverlaufes angeordnet. Die gleichen Formunterschiede zeigen die mit dem Enzymnachweis dargestellten Zellelemente. Ein gewisser Anklang an Silberimprägnationen ist nicht zu erkennen. Da die Quellung der Mitochondrien durch ATP verhindert werden kann, spricht auch die schärfere Darstellung im Plasma der Spinalganglienzelle nach Inkubation mit ATP für diese Behauptung. Ein weiteres Indiz gibt nach unserer Auffassung die Färbung der Schnitte mit Sudan Schwarz B (bei Fixierung nach REGAUD) (Abb. 6 b). Es finden sich hier eine körnige Darstellung und die gleichen topischen Änderungen der körnigen Elemente wie in den betroffenen Spinalganglienzellen beim Nachweis der SD. ORTMANN hat die Anreicherung von mit Sudan Schwarz dargestellten Lipoiden

im Zentrum primär gereizter Nervenzellen unter experimentellen Bedingungen schon beschrieben³². Da der hohe Lipoidgehalt der Mitochondrien seit langem bekannt ist, sehen wir in den Befunden von

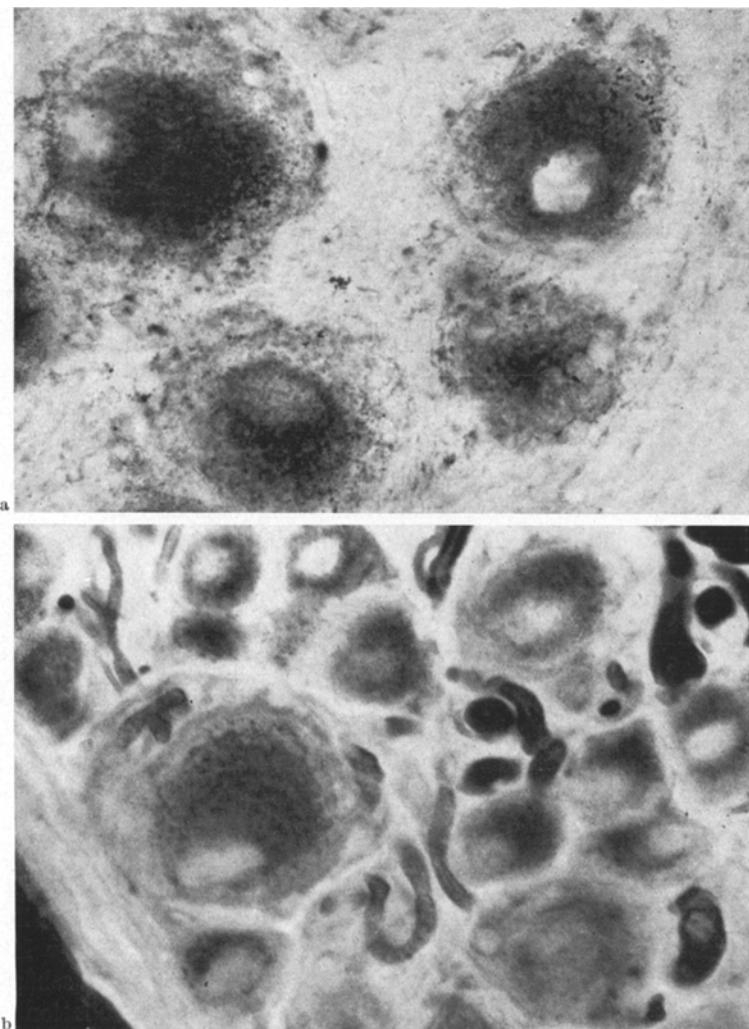


Abb. 6. a Spinalganglion, SD. Große betroffene Zellen 28 Tage post operationem. Steigerung der Enzymaktivität und Anhäufung um den randständigen Kern. b Spinalganglion, Sudan Schwarz B. Große und kleine betroffene Zellen 38 Tage post operationem

OETMANN ein Äquivalent für unsere Darstellung der Mitochondrien beim Nachweis der SD.

