

(Aus dem Pathologisch-anatomischen Institut des Kiewer Medizinischen Reichsinstitutes. [Ukraina.])

Über die Metachromasie des Glykogens bei Färbung mit basischen Anilinfarben¹⁾.

Von

Prof. Dr. med. P. Kutscherenko.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 5. Januar 1924.)

„... Diese im Grunde doch noch sehr hypothetischen Erörterungen werden erst dann eine sichere faktische Stütze erlangen, wenn durch Lösung des Mucins die charakteristische Färbung der zurückbleibenden Substanz aufgehoben wird und daß der gelöste Stoff auch in isoliertem Zustande dasselbe Färbungsvermögen bewahrt wie in gebundenem.“

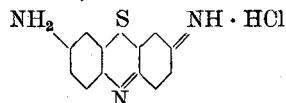
Prof. Hoyer, Arch. f. mikroskop. Anat., 1890.

Das Wesen der Metachromasie, welches zuerst von Prof. P. Ehrlich im Jahre 1877 beschrieben wurde, besteht nach heutigen Begriffen (Michaelis) darin, daß eine Anzahl von gewissen Bildungen, die wahrscheinlich leichtsaure Eigenschaften besitzen, sich in Farben der Basen einiger Anilinfarben färben.

Solcher Farben kennen wir heutzutage recht viel: eine Anzahl von violett-methylierten Para- und Rosanilinen (Dahlia, eine Anzahl von Violett: Gentiana-, Methyl- und Krystallviolett), Methylenazur, eine Anzahl von Otacinen (Otonin, Kresylviolett K. extra und K. K.), Thiazinen-Thionin, Tolidinblau.

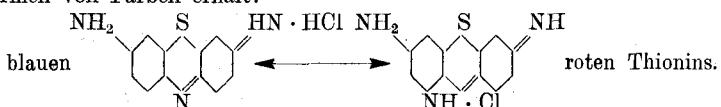
Zur Metachromasiereaktion ist, wie bekannt, das Thionin, welches zuerst zu diesem Zwecke von Prof. Hoyer im Jahre 1890 angewendet wurde, am meisten geeignet und aufs wärmste zu empfehlen.

Das Thionin, wie bekannt, stellt ein methyliertes Thiazin dar, das folgende Formel enthält (Hoyer, Michaelis):



¹⁾ Berichtet auf einer zur Erinnerung an den verstorbenen Prof. W. Wyssokowic veranstalteten Sitzung der ärztlichen Gesellschaft zu Kiew am 13. V. 1914.

Es wird angenommen, daß bei der Metachromasireaktion in dem Molekül des Thionins eine neue Gruppierung der Atome stattfindet, indem man solche tautomeren Formen von Farben erhält:



Die vorteilhaftesten Bedingungen zur Gewinnung einer Metachromasireaktion mit Thionin bestehen in dem vorzukommenden Fixieren der Gewebe in Sublimatlösung und einer ferneren Behandlung der Schnitte ebenfalls mit Sublimat (*Hoyer*).

Über die Wichtigkeit und das Wesen der Wirkung des Sublates sind wir mit Sicherheit noch nicht ganz im klaren.

Prof. *Hoyer* nimmt an, daß in dieser Hinsicht das Sublimat die Wirkung des Thionins verstärkt, doch nicht als solches allein, sondern nur dank seiner leichtsauren Eigenschaften.

Weiter kennen wir gegenwärtig eine Anzahl von Bildungen, die bei Färbung mit den erwähnten Farbstoffen sog. Metachromasireaktion liefern.

Ich werde nun diese Anzahl nach der Schärfe der Reaktion ordnen:
1. Schleim, 2. Knorpel, 3. Amyloid, 4. Granulationen der Mastzellen,
5. Bindegewebe, 6. markhaltige Nerven, 7. Achsenzyylinder (*Michaelis*) und
8. zuweilen Granulationen der weißen Blutkörperchen (*Czerny, Lubarsch*).

