

Beziehungen zwischen Oxydasen, Vitalfärbung, Postmortalfärbung und Morphologie der Zelle.

Von

Dr. Walter Loele,

(Staatliche Landesstelle für öffentliche Gesundheitspflege in Dresden).

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 4. Juni 1927.)

Die granulären, durch verschiedene Phenolasereaktionen nachweisbaren Oxydasen und Peroxydasen sind keine einheitlichen Körper, sondern vielfach ein Gemisch der verschiedensten Stoffe. In manchen Zellen sind sie in 3 Gruppen zerlegbar, in einen ringförmigen, pigmentbildenden Anteil, der bei Einwirkung von Alkalien braune oder grüne Farbstoffe bildet, in einen zweiten Anteil, der aus verschiedenen Oxydasen und Peroxydasen zusammengesetzt ist, und in einen dritten Anteil, der Stoffe enthält, die Lösungs- oder Fällungserscheinungen in der Zelle hervorrufen, somit für den Abbau und Aufbau der Zelle von Wichtigkeit sind. Bei der Zersetzung der oxydasehaltigen Granula werden die einzelnen Teile in verschiedener Weise angegriffen, so daß sie mehr oder weniger unabhängig voneinander erscheinen. Die Nachweisbarkeit eines Teiles deutet daher nicht notwendigerweise auf das Vorhandensein der anderen Anteile hin.

Der lytische Anteil wird bei Verschleimungsvorgängen wirksam sein, der fällende Anteil bei Strukturbildungen. Beide Anteile beeinflussen daher sowohl die Färbbarkeit wie die Morphologie der Zelle. Schleime sind Ausscheidungen der Zelle, die leicht färbbar und häufig auch durch spezifische Färbemethoden darstellbar sind. Auf Grund des färberischen Verhaltens kann man die bei Mollusken ungemein verschiedenen Schleime einteilen in:

1. Schleime nach ihrem Verhalten zu Oxydasereaktionen,
 2. nach ihrem Verhalten zu allgemeinen Färbemethoden,
 3. nach ihrem Verhalten zu spezifischen Färbungen.
1. Naphtholoxidasereaktion +,
Naphtholperoxydasereaktion +, N. Oxydasereaktion +,
Naphtholperoxydasereaktion +, Naphtholoxidasereaktion —, } Benzidinreaktion negativ
Naphtholperoxydasereaktion +, Benzidinperoxydasereakt. +, } Naphtholoxydase negativ

Benzidinperoxydasereaktion +, Naphtholperoxydasereaktion —, Indophenolblaureaktion +, vorhergehende Reaktionen —, Naphtholperoxydasereaktion —, aber nachfolgende Beizenfärbung mit basischem Farbstoff (in Naphthol gelöst) möglich (hierher gehören auch zum Teil die durch Färbung mit α -Naphthol-Pyronin nach Graham dargestellten Schleime).

Primäre Oxydase- und Peroxydasereaktion negativ, aber sekundäre Reaktion +, (violett oder schwarz) nach Behandlung mit Granulaextrakten:

Sekundäre Reaktion +, nach Behandlung mit Kernkörperchenextrakt (Arion, Limax).

2. Verhalten in Farbstoffgemischen und bei einfachen und zusammengesetzten Färbungen. Schleim: basophil, oxyphil, neutrophil, metachromatisch; rote Färbung mit Safranin-Pikrinsäure-Alkohol (meist feste, hornartige Schleime); Färbung nach der Gramschen Methode.

Plasmazellfärbung mit Pyronin (Unna-Pappenheimsche Färbung), starke Färbung mit Alaunhämatoxylin.

3. Spezifische Färbungen: Sudanfärbung +, Elastinfärbung +, Glykogenfärbung +, Markscheidenfärbung +, Turacinfärbung +; Färbung mit dem roten Farbstoff des *Bacterium prodigiosum*. Schleime können demnach, wenn sie die Oberfläche einer Struktur überziehen oder die Zelle durchsetzen, die Färbbarkeit der Zelle wesentlich ändern, somit wird man gelegentlich Beziehungen zwischen Abbau der Zelle, Schleimbildung, Färbbarkeit und Oxydasegehalt feststellen können. Wenn gesetzmäßig Beziehungen zwischen Oxydase und Vitalfärbung vorhanden sind, müssen drei Erscheinungen zu erwarten sein:

Vitalfärbung tritt da ein:

1. wo die Oxydationsreaktionen positiv sind,
2. an den Strukturen der Zelle, wo sich mit Vorliebe normalerweise die ausgeschiedenen Oxydasen niederschlagen,
3. wo infolge entzündlicher oder degenerativer Vorgänge eine vermehrte Ausscheidung von Oxydasen in die Umgebung der Oxydasezellen und in die benachbarten Zellen stattfindet.

Die Vitalfärbung wird nach Höber¹ bestimmt:

1. durch Größe der Farbstoffteilchen und Porenvolumen der Zelle (*Ruhlands Ultraporentheorie*).
 2. durch die lipoide Eigenschaft der Zellmembran und die Lipoidlöslichkeit der Farbstoffe (*Overtons Lipoidtheorie*).
 3. durch die Ladung der aufnehmenden Kolloide (*Bethe, Michaelis, Davidsohn*).
 4. durch die aktive Tätigkeit der Zelle (*Höber*).
- Nach Eindringen des Farbstoffes in die Zelle findet statt:

a) Entladung und Ausfällung der Farbstoffmizellen nach Zerstörung der Schutzkolloide der Zelle (von *Gaza*²).

b) Ausfällung und Adsorption der Farbstoffteilchen durch entgegengesetzt geladene Kolloide.

c) Chemische Umsetzung in der Zelle.