Die beschriebene Konzentrierung der SD-Aktivität um den Kern der betroffenen Nervenzellen muß als eine Anhäufung der Mitochondrien angesehen werden. Sie ist als Folge einer Axondurchtrennung schon oft beschrieben worden und konnte auch elektronenoptisch an den Spinalganglienzellen der Ratte gezeigt werden⁶. Ob gleichzeitig eine Zunahme der Mitochondrien an Zahl stattfindet, konnten wir bei der relativen Dicke der Schnitte nicht entscheiden. Für die motorischen Nervenzellen wird sie nach neueren Untersuchungen bejaht, für die sensiblen Spinalganglienzellen dagegen verneint (HARTMANN^{15,17}). Daß die Aktivitätszunahme der SD nicht durch die Anhäufung der Mitochondrien um den Kern vorgetäuscht wird, lassen die farbkärtigen Bilder der betroffenen Spinalganglienzellen deutlich erkennen.

Die Ansammlungen schwärzlicher, oft etwas länglicher Elemente in vielen Zellen deuten wir mit aller Vorsicht als vom Farbstoff besonders gut dargestellte Mitochondrien. Ob daraus Schlüsse auf eine besondere funktionelle Bedeutung gezogen werden dürfen, können wir nicht sagen. Sicher sind diese Ansammlungen keine Formazankristalle.

Unsere Beobachtungen können wir an etwa 1500 Schnitten von Spinalganglien der Ratte in einem Zeitraum von 2–131 Tagen nach der Operation belegen. Sie lassen sich in die Vorstellung von einer intensiven Stoffwechselsteigerung der Nervenzelle als Reaktion auf die Durchtrennung des peripheren Fortsatzes ohne weiteres einordnen. Da die SD ein wichtiges Teilferment des Citronensäurecyclus und damit der Atmung der Zelle ist, läßt sich aus der Steigerung der SD-Aktivität mit Berechtigung auf eine Steigerung des oxydativen Stoffwechsels schließen, der für die Energiegewinnung der Zelle von großer Wichtigkeit ist. Das Ausmaß dieser Steigerung kann aus der Zunahme der SD nur ungefähr abgelesen werden, da der begrenzende Faktor des gesteigerten oxydativen Stoffwechsels nicht in der vorhandenen, vermehrten Aktivität der SD zu liegen braucht. Es scheint berechtigt, anzunehmen, daß die Zelle bei einer so gesteigerten Stoffwechselleistung, wie sie die Axondurchtrennung fordert, die Anpassung der Enzymaktivitäten nicht wesentlich über das erforderliche Maß hinaus vornimmt. Als Ausdruck einer unzureichenden Anpassung infolge Überforderung der Zelle kann unter diesem Gesichtspunkt der Untergang zahlreicher, vor allem kleiner Zellen angesehen werden.

Für eine starke Stoffwechselsteigerung der primär gereizten Nervenzelle spricht auch die topische Änderung der SD-Aktivität in der Zelle. Die damit gezeigte Anhäufung der Mitochondrien um den Kern unterstreicht die bekannte Funktion des Kernes bei der Eiweißsynthese.

Unsere Beobachtungen wurden an den sensiblen Nervenzellen der Spinalganglien gemacht. FRIEDE hat nun mit einer nur geringfügig abgewandelten Methode an motorischen Nervenzellen nach Axonunter-

brechung eine Abnahme der SD festgestellt¹². Das steht in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen von HOWE u. MELLORS²², die ebenfalls an motorischen Vorderhornzellen nach Axondurchtrennung eine Abnahme der Cytochromoxydaseaktivität fanden. Die Cytochromoxydase gehört wie die SD zu den Atmungsfermenten der Zelle und findet sich auch in den Mitochondrien²¹. Wie diese unterschiedlichen Befunde an sensiblen und motorischen Nervenzellen in Übereinstimmung gebracht werden können, ist vorerst nicht sichtbar. Die Überlegung, es könne darin ein Hinweis auf einen Unterschied der primären Reizung an sensiblen und motorischen Nervenzellen zu sehen sein, erscheint vorläufig als reine Spekulation.