Wie bekannt, besteht das eigentliche Auftreten der Metachromasie darin, daß bei Färbung mit wasserhaltigen Lösungen einer der oben aufgezählten Farben der entsprechende Stoff sich rot, das übrige Gewebe sich aber bläulich oder blau färbt.

Von den oben aufgezählten Stoffen besitzen eine deutliche Metachromasireaktion nur die ersten fünf, mit den übrigen erhält man sie nicht recht deutlich genug und auch nicht regelmäßig.

Von oben erwähnten Bildungen verdient eine besondere Erwähnung das Amyloid, das, wie bekannt dem Anscheine nach Körper von unbeständiger chemischer Zusammensetzung darstellt, nicht immer Chondroitinschwefelsäure enthält und nicht stets und auch nicht in gleichem Grade die Eigenschaft besitzt, eine Metachromasireaktion zu geben.

Ohne ausführlich auf die Frage nach dem Ursprunge und Natur des Amyloides einzugehen, erlaube ich mir auf folgendes Verhältnis hinzuweisen: daß wir dank der Anstrengungen einer großen Anzahl von Forschern, hauptsächlich Prof. *Schmiedebergs* und *N. Krawkows*, zur Zeit dennoch ziemlich nahe der Kenntnis der wahren Natur des Amyloids stehen.

Wir wissen, daß das Amyloid fast immer Chondroitinschwefelsäure enthält, welches die Metachromasireaktion bedingt, wissen, daß eines

der Produkte der Zerspaltung dieser Säure, das sog. Chondrosin, einen in Wasser sich auflösbarer Stoff bildet, welcher eine einbasische Säure mit folgender Formel $C_{12}H_{21}NO_{11}$ darstellt und eine Analogie mit Gummi hat. Von einigen Eigentümlichkeiten dieses Stoffes bezeichne ich die mangelhafte Wiederherstellung des Kupferoxyds und die Fähigkeit, die Polarisationsebene rechts zu drehen, was diesen Stoff einigermaßen den Kohlenhydraten lebenden Ursprungs anzunähern ermöglicht. Weiter wissen wir, daß im Organismus lebender Wesen eine enorme Verbreitung die sog. komplizierten Eiweiße — *Hoppe-Seylers* Proteide — haben, welche in ihrem Molekül ein Kohlenhydratkomplex enthalten. Wie bekannt, gehören zu solchen komplizierten Eiweißen die Mucine und Mucoide.

Jetzt wissen wir vom Dasein einer ganzen Reihe von Mucinen und Mucoiden, welche man aus Knochengewebe, Knorpel, Bänder und Haut, überhaupt aus Stoffen, welche den komplizierten Eiweißen nahestehen, erhalten hat und welche durch den Gehalt von Glykosaminen gekennzeichnet sind (*E. Abderhalden, O. Hammarsten*). Der Charakter der kohlenhydratischen Gruppe, welcher im Bestand des Moleküls komplizierter Eiweiße vorkommt, ist noch nicht klar genug.

Wie *E. Müller* annimmt, ist diese Gruppe wahrscheinlich dem Polysaccharid-Chitosan ($C_{14}H_{24}NO_{10}$) verwandt, oder wie *Landwehr* meinte, stellt sie sich als ein Stoff dar, welcher von ihm als „Tiergummi“ benannt worden ist und folgenden Bau hat = $C_{12}H_{20}O_{10}$.

Aus den Charaktereigenschaften dieses Landwehrgummis weise ich auf seine Fähigkeit, sich im abgesonderten Zustande mit Methylviolettblau, in Beimischungen mit Eiweiß jedoch rot zu färben, d. h. Metachromasiereaktion zu schaffen.

Indem ich nicht näher auf diese interessante Frage eingehe, erlaube ich mir, die Meinung über die Verschiedenheit der erwähnten Kohlenhydratengruppe, welche in engem Verbande mit vielfältiger Bildung von Mucinen und Mucoiden im allgemeinen steht, zu äußern.

Prof. *Hoyer* äußerte die Meinung, daß das reine Mucin höchstwahrscheinlich ein komplizierter Körper sei, der aus zwei eng miteinander verbundenen Teilen bestehe: der eine ist ein Stoff mit Eiweißcharakter, der andere in geringerer Menge im Mucin vorhanden, besitzt höchstwahrscheinlich leichte Säureeigenschaften und bedingt die Metachromasiereaktion.