Mit Bezug auf den Farbstoff bestehen folgende Möglichkeiten:

1. Der Farbstoff ist ohne Einfluß.

2. Die Ladung des Farbstoffes bestimmt die Aufnahme.

3. Es findet eine Auswahl einzelner saurer oder basischer Farbstoffe statt.

4. Aus farblosen Lösungen wird durch einen chemischen Prozeß ein Farbstoff gebildet und gespeichert.

Wurzelhaare keimender Pflanzen färben sich meist sofort mit allen basischen und sauren Farbstoffen. Die Granula und Nahrungsvakuolen von Paramäcien färben sich vital zunächst schneller mit basischen als mit sauren Farbstoffen, in Farbstoffgemischen aber auch umgekehrt (*Loele*³). Die Pyrrolzellen färben sich mit sauren Farbstoffen (*Goldmann*⁴). Nur mit Sulforhodamin konnte *Goldmann* eine Kernfärbung in lebenden Leberzellen erzielen. In farblosen Naphthol- oder Benzidinlösungen nehmen pflanzliche Teile intravital die durch Oxydation sich bildenden Farben stark an.

I. Vitalfärbung und Oxydasegehalt der Zelle.

Es ist außerordentlich auffällig, daß Teile von Pflanzen, die eine vitale α -Naphtholreaktion geben, auch vital sich leicht färben lassen; aber nicht umgekehrt geben die vital färbaren Teile immer Oxydationsreaktionen. Die Vitalfärbbarkeit liegt demnach in der Verlängerung der Oxydaseabspaltung. Die Oxydasen selbst haben nichts mit der Vitalfärbung zu tun. Sie sind nur eine Begleiterscheinung der vital färbaren Stoffe.

Auch in neueren Arbeiten stößt man auf die Auffassung, daß Vitalfärbung von Strukturen erst nach Absterben der Zellbestandteile eintritt (*Lumière Auguste*⁵) oder eine schwere Zellschädigung darstelle, wie *Rost*⁶ für die vitale Kernfärbung annahm. Das trifft aber nicht immer zu. *Guillieremont*⁷ konnte ungeschädigte Chondriosomen vital färben, *Bethe*⁸ beschreibt eine echte vitale Kernfärbung, *Schneider* erwähnt in der mikroskopischen Technik von *Krause* die Vitalfärbung von Kernkörperchen. Es ist auch sehr zweifelhaft, ob man auf einzelne Zellteile den Begriff des Lebens anwenden darf. Vitalfärbung zeigt an sich nur an, daß Farbstoffe in die Zelle eindringen und dort infolge von Abbau- und Fällungsvorgängen liegen bleiben. Eine Störung der Zelltätigkeit braucht nicht notwendigerweise damit verbunden zu sein, wenn sie auch zweifellos häufig vorhanden ist. Dieser Abbau

in der Zelle führt auch zur Abspaltung von oxydierenden und lytischen Stoffen.

Legt man Kressekeimlinge einmal auf eine Endoagarplatte und zum Vergleich auf eine α -Naphtholplatte mit etwas H_2O_2 -Zusatz und eine Drigalski-Lackmusplatte, so entsprechen die sich violett färbenden Naphtholteile der Wurzeln etwa den mit dem Leukofuchsin sich rot färbenden Teilen. Das Ausbleiben der Rötung auf der Lackmusplatte spricht dafür, daß die Rotfärbung nicht durch die pflanzliche Säure, sondern vielleicht durch Aldehyde bedingt ist. Die auffallende Übereinstimmung zwischen roter Endofärbung und dem Peroxydasebild findet man auch an den abgezogenen Oberhäutchen mancher Pflanzenblätter (z. B. Iris), die man auf den Agar legt, indem Schließzellen und Gefäßbündel sich annähernd gleichmäßig färben.

Auch an unfixierten Gefrierschnitten von Pflanzenkeimen (Kürbis, Mais) ist die Übereinstimmung zwischen peroxydasehaltigen Zellen und färbbaren Zellen eine recht beträchtliche. Es sind die Zellen des Randes und die der Gefäßbündel, die sich färben.

Wenn auch die Aldehydreaktion nach Schiff, auf der die Rotfärbung der Endoplatte beruht, nicht beweisend ist, so spricht doch der positive Ausfall der Reaktion dafür, daß Stoffe vorhanden sind, die wie Aldehyde wirken, um so mehr, als auch die Silbernitratreaktion an den gleichen Teilen positiv ist. Benetzt man die schwarzvioletten Stellen der Naphtholplatte mit 1 proz. Lauge, so bleiben die Stellen violett und schlagen nicht in Braun um, wie es der Fall sein müßte, wenn die Rotfärbung der Endoplatte nur eine Säurewirkung wäre, denn die Wurzeln geben die Säureraktion, die auf der alkalischen Drigalski-Platte nur nicht zur Wirkung kommt. Stellt man die Naphtholperoxydasereaktion auf der Naphtholplatte mit Hammelblutkörperchen an, tritt keine Violett-, sondern eine graubräunliche Färbung ein, die darauf beruht, daß die Blutperoxydasen in alkalischen Lösungen eine braune Naphtholperoxydasereaktion geben, wenn nicht Formol zugesetzt wird (in bestimmten Mengenverhältnissen).