Für die Spinalganglien gewinnen unsere Beobachtungen vielleicht noch an Gewicht, wenn man die aus unserem Institut veröffentlichten Ergebnisse über das Verhalten der sauren Phosphatase (sP) an Spinalganglienzellen damit vergleicht⁸. Die Änderungen der sP gleichen in ihrem zeitlichen Ablauf dem Verhalten der SD. Auch die Beschreibung der topischen Veränderungen an den großen und kleinen Zellen stimmt in ihren wesentlichen Zügen mit der bei der SD überein. Das wird noch deutlicher, wenn man die Spinalganglien bei der Darstellung der sP nur etwa 15—20 min inkubiert. Auf Grund der gesicherten Lokalisation der SD in den Mitochondrien läßt sich daraus nur der Schluß ziehen, daß auch die sP entgegen der noch von COLMANT in Übereinstimmung mit vielen früheren Untersuchern für wahrscheinlich gehaltenen Lokalisation im Zellplasma in den Mitochondrien der Spinalganglienzellen gelegen ist. Untersuchungen an Zellfraktionen konnten trotz der leichten Löslichkeit des Fermentes einen großen Teil der sP immer an den Mitochondrien nachweisen^{9,19}. Über die Rolle der sP im Stoffwechsel der normalen und primär gereizten Nervenzelle lassen sich keine weiteren Aussagen machen.

Zusammenfassung

In den Spinalganglien der Ratte läßt sich nach Durchschneidung des N. ischiadicus eine Zunahme der Bernsteinsäuredehydrogenase-Aktivität zeigen. Sie ist nach 10—15 Tagen an den großen, nach 4 Tagen an den kleinen Zellen voll ausgeprägt, hält etwa bis zur 4. Woche nach der Durchtrennung an und nimmt dann sehr langsam ab. Ein Teil der großen Spinalganglienzellen behält die Aktivitätssteigerung jedoch über Monate bei. Bei den erhaltenen kleinen Zellen — sie gehen in großer Zahl zugrunde — ist die spätere Abnahme allgemein vorhanden. Der Aktivitätszunahme der Bernsteinsäuredehydrogenase ist eine Wanderung der Mitochondrien zum Kern hin beigeordnet. Aus dem Verhalten der Bernsteinsäuredehydrogenase-Aktivität muß auf eine vorübergehende Steigerung des oxydativen Stoffwechsels der Spinalganglienzellen bei der primären Reizung nach Axondurchtrennung geschlossen werden.