Somit drängt sich wider Willen die Frage auf, worauf eigentlich die Metachromasiereaktion oben erwähnter Stoffe bei Färbung mit einigen basischen Anilinfarben beruhe?

Nach allem oben Gesagten kommt man unwillkürlich zu der Vermutung, daß die Metachromasiereaktion höchstwahrscheinlich durch die Anwesenheit von Kohlenhydratkomplexen sich erklären ließe. Ist

solche Vermutung richtig, so entsteht von selbst die Frage, ob nicht etwa das Glykogen allein, dessen Kohlenhydratnatur außer Zweifel steht, die Fähigkeit besitze, eine Metachromasiereaktion zu geben? In dieser Hinsicht ist es mir nicht gelungen, in der Literatur entsprechende Hinweise zu finden.

Alle, soviel mir bekannt, bisher vorgelegten Verfahren zum Nachweis des Glykogens in Geweben mittels mikrochemischer Reaktionen zerfallen in zwei große Gruppen.

Zur ersten gehören die sog. Jodmethoden nach

1. *P. Ehrlich* — Jodgummi,
2. *Barfurth* — Jodglycerin,
3. *Langhans* — Jodöl,
4. *Lubarsch* — Jodhämatoxylin,
5. *L. Driessen* — Jodecarmin.

Zur zweiten gehören die Methoden von Glykogenfärbungen in Geweben mit dieser oder jener Farbe, wobei das Glykogen sich in der Farbe desjenigen Stoffes färbt, welche angewendet wird.

Wie bekannt, gehören hierher folgende Methoden:

1. *Fiessinger* — Anilinsafranin,
2. *Vastarini* — Cresi-Resorcin-Fuchsin,
3. *P. Vastarini* — Kresofuchsin,
4. *P. Mayer* — sog. Tintenfärbung,
5. *Lubarsch* — eine modifizierte Gram-Methode,
6. *Best* — Ammoniakcarmin.

Eine besondere Beachtung verdienen die Verfahren nach *Lubarsch* — eine modifizierte Gram-Methode, wobei das Glykogen mit anderen gram-positiven Bildungen, zu welchen Hyalin, Fibrin u. dgl. gehören, gefärbt wird und dadurch gewisse Beziehungen der verschiedenen Stoffe möglich werden; eventuell auch die Methode nach *Best*, schon wegen der Schönheit und Genauigkeit des morphologischen Bildes, das man bei ihr erhält.

Es ist notwendig, hier auch die Beobachtungen *Czernys* zu erwähnen, der bei seinen Versuchen durch Einspritzung von Terpentinöl bei Tieren Amyloidose erzeugte, in den weißen Blutkörperchen des lebendigen Blutes Klümpchen fand, die die gleiche Metachromasiereaktion gaben wie das Amyloid.

Solche Beobachtungen erlaubten *Czerny* zu vermuten, daß das Amyloid von den weißen Blutkörperchen aus Eiterungsherden transportiert und aus ihnen in inneren Organen dann abgelagert wird.

Weiter hat *Czerny* angenommen, daß zwischen Glykogen und Amyloid ein enger Zusammenhang bestand und daß das Amyloid ein komplizierter Körper sei, der aus Eiweißderivat und einem gewissen Kohlenhydratglykogen oder einem ihm ähnlichen Körper bestehe.

Lubarsch beobachtete dem ähnliches und auch unter ähnlichen Umständen.

Er bemerkte auch, daß man in den Nieren überwinternder Frösche Mastzellen entdecken kann, welche eine Reaktion auf Amyloid und ebenso auch auf Glykogen geben.

Als *Lubarsch* die Experimente *Czernys* prüfte, kam er jedoch zu dem Ergebnis, daß *Czernys* Beobachtungen eher auf Zufälligkeiten begründet waren, die zu irgendwelchen sicheren Schlußfolgerungen nicht berechtigten.