Im tierischen Gewebe sind es die myeloischen Zellen und die Zellen der Speichel- und Tränendrüse, die Oxydasereaktionen (stabile Oxydasen) geben. Die Leukocyten sind, wie besonders Pappenheim gezeigt hat, leicht supravital auf dem Objektträger färbbar mit basischen Farben, die vitale Färbung in den Gefäßen ist deshalb nicht zu erwarten, weil im strömenden Blute die Verhältnisse für eine Vitalfärbung sehr ungünstig liegen. An den Granula von Tränendrüsen hat Grunert⁹ bei Vergiftung von Hunden mit Paraphenyldiamin eine braune Verfärbung nachgewiesen. Die Granula der Tränendrüse geben nach den Untersuchungen von W. H. Schultze und Spanjer Herford¹⁰ eine positive stabile Indophenolreaktion, es wäre denkbar, daß die gefärbten Substrate gleichartig sind.

Bei Infusorien sind Nahrungsvakuolen und Granula, die sich mit Benzidin + H₂O₂ darstellen lassen und die Indophenolblaureaktion geben, auch durch Vitalfärbungen leicht zu färben.

II. Vitalfärbung und sekundäre Oxydasereaktion.

Wenn oxydasehaltige Strukturen besonders leicht die Vitalfärbung annehmen, so ist zu erwarten, daß auch die sich lösenden Oxydasen, an andere Strukturen niedergeschlagen, nunmehr die Ursache dafür werden, daß diese Strukturen vital färbbar sind. Welche Strukturen hier in Frage kommen, dafür liegen teils Beobachtungen im Reagensglas, teils im lebenden Körper vor, die sich gegenseitig ergänzen. Die diffundierenden Oxydasen von Limax cinereus und Arion rufus werden zunächst nur von solchen Strukturen adsorbiert, die eine gewisse Verwandtschaft zu den Oxydasegranula besitzen. Das ist verständlich. Die Granula, die an ihrer Oberfläche Oxydasen tragen, haben die Fähigkeit, die Zersetzung der Oxydasen, die sehr leicht eintritt, zu verhindern. Wenn nun die oberflächlichen Oxydasen nicht mehr vorhanden sind, weil sie aus irgendeinem Grunde zersetzt sind, dann bleibt die Grundsubstanz zurück, die sekundär an ihr niedergeschlagene Oxydasen erhält.

In zweiter Linie sind es gewisse Kerngranula und die Kernkörperchen, die imstande sind, ausgeschiedene Oxydasen an sich niederzuschlagen, und endlich Degenerationsprodukte des Plasmas, wie hornige und schleimige Substanzen, bei Pflanzen cellulosehaltige Strukturen (Zellwände, Spiralfasern, Pyrenoide usw.). Im tierischen Gewebe ist der Übertritt von Oxydasen auf andere Strukturen selten unter physiologischen Bedingungen. Vielleicht kommt er häufiger bei manchen Fischen vor, z. B. bei der Rößmakrele, wo in der Magenschleimhaut massenhaft Leukocyten vorkommen, die ihre Oxydasen in die Umgebung ausscheiden (Abb. 1), die dann im Protoplasma der Epithelien als Granula auftreten oder im Kern diffus verteilt sind.

Häufiger findet man Übertritt von Oxydase auf die Kerne in lebenden Pflanzen.

Man wird daher, wenn man Vitalfärbung des Kernes feststellen will, pflanzliches Material nehmen, wo schon normalerweise viel Peroxydosen vorhanden sind, das sind besonders Wurzeln keimender Pflanzen. Bei den folgenden Versuchen wurden Maiskörner in Farbstofflösungen zum Ankeimen gebracht und in der Farblösung weiter gezüchtet. Als saurer Farbstoff wurde Isaminblau, als basische Farbstoffe wurden Neutralrot und Cresylechtviolett genommen.

Die Ergebnisse der Versuche waren verschieden, je nachdem das Wachstum der Pflanzen gehemmt war oder nicht.

War das Wachstum der Pflanze nicht gehemmt, dann fand sich regelmäßige Kernfärbung nur bei Verwendung des sauren Farbstoffes. Es

sind immer die gleichen Zellen, die eine Kernfärbung in Gestalt einer gleichmäßigen großen Granulierung zeigen, nämlich die Kerne der oberflächlichen Zellen im unteren Teile der Wurzel. Die Kernfärbung ist ausgesprochener als die Färbung des Protoplasmas, die diffus, etwas wolkig ausfällt. Bei einer nachfolgenden Färbung der unfixierten Häutchen mit Safranin-Pikrinsäure-Alkohol tritt in allen Kernen, die nicht vital gefärbt sind, eine Rotfärbung der gleichen Granula ein.