Literatur

- ¹ BARNETT, R. J., and G. E. PALADE: Histochemical Demonstration of the sites of activity of Dehydrogenase Systems with the electron microscope. *J. biophys. biochem. Cytol.* **3**, 577 (1957).
- ² BRODIE, A. F., and I. S. GOTTS: Effects of an isolated dehydrogenase system and flavoprotein on the reduction of triphenyltetrazolium chloride. *Science* **114**, 40 (1953).
- ³ CAJAL, S.: zit. nach SCHOLZ, W.: *Hdb. der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie*, XIII, 1, S. 122.
- ⁴ CASCARANO, J., and B. W. ZWEIFACH: In vitro-studies of the metabolism of tissue slices. I. Metabolic and physical factors influencing the penetration of tetrazolium salts. *J. biophys. biochem. Cytol.* **6**, 215 (1959).
- ⁵ CAVANAUGH, M. W.: Quantitative Effects of the peripheral Innervation area on nerves and spinal ganglion cells. *J. comp. Neurol.* **94**, 181 (1951).
- ⁶ CERVÓS-NAVARRO, J.: Persönliche Mitteilung.
- ⁷ CLELAND, K. W.: *Nature (Lond.)* **170**, 497 (1952); zit. nach SLATER, E. C.
- ⁸ COLMANT, H. J.: Aktivitätsschwankungen der sauren Phosphatase im Rückenmark und den Spinalganglien der Ratte nach Durchschneidung des Nervus ischiadicus. *Arch. Psychiat. Nervenkr.* **199**, 60 (1959).
- ⁹ DUVE, CH. DE: The enzymic Heterogeneity of Cell fractions isolated by differential centrifuging. In: *Mitochondria and other Cytoplasmic Inclusions*. Cambridge 1957, S. 50.
- ¹⁰ DEMPSEY, E. W.: Variations in the Structure of Mitochondria. *J. biophys. biochem. Cytol.* **2**, Suppl. 4, 305 (1956).
- ¹¹ FARBER, E., W. H. STERNBERG and C. E. DUNLAP: Histochemical localization of specific oxydative enzymes. *J. Histochem. Cytochem.* **4**, 254, 284 (1956).
- ¹² FRIEDE, R. L.: Histochemischer Nachweis von Succinodehydrogenase in Biopsien von menschlichem Hirngewebe. *Virchows Arch. path. Anat.* **332**, 216 (1959).
- ¹³ FRIEDE, R. L.: Histochemical Demonstration of Enzyme movements in injured nerve Fibers. *J. Neuropath. exp. Neurol.* **19**, 143 (1960).
- ¹⁴ GREEN, D. E.: Organization in Relation to Enzymic function. In: *Mitochondria and other cytoplasmic Inclusions*. Cambridge 1957, S. 30.
- ¹⁵ HARTMANN, I. F.: Changes in mitochondrial content of nerve cells bodies following axon section. *Anat. Rec.* **97**, 390 (1947).
- ¹⁶ HARTMANN, I. F.: Electron Microscopy of Mitochondria in the Central nervous System. *J. biophys. biochem. Cytol.* **2**, Suppl. 4, 375 (1956).
- ¹⁷ HARTMANN, I. F.: In: *Hdb. der mikroskopischen Anatomie des Menschen*. Bd. IV/4, S. 111. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1959.
- ¹⁸ HESS, R., D. G. SCARPELLI and A. G. E. PEARSE: The cytochemical localization of oxidative enzymes. II. Pyridine-nucleotide-linked Dehydrogenases. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 753 (1958).
- ¹⁹ HIRSCH, G. CH.: Allgemeine Stoffwechselmorphologie des Cytoplasmas. In *Hdb. der Allg. Pathologie*, II/1, 92ff. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1955.
- ²⁰ HOFFMANN-OSTENHOF, O.: *Enzymologie*. Wien 1954.
- ²¹ HOGEBOOM, G. H., W. C. SCHNEIDER and G. E. PALADE: Cytochemical studies of mammalian tissues. — I. Isolation of intact mitochondria. *J. biol. Chem.* **172**, 619 (1948).
- ²² HOWE, H. A., and R. C. MELLORS: Cytochrome Oxidase in Normal and Regenerating Neurons. *J. exp. Med.* **82**, 489 (1945); zit. nach ROIZON, L. — Oxidases and Peroxidases of the Central nervous System. *J. Neuropath. exp. Neurol.* **14**, 47 (1955).
- ²³ HYDEN, H.: Biochemical Changes in Glial Cells and Nerve Cells at varying Activity. *Proc. 4. Internat. Congress of Biochemistry*, London, New York, 1959, S. 64.