Wie man aus allem oben Angeführten sieht, finden sich nur wenig und noch dazu nur unklare Andeutungen über die Möglichkeit einer Metachromasiereaktion des Glykogens bei Färbung mit einigen Anilinfarben.

Nun ist es mir aber gelungen, festzustellen, daß man bei bestimmten technischen Maßnahmen eine klare Metachromasiereaktion des Glykogens in den Geweben erhalten kann.

Als Beobachtungsmaterial dienten mir verschiedenartige Gewebe; ich halte es jedoch für notwendig, zu bemerken, daß eine Voraussetzung zum Gelingen der angegebenen Reaktion eine möglichst mächtige Häufung von Glykogen und erhebliche Größe der Glykogentropfen bildet.

Mir standen zur Verfügung die Nieren von an Zuckerharnruhr Verstorbener und glykogenreiche bösartige Gewächse, sodann Nieren und Fettkörper und auch Leber überwinternder Frösche.

Als besonders geeignetes Objekt erwies sich die Leber von Fröschen, bei denen das Glykogen zuweilen in Form großer, scharf umschriebener Klümpchen zu beobachten ist.

Das Material fixierte ich mit absolutem Alkohol. Dann wurden die Gewebsstücke in Celloidin eingebettet und Mikrotomschnitte angefertigt.

Die anfängliche Methode war folgende: ein Celloidinschnitt wurde auf 5–10 Minuten in eine wässrige Lösung von 1 proz. Thionin gebracht, hierauf rasch in destilliertem Wasser abgespült und auf 1–2 Minuten in gesättigte Sublimatlösung eingelegt. Aus diesem wurde er nach Abspülen mit Wasser auf einen Objektträger gebracht und dann in Glycerin oder Gelatine eingebettet.

Bei diesem Verfahren gelingt es jedoch nicht, genügend durchsichtige Präparate zu gewinnen und, was die Hauptsache ist, solche, die frei von Sublimatniederschlägen sind.

Später ist es mir gelungen, eine andere Methode zu finden, mit der man ausgezeichnete und vollständig durchsichtige Präparate erhalten kann.

Meine zweite Methode ist folgende: 1. möglichst dünne Celloidinschnitte werden nach der japanischen Methode auf Deckgläschen auf-

geklebt, 2. dann wird das Präparat 5—10 Minuten mit 1 proz. wässriger Thioninlösung gefärbt, 3. die Farbe wird rasch mit Wasser abgespült (siehe Glykogen!), 4. das Präparat wird mit gesättigter Sublimatlösung übergossen, in der es höchstens 1—2 Minuten verweilt, 5. das Präparat wird nach Trocknung mittels Filtrerpapier schnell mit einer Mischung von Anilinöl und wasserfreiem Alkohol (1 : 9) behandelt, 6. nachdem

folgt ein schnelles Trocknen des Präparates mittels Filtrerpapier und Ol. cajeput, 7. dann wird das Präparat in gewöhnlicher Weise nach vorherigem Behandeln mit Xylol in Canadabalsam eingeschlossen.

Eins der hauptsächlichsten Mängel der auf solche Weise erhaltenen Präparate ist ihre verhältnismäßig geringe Dauerhaftigkeit — schon in den nächsten Tagen schwindet die rote Nuance, und es bleibt nur der allgemeine himmelblaue Grund übrig.

Auf Präparaten, die nach meiner angegebenen Methode gefärbt werden, kann man folgendes erblicken: die roten Blutkörperchen färben sich ins gewöhnliche Grün, das Protoplasma ins liebliche Himmelblau, der Zellenkern ins Blaue,

das Glykogen jedoch färbt sich dabei in einer feinen roten Farbe, welche sanft ins Karmoisinrot übergeht (Abb. 1).