Ist das Wachstum der Pflanze gehemmt, dann kann man auch Färbungen der Kerne und der Kerngranula sowie des Kernkörperchens mit basischen Farben beobachten. Die Protoplasmafärbung ist mit Neutralrot diffus rot, mit Cresylviolett dagegen oft granulär, indem

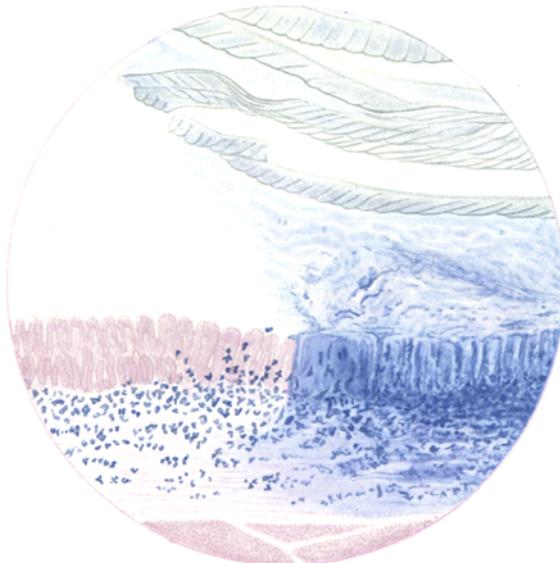


Abb. 1. α -Naphthol-Peroxydase-Gentianaviolettfärbung. Im Lumen Nahrungsreste (Radula?).

einzelne blaue Körner von zahlreicherem metachromatisch gefärbten roten umgeben sind, manchmal tritt auch eine verwaschene Gelbbraunfärbung ein. Zweifellos ist aber die Färbung der Kerne mit basischen Farbstoffen von einer Schädigung der Zellen begleitet.

III. Vitalfärbung und Oxydaseausscheidung bei krankhaften Veränderungen.

Bei Wasserflöhen (Daphnien) finden sich nicht selten kleine Schalendefekte in Form von Abbrechen des Schalenstachels oder in Form kleiner grubiger Vertiefungen des Schalenrandes. Setzt man dem Wasser Neutralrot zu, so tritt eine vitale Färbung in der Gegend der Defekte ein. Die gleichen Stellen geben mit α -Naphthollösungen eine violette Peroxydasereaktion. Bei höheren Tieren liegt eine Beobachtung vor, die ich früher mitgeteilt habe. Eine Maus, die mit Einspritzungen von Isamin-

blau nach *Goldmann* behandelt war, erkrankte an einer Peritonitis. Bei der Eröffnung fanden sich zahlreiche Eiterzellen, die blaue Granula besaßen, wie die Granula der Leukocyten im strömenden Blute nie zeigen, und einzelne Kerne zusammenhängender Peritonealepithelien waren diffus blau gefärbt. Nach den jetzigen Erfahrungen möchte ich diese Erscheinung in Zusammenhang bringen mit der Eiterzellinfiltration, die eine stärkere Ausscheidung von Oxydasen mit Niederschlag an einzelnen Kernen zur Folge hatte. Da geschädigte Peritonealepithelien leicht abgestoßen werden, muß man wohl annehmen, daß die Blaufärbung der Kerne in diesem Falle eine wirkliche Vitalfärbung ist. Das vermittelnde Glied zwischen Oxydasereaktion und Vitalfärbung ist der Zellabbau. Das Auftreten von Naphtholoxydases ist eine Folge des Zellabbaues. Wo Naphtholoxydases vorhanden sind, besteht die Möglichkeit, daß auch vital färbbare Substanzen vorhanden sind.

Oxydase und Färbung.

Oxydasegranula, die mit Hilfe der α -Naphtholreaktionen (und entsprechender Phenolreaktionen) dargestellt sind, zeigen Veränderung ihrer Färbbarkeit in zweierlei Weise, einmal sind sie basophil (indem das Phenol als saure Beize wirkt) und säurefest geworden, was die ursprüngliche Substanz nicht war, dann wird die Substanz jodfest, wenn sie den basischen Farbstoff gebunden hat, so daß sie sich wie bei der Gramschen Färbmethode verhält. Vielleicht ist dieses Verhalten der Grund, warum die nach der Gramschen Methode nicht färbbaren Kokken (*Diplococcus catarrhalis*, Gonokokken, Meningokokken) mit der Indophenolmethode darstellbar sind (*Loebe*). Man könnte daran denken, daß dadurch, daß die Oxydasen der grampositiven Kokken sich mit phenolartigen Stoffen verbunden haben, sie die Eigenschaft der Oxydase verloren haben, dafür aber nach der Gramschen Methode färbbar geworden sind. Die Möglichkeit besteht zweifellos, daß auch in lebenden Zellen intermediär auftretende Oxydasen durch Phenolchromogene abgebunden, an Lipoiden niedergeschlagen, nunmehr der Gramschen Methode zugänglich werden.

Meines Wissens hat *Lubarsch* darauf aufmerksam gemacht, daß bei eitriger Meningitis die Tangentialfasern der Glia nach der Weigertschen Methode sich gut darstellen lassen. Bei eitriger Meningitis findet aber eine Durchtränkung der Hirnrinde mit ausgeschiedenen Oxydasen der Leukocyten statt, die auch die Gliafasern durchsetzen und färberisch verändern.

In einigen Fällen von Austritten von Eiterzellen aus den Hirncapillaren fand ich, daß die unmittelbare Umgebung der Eiterzellen sich mit Eosin bei einer Romanowsky-Färbung darstellen ließ, wenn

man vorher die Benzidinperoxydasereaktion angestellt hatte, es hat demnach eine Veränderung in der Färbbarkeit der umgebenden Fasern stattgefunden.

Hierzu gibt es vielleicht ein physiologisches Analogon.