- ²⁴ JACOB, H.: Sekundäre retrograde und transsynaptische Degeneration. Hdb. der spez. Pathologie und Anatomie, XIII/1, S. 266. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1957.
- ²⁵ KURE, K., S. MURAKAMI u. S. OKONAKA: zit. nach ²⁴.
- ²⁶ LANG, K.: Die Biologie der Enzyme. In Biologie und Wirkung der Fermente. 4. Colloquium der Ges. f. Physiol. Chemie. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1953.
- ²⁷ LANG, K.: Die Fermentsysteme der Zelle. Klin. Wschr. **33**, 300 (1955).
- ²⁸ LEHNINGER, A. L., B. L. RAY and M. SCHNEIDER: The Swelling of rat liver Mitochondria by Thyroxine and its Reversal. J. biophys. biochem. Cytol. **5**, 97 (1959).
- ²⁹ NACHLAS, M. M., K. C. TSOU, E. DE SOUZA, C. S. CHENG and A. M. SELIGMAN: Cytochemical Demonstration of Succinic Dehydrogenase by the use of a new p-Nitrophenyl substituted Ditetrazole. J. Histochem. Cytochem. **5**, 420 (1957).
- ³⁰ NACHLAS, M. M., D. G. WALKER and A. M. SELIGMAN: The Histochemical Localization of Triphosphopyridine Nucleotide Diaphorase. J. biophys. biochem. Cytol. **4**, 467 (1958).
- ³¹ NACHLAS, M. M., D. G. WALKER and A. M. SELIGMAN: A histochemical Method for the Demonstration of Diphosphopyridine Nucleotide Diaphorase. J. biophys. biochem. Cytol. **4**, 29 (1958).
- ^{31a} OPITZ, E., u. D. LÜBERS: In: Hdb. der allg. Pathologie, IV/2, Stoffwechsel, II, 395: Allgemeine Physiologie der Zell- und Gewebsatmung. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1957.
- ³² ORTMANN, R.: Über die Einförmigkeit morphologischer Reaktionen der Ganglionzellen nach experimentellen Eingriffen. Dtsch. Z. Nervenheilk. **167**, 431 (1952); zit. nach SCHOLZ, W.
- ³³ POTANOS, J. N., A. WOLF and D. COWEN: Cytochemical Localization of oxidative Enzymes in human nerve cells and neuroglia. J. Neuropath. exp. Neurol. **18**, 627 (1959).
- ³⁴ SCARPELLI, D. G., R. HESS and A. G. E. PEARSE: The Cytochemical Localization of oxidative Enzymes. I. DPN-Diaphorase and TPN-Diaphorase. J. biophys. biochem. Cytol. **4**, 747 (1958).
- ³⁵ SCHAREF, J. H.: Sensible Ganglien. Hdb. der mikroskopischen Anatomie des Menschen, IV/3, S. 177 und S. 295. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1958.
- ³⁶ SCHOLZ, W.: Für die allgemeine Histopathologie degenerativer Prozesse bedeutsame morphologische, histochemische und strukturphysiologische Daten. Hdb. der spez. path. Anatomie und Histol. XIII/1. S. 42. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1957.
- ³⁷ SELIGMAN, A. M., and A. M. RUTENBURG: The histochemical demonstration of succinic dehydrogenase. Science **118**, 317 (1951).
- ³⁸ SLATER, E. C.: Sarcosomes. In: Mitochondria and other cytoplasmic Inclusions. Cambridge 1957, S. 110.
- ³⁹ WATSON, M. L., and P. SIEKEVITZ: Cytochemical Studies of Mitochondria. J. biophys. biochem. Cytol. **2**, 639, 653 (1956).
- ⁴⁰ WATSON, M. L., and P. SIEKEVITZ: The Isolation and Analysis of a mitochondrial membrane fraction. J. biophys. biochem. Cytol. **2**, Suppl. 4, 379 (1956).
- ⁴¹ WEISS, P.: Damming of Axoplasma in constricted nerve: sign of perpetual growth in nerve fibers. Anat. Rec. Suppl. **88**, 48 (1944); zit. nach ²⁴.
- ⁴² ZEIGER, K.: Morphologie des Cytoplasmas. Hdb. der allg. Pathologie II/1, S. 17. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1955.

Dr. H. KLEIN,
Universitäts-Nervenklinik, Freiburg/Br., Hauptstr. 5