Jedoch nicht alle Anhäufungen von Glykogen, deren Glykogennatur vorher durch Jodreaktion, Färbungen nach Best und Fähigkeit zur Auflösung in Speichel bestimmt wurde, gaben mir eine Metachromasireaktion; so konnte ich z. B. in den Leberzellen des Frosches neben starken Anhäufungen von Glykogen, die

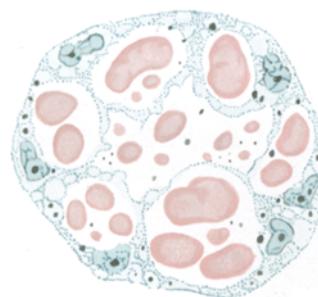


Abb. 1.

eine deutliche Metachromasireaktion gaben, eine ganze Anzahl von Anhäufungen beobachten, welche sich nur in violetten oder hellvioletten Tönen färbten. In den Nieren von an Harnruhr Verstorbenen fand ich neben deutlich roten und violetten Glykogenkugeln auch Anhäufungen kleinerer Körner, die sich nach der Thioninmethode in gesättigter dunkelvioletter Farbe färben; diese Körner lösten sich in

Speichel auf und erwiesen sich als jodophile und färbten sich nach *Best*, d. h. ihre Glykogennatur steht somit ganz außer Zweifel (Abb. 2).

Es fragt sich, wie man sich diese Mannigfaltigkeit der Färbung verschiedener Glykogenanhäufungen verständlich zu machen hat?

Nach der Ansicht von *Gierkes* sind die histologischen Glykogenbefunde der morphologische Ausdruck verschiedener Phasen des Zellstoffwechsels. Andererseits ist es bekannt, daß die Fähigkeit der Zellen gesetzmäßig und beständig verläuft und daß die Zelle bei ihrer aufbauenden und zerlegenden Tätigkeit allmählich von mehr niedrigen Körnern zu höher zusammengesetzten übergeht und umgekehrt; wobei man auf dem Wege dieses noch ziemlich dunkeln innerlichen Zellstoffwechsels eine Reihe dazwischenliegender Stufen dieses oder jenen Stoffes anzutreffen vermag — in diesem Falle Glykogen und Kohlenhydrate — im allgemeinen.

Seit Vervollständigung der Forschungsmethoden wird die Vorstellung über das Glykogen, Zooamylin, als besondere chemische Einheit mehr und mehr verlassen, und an ihre Stelle tritt die Überzeugung von der Vielfältigkeit der Kohlenhydrate lebender Wesen ein, wie dies besonders der verstorbene Prof. *W. Paschutin, Arnold, Neukirch, E. Abderhalden* andeuteten.

Wenn wir nun noch lebendige, glykogenhaltige Gewebe rasch fixieren, halten wir auch die erzielten Phasen des Zellstoffwechsels und seines morphologischen Ausdrucks fest und ergreifen das Glykogen sozusagen in voller Entwicklung. Von diesem Gesichtspunkte aus wird der Unterschied zwischen der Stärke der Färbung und der Schärfe der Metachromasiereaktion, die sich bei den verschiedenen Glykogenanhäufungen zeigt, verständlich.

Vergleicht man nun die Beobachtungen *Landwehrs*, der auf allgemeinem chemischen Wege zeigte, daß das reine „Tiergummi“ unfähig sei, eine Metachromasiereaktion zu geben, mit meinen mikrochemischen an Nieren Harnruhrkranker und Froschleber erzielten Befunden, so kann man annehmen, daß die erwähnten Körner- und Glykogenanhäufungen, die keine Metachromasiereaktion geben, Tropfen reinen Tiergummis darstellen.

Je mehr dieser Gummi in engere Verbindung mit dem Protoplasma der Zelle tritt, fängt es an, immer schärfster und schärfster eine Metachromasiereaktion zu geben.

Somit entsteht die Frage vom Dasein einer sog. „Trägersubstanz“, einem Stoffe, der sozusagen als Träger des Glykogens dient, wie ihn *P. Ehrlich*, der zuerst das Glykogen mikroskopisch in den Nieren Harnruhrkranker entdeckte, vermutete und wie er seitdem von allen Forschern, die sich ausführlich mit dem Glykogen beschäftigten (*Langhans, Arnold, Lubarsch, v. Gierke, Klestadt u. a.*), angenommen wird.