In Gefrierschnitten der formolfixierten Nordseeauster (*Ostrea edulis*) (Abb. 2) findet man besonders unter der Epithelschicht der Darmschleimhaut reichlich Leukocyten, die auch durch die Schleimhaut durchtreten. Färbt man einen derartigen Schnitt nach *Giemsa Romanowski*, dann hebt sich die unmittelbar unter den Epitheliien liegende Faserschicht stark rot ab, zugleich gibt sie, wie man nachweisen kann, eine sekundäre Naphtholreaktion. Nun findet man häufig,

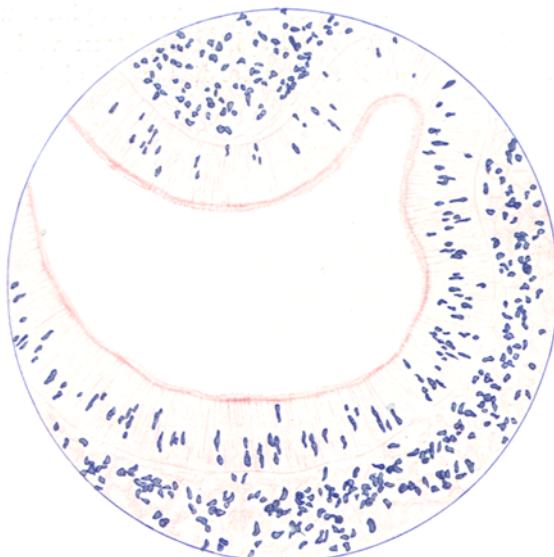


Abb. 2. α -Naphthol-Peroxydase-Gentianavioletfärbung.

dass eine sekundäre Naphtholreaktion besonders da leicht eintritt, wo zersetzte primäre Oxydasen vorhanden sind. Ist also die subepithiale Schicht besonders stark von Leukocytensekreten durchsetzt, dann ist die sekundäre Naphtholreaktion und die Eosinophilie leicht erklärlich; jedenfalls sind diese Beobachtungen geeignet, zur Beobachtung ähnlicher Vorgänge aufzufordern.

Oxydase und Morphologie.

Die Neigung vieler oxydasehaltiger Strukturen zur Quellung und zur Umformung in regelmäßige zylindrische und scheibenartige Formen deutet darauf hin, daß die oxydierenden Stoffe bei manchen Bildungen der Zellen von großer Bedeutung sein können. Meist handelt

es sich bei diesen stark quellenden Gebilden um Granula, die cholesterinhaltig sind oder lipoiden Charakter haben. Die Aufquellung kleiner Granula zu großen Kugeln gibt einen Anhalt dafür, wie es möglich ist, daß in anscheinend granulafreien Zellen mit einem Schlage große Granula auftreten. Die ursprünglich Granula sind ultramikroskopisch klein und werden erst nach der Quellung, infolge gleichzeitig sich abspielender lytischer Vorgänge meist verändert, mikroskopisch nachweisbar.

Die Beobachtungen an primären Oxydasen geben weiter Anhaltpunkte dafür, wie man sich die Entstehung des Kernes und des Kernkörperchens vorstellen kann. In dem Zustand der Teilung hat die Zelle weder Kernmembran noch Kernkörperchen, nach erfolgter Teilung tritt außerordentlich schnell die scharfe Trennung ein, des Kernes vom Protoplasma und des Kernkörperchens vom Kern, indem sich Membranen bilden.

Von der Bedeutung des Kernkörperchens für den Lebensprozeß des Kernes wissen wir, wie *Hertwig*¹⁰ sagt, weniger als von der des Chromatins. *Heidenhain* und *Haecker* sehen in ihm Kernexcrete, unorganisierte, zur gänzlichen Abscheidung bestimmte Massen (*Heidenhain*), die aber in einem gewissen Abhängigkeitsverhältnis zum Grade der vegetativen Leistung des Kernes und der Zelle stehen (*Haecker*). Dagegen nimmt *Zimmermann* an, daß nur der Nucleolus Kernkörperchensubstanz bilden kann. Seinen Eigenschaften nach steht das Kernkörperchen in einem gewissen Gegensatz zum Chromatin, es ist widerstandsfähig gegen Substanzen, in denen das Chromatin quillt, vor allem widerstandsfähig gegen Trypsinverdauung (*Hertwig*).

*Reddingius*¹² nennt die Kernkörperchen Kernbestandteile, von welchen mit Vorbehalt gesagt werden darf, daß sie konstant vorhanden sind, er sieht in ihnen bewegliche Gebilde, die imstande sind, durch Zerschnürung ihrer Körper sich in Stücke zu teilen, *Unna*¹³ hat festgestellt, daß die Kernkörperchen aus 4 Eiweißbestandteilen zusammengesetzt sind, aus 2 sauren Anteilen, einem oberflächlichen Nuclein und einem zentralen Globulin und 2 basischen Anteilen, einer salzsäurefesten Grundsubstanz und einer in 25 proz. Salzsäure löslichen Mittelschicht.

Eine Färbemethode, mit der man einwandfrei in jedem Falle feststellen kann, was Kernkörperchen ist, und was nicht, gibt es nicht. Mit der gleichen Methode kann man nicht einmal in allen Zellen die Kernkörperchen darstellen. Die vielversprechende Methode von *Reddingius* versagt, da anscheinend eine bestimmte Sorte von Organumöl hierzu nötig ist.

Mit der sekundären Naphtholmethode kann man einwandfrei gewisse Oberflächensubstanzen nachweisen, die am Kernkörperchen

vorhanden sind, und man kann das Schicksal dieser Stoffe verfolgen. Es gelingt mit dieser Methode (*Loele*¹⁴), die Kernkörperchen auch in Zellen darzustellen, in denen sie sonst bei den gewöhnlichen Kernfärbemethoden zu fehlen scheinen.

Zur Darstellung der sekundären Naphtholreaktion verwendet man am besten Auszüge aus *Limax cinereus*, da bei *Arion rufus* nach Einlegen der Schnecken in Formol die Kernkörperchenreaktion sehr spät eintritt. Bei *Limax* tritt sie schon nach 14 Tagen auf und hält sich sehr viel länger. Nach Behandlung der formol-fixierten Gefrierschnitte mit dem Schneckenauszug läßt man die Schnitte bis 48 Stunden in der alkalischen α -Naphthollösung liegen, die man wechselt, sobald sie sich zersetzt hat, um zu vermeiden, daß der braune Farbstoff die Schnitte diffus färbt. Man legt dann die Schnitte nach Aufhellung in Canadabalsam ein, sie halten sich, wenn man sie vor Licht schützt, auch längere Zeit. Beizenfärbungen mit einem basischen Farbstoff, wie bei der primären Naphtholreaktion, sind möglich, aber sehr schwierig.

Mit der sekundären Naphtholmethode kann man folgende Kerntypen in bezug auf die Nucleolen unterscheiden. Die Kerne enthalten:

1. ein rundes Kernkörperchen;
2. 1—3 runde Kernkörperchen;
3. 3 und mehr, oft unregelmäßige Nucleolen;
4. keine Kernkörperchen;
5. unregelmäßige, verschieden große Kernkörperchen. Ein großes Kernkörperchen haben die Ganglienzellen, die Eizelle und die kleinen Lymphocyten. 1—2—3 Kernkörperchen mit regelmäßiger Verteilung besitzen die Speicheldrüsen-, die Schilddrüsen-, Nieren- und Leberepithelien. Über 3 Kernkörperchen finden sich in den Zellkernen der Bauchspeicheldrüse und der Hypophyse. Keine Kernkörperchen haben der polymorphe neutrophile und der eosinophile Leukozyt. Sehr unregelmäßige Kernkörperchen haben die Zellen bösartiger Geschwülste und solche Zellen, die bei der Bildung von Zwischensubstanzen zugrunde gehen. Pflanzen, auch wenn sie schnell wachsen, wie z. B. Spargel, haben in ihren Kernen meist nur ein großes Kernkörperchen; ist aber der Kern sehr groß, so ist die Kernkörperchensubstanz zerteilt in eine Menge gleich großer, sehr regelmäßig verteilter Körner. Ein Beispiel hierfür bieten die jungen Sprossen von Nadelhölzern mit ihren Riesenkernen.

Bei Schnecken zeigen die Ganglienzellen das gleiche Verhalten. Die großen, oft außerordentlich großen Zellen des Kopfganglions enthalten mehrere Kernkörperchen, die kleineren Ganglienzellen nur ein einziges Kernkörperchen.

Ganz wie Nucleolarsubstanz verhalten sich der Kopf der Samenfäden und bei der Teilung der Zelle die Chromosomen. Die einzigen Zellen ohne Nucleolen haben die Fähigkeit der Zellteilung verloren, sie werden stets aus einkernigen Stammzellen neu gebildet. Betrachtet

man diese Übersicht, so ist deutlich, daß die Leistung der Zelle auf die Form der Nucleolen einen Einfluß hat. Alle Zellen mit einer inneren Leistung, die die Erhaltung einer bestimmten Struktur erfordert, haben wenig und regelmäßige Kernkörperchen. Zellen mit sekretorischen Leistungen besitzen zahlreichere und ungleichmäßige Nucleolen. Die Größe der Kerne ist weiter von Einfluß auf die Zahl der Nucleolen. Die Zellen der glatten Muskulatur haben meist nur ein oder zwei Kernkörperchen, die Kerne der zur Degeneration neigenden Bindegewebszellen besitzen unregelmäßige Kernkörperchen. Sehr deutlich sind die Unterschiede der Kernkörperchenbildung in den syncytialen Zellen der Mäuseplacenta.

Man kann hier 2 Arten von Kernen unterscheiden. Die Kerne der gleichmäßigen Bänder, die die Blutcapillaren umfassen, sind ausgezeichnet durch große runde Kernkörperchen. Die Kerne der Zellen, die sich vom Verband loslösen, zu großen Wanderzellen werden,

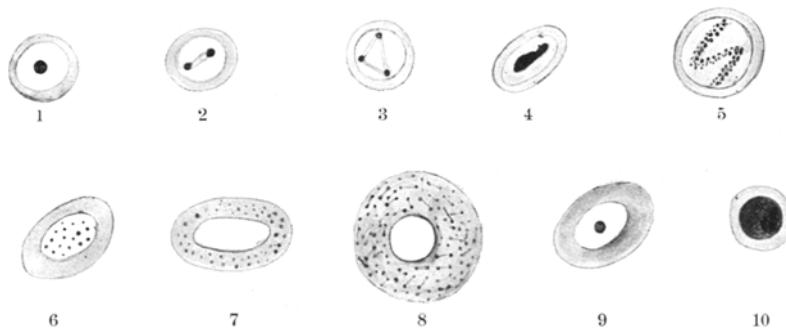


Abb. 3.

die in den Uterus eindringen und die mütterlichen Gefäße eröffnen, haben unregelmäßige zahlreiche Kernkörperchen und enthalten oft auch im Protoplasma Stoffe, die sich wie Nucleolen verhalten.

Um Aufbaufermente zu erzeugen, muß die Zelle sich selbst abbauen, und ihr Abbau ist morphologisch an dem Verhalten der Kernkörperchen zu erkennen.

Noch weiter in die Bedeutung der Nucleolen dringt man ein, wenn man die Veränderungen der Kernkörperchen einer einzigen Zellart beobachtet unter krankhaften Verhältnissen. Die folgenden 8 Zellen zeigen die Veränderungen von kleinen Lymphocyten in einer Lymphdrüse bei Typhus abdominalis, die 9. und 10. Zelle sind Ergänzungen einer anderen Zellart, die zum allgemeinen Verständnis der Kernkörperchenveränderungen nötig sind (Abb. 3).

Das Kernkörperchen verändert sich in verschiedener Weise, einmal nimmt es an Größe zu, zweitens teilt es sich in gleich große Teile, die als gleichwertig anzusehen sind, drittens scheidet es Sekrete aus, die

Kern und auch Protoplasma durchsetzen. Bei der Teilung der Kernkörperchen bleibt oft eine Verbindung der Teilstücke in Form eines erkennbaren Weges vorhanden. Endlich ist noch eine Form möglich in Gestalt einer feinen gleichmäßigen Granulierung in Kern oder Protoplasma, die wohl die Folge einer granulären Fällung ist, die eintreten muß, wenn die Nucleolarsekrete sich anhäufen. Im Protoplasma können weiterhin die kleinen Granula sich ähnlich teilen, wie die Nucleolen im Kern. Berücksichtigt man nun, daß die sekundären Oxydasen imstande sind, primäre Oxydasen an sich niederzuschlagen und zu erhalten, so ist die Brücke zwischen Nucleolarsubstanz (Sekretion) und Oxydasegranula (Adsorption) geschlagen.

Es bleibt noch die Frage zu erörtern, warum in dem einen Falle die Kernkörperchensubstanz sich zu einem großen Korn vereinigt, im anderen Falle in viele kleine Stückchen zerfällt. Man sollte doch meinen, daß die gleichmäßige Verteilung der Nucleolarsubstanz für die Leistung der Zelle günstiger sei. Die Begründung liegt in Beobachtungen an verschiedenartigen Zellen, in den Gesetzen der physikalischen Chemie und in den Eigenschaften der Oxydase selbst. Ganz entsprechende Beobachtungen kann man an Bakterien machen, am besten an Spirillum undula, das man sich leicht züchtet, wenn man das Wasser von Blumensträußen sich zersetzen läßt. Gießt man auf das spirillenhaltige Wasser zu gleichen Teilen eine Mischung von wässriger α -Naphthollösung (0,85% NaCl) und Paraphenylendiamin (1 : 200), dann erhält man schon nach wenigen Minuten eine dunkelviolette Darstellung von Granula in den Spirillen und kann feststellen, daß entweder sehr viele kleine oder nur wenige große Granula vorhanden sind.

Die Bildung von Granula bedeutet die Bildung von Oberflächen. Nun geben zwar viele kleine Granula eine größere Oberfläche, aber die einzelnen Granula sind der Gefahr einer Auflösung leichter ausgesetzt als große Granula. Man kann auch daran denken, daß das Auftreten von großen Granula das Zeichen dafür ist, daß kleine Granula, gelöst, zu großen zusammenflossen, die nun widerstandsfähiger gegen weitere Auflösungsvorgänge sind. Die Zusammenballung ist dann etwa dem Zusammenfließen von Quecksilbertröpfchen vergleichbar. Es liegt aber auch wahrscheinlich in den Eigenschaften der Oxydasen begründet, daß ihr Auftreten dann, wenn Lösungerscheinungen sich einstellen, notwendigerweise zur Bildung größerer Granula Anlaß geben muß. Es war in einer früheren Arbeit darauf hingewiesen worden, daß sich zersetzende Oxydasen oft Stoffe bilden, die den Oxydasträger selbst zersetzen. Wird also in der Umgebung eines Oxydasträgers Oxydase zerstört, so kann es hier nicht zum Niederschlag von neuen Oxydasen kommen, d. h. die unmittelbare Umgebung granulärer Oxydasen ist meist selbst oxydasefrei. Je größer das Oxydase-

korn, um so größer ist der Umkreis, den es beherrscht. Damit schließt sich aber das Vorkommen vieler kleinen Granula da aus, wo bereits große Granula vorhanden sind. Diese müßten sich erst auflösen oder in ihrer Wirkung irgendwie neutralisiert werden. Die Oxydasen sind, wie in manchen Fällen feststeht, mit eiweißlösenden oder fällenden, d. h. umformenden Stoffen verbunden. Die Ausscheidung gelöster Oxydase kann demnach zu Umbildungen der Struktur führen. Die Kernkörperchen sind wie die Granula der eosinophilen Leukocyten trypsinfest. Das legt den Gedanken nahe, daß sie ihre Entstehung der Anwesenheit von tryptischen Stoffen verdanken, die als Ergebnis eine trypsinfeste Struktur zurückließen.

Stark an sekundäre Naphtholkernkörperchenbildung erinnernde Granula findet man bei Hefen, die mit einer Lösung von α -Naphthol-Para-

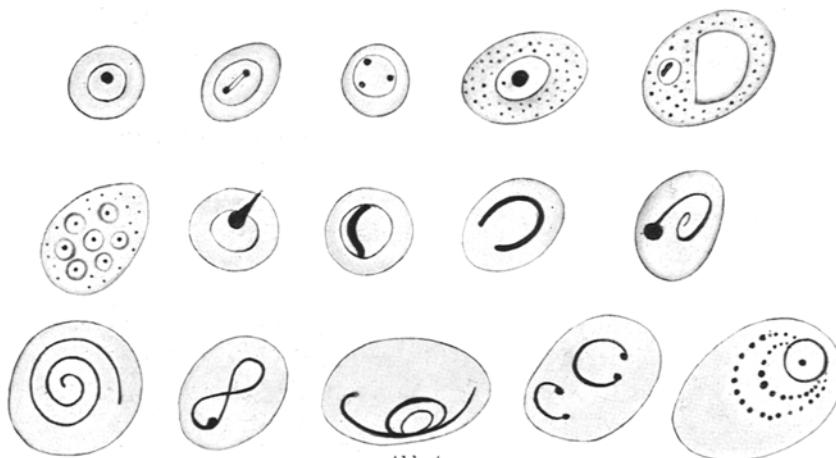


Abb. 4.

phenylendiamin behandelt sind. Sehr gut eignet sich für diese Versuche Soor, den man auf Diphtherieplatten nicht selten findet (Abb. 4).

Um die eigenartigen bandartigen Granulabilder zu bekommen, ist es nötig, möglichst trockene Agarröhrchen zu nehmen, da der Wassergehalt der Hefe bei ihrer Entstehung eine gewisse Rolle spielt. Mehrere Tage alte Kulturen (Agarschrägröhrchen) übergießt man mit dem α -Naphthol-Paraphenyldiamingemisch und läßt die Lösung längere Zeit einwirken. Die Bilder sind den Kernkörperchen überraschend ähnlich, nur entspricht dem Kern die große Vakuole der Hefe. Das, was dem Kernkörperchen entspricht, ist keineswegs dasselbe wie die Kernkörperchen der Gewebszellen, obwohl manche Untersucher das Vakuolenkorn als Kernkörperchen auffassen. Schon aus dem Grunde kann es nicht dem Nucleolus entsprechen, weil der Nucleolus der Gewebszelle niemals eine primäre Oxydasereaktion gibt. Sicher enthält das

Korn aber Substanzen, die mit Nucleolarsubstanzen verglichen werden können. Vor allem die 6. Abbildung deutet darauf hin, daß Beziehungen bestehen zwischen Bildung des Kernes und Bildung einer Vakuole, die häufig eine selbständige lipoidartige, auch durch Sudan darstellbare Wand besitzt, so daß man sie in Parallele bringen kann mit der Bildung der Kernmembran. Beides, Korn und Kernmembran, sind die Folge ähnlicher Stoffwechselvorgänge. Das Korn sitzt meist der Vakuolenwand an, kann aber auch an ihr liegen, so daß die Ähnlichkeit mit Kern und Kernkörperchen noch größer wird. Besonders eigenartig sind die regelmäßigen Fäden, die zuweilen in einzelne Granula sich auflösen, so daß Bilder entstehen, wie man sie auch in den Lymphocyten bei Typhus fand.

Wenn Kern und Kernkörperchen keine primären Strukturen, sondern nur das Ergebnis von Lösungs- und Fällungsscheinungen innerhalb der Zelle sind, so liegt die Frage nahe, ob es überhaupt in der Zelle feststehende, unveränderliche Gebilde mikroskopischer Natur gibt.

Es scheint zunächst, daß die Chromosomen derartige Strukturen darstellen könnten, denn die Unveränderlichkeit der Arten spricht für eine Unveränderlichkeit der Chromosomenindividualität. Man darf sich aber keinem Irrtum aus morphologischen Gründen hingeben. Auch das Körperskelett der Wirbeltiere erscheint als eine unveränderliche Einheit, so beständig, daß der Zoologe aus einem Knochen nicht nur Art, sondern auch Aussehen und Eigenschaften eines Tieres bestimmt. Und doch weiß jeder Chirurg, daß der Knochen fast eine plastische Masse ist. Einem rein morphologisch denkenden Anatomen scheinen durch die Knochenvorsprünge die Muskelansätze bestimmt, dem Physiologen sind die Knochenfortsätze das Ergebnis der Muskelwirkung. Nur vom morphologischen Standpunkte aus ist der Gedanke durchführbar, daß die Schädelknochen modifizierte Wirbel sind, denn nur vom Standpunkt des Morphologen ist diese Hypothese verständlich und berechtigt.

Die anscheinend unveränderliche Struktur der Chromosomen kann also sehr wohl nur dadurch bedingt sein, daß gewisse Prozesse sich wie bei der Knochenbildung konstant abspielen, und daß die Variationsbreite, innerhalb deren Veränderungen möglich sind, nur gering ist.

Da bei der Teilung der Zelle die Oberflächensubstanz der Chromosomen sich abspalten und auf die Nucleolen übergeht, kann man die Chromosomen auffassen als eine mengenmäßig bestimmte Verbindung von Chromatin und Nucleolarsubstanz.

Ebensowenig wie das Kernkörperchen und die Chromosomen sind die Centrosomen unveränderliche Gebilde. Sie können sich beliebig