Auf Grund eigener Beobachtungen an ebensolchem Material und an Nieren von Tieren, denen ich Pflanzenstärke ins Blut einführte, und bei denen ich im Harn eine enorme Absonderung des eingeführten Stoffes beobachtete, erlaube ich mir die Meinung zu äußern, daß die gelben Kugeln, welche *P. Ehrlich* sah, nichts anderes sind als morphologisch fixierte Phasen einer Polisaccharidinversion.

Außerdem habe ich noch folgenden Versuch angestellt. Ich unterwarf Schnitte aus Geweben, welche in großem Maße Glykogen enthielten, der Wirkung des Speichels, und versuchte darauf an ihnen eine Metachromasiereaktion zu gewinnen. Unter der Einwirkung des Speichels hatte sich aber das Glykogen völlig aufgelöst und der Versuch, eine Metachromasiereaktion zu erhalten, blieb vergebens: die Glykogenträger bleiben ungefärbt vollständig durchsichtig.

Aus dieser Beobachtung folgert 1. daß, wenn zwischen dem Glykogen und einem hypothetischen „Träger“ eine Verbindung besteht, diese doch recht locker ist; 2. die Metachromasiereaktion höchstwahrscheinlich durch die Anwesenheit von Glykogen als solchem bedingt wird.

Somit dienen meine Beobachtungen als verknüpfendes Glied zwischen den erwähnten Beobachtungen *Landwehrs* und Prof. *Hoyers* auf einer Seite und *Schmiedebergs* und *N. Krawkows* auf der anderen Seite und erlauben auch zu vermuten, daß die Metachromasiereaktion solcher Stoffe wie Mucin, Mucoid und vielleicht Amyloid, durch die Anwesenheit von Kohlenhydratkomplexglykogen oder irgendeines ihm ziemlich nahestehenden Stoffes bedingt wird.

Ich bemerke noch hierzu, daß von mir auch Versuche angestellt wurden, eine Metachromasiereaktion des Glykogens mit Hilfe anderer Farbstoffe zu gewinnen, daß sie aber keinen Erfolg hatten und nach meinen Erfahrungen nur das Thionin zur Erzielung einer Metachromasie geeignet ist.

Literaturverzeichnis.

- ¹⁾ *Herzheimer*, Technik d. pathol.-histol. Untersuchungen 1912. — ²⁾ *Schmorl*, *G.*, Die pathol.-histolog. Untersuchungsmethoden 1912. — ³⁾ Enzyklopädie der mikroskop. Technik 1903. „Metachromasie.“ Prof. *Michaelis*. — ⁴⁾ *Hoyer*, Arch. f. mikroskop. Anat. 1890. — ⁵⁾ *Lubarsch*, *O.*, Glykogendegeneration. Ergeb. d. allg. Pathol. u. pathol. Anat. 1894, T. 1. — ⁶⁾ *Lubarsch*, *O.*, Albuminosedegeneration, ibidem S. 214. — ⁷⁾ *Driessen*, *L.*, Zentralbl. f. allg. Pathol. u. pathol. Anat. 1905. — ⁸⁾ *Klestadt*, Ergeb. d. allg. Pathol. u. pathol. Anat. 1912. — ⁹⁾ *Ehrlich*, *P.*, Zeitschr. f. klin. Med. 1883, S. 23. — ¹⁰⁾ *Czerny*, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **31**. — ¹¹⁾ *Aschoff*, *L.*, Pathol. Anatomie. Jena 1913. — ¹²⁾ *v. Gierke*, *E.*, Beitr. z. pathol. Anat. u. z. allg. Pathol. **37**. — ¹³⁾ *Abderhalden*, *E.*, Lehrbuch d. physik. Chemie **1**. 1914. — ¹⁴⁾ *Hammarsten*, *O.*, Lehrbuch d. physiol. Chemie. 1905. — ¹⁵⁾ *Poschutin*, *W. W.*, Kursus d. allg. Pathologie 1885. — ¹⁶⁾ *Podwysoszky*, *W. W.*, Grundlagen d. allg. Pathol. 1899. — ¹⁷⁾ *Landois*, Lehrbuch d. Physiologie des Menschen 1898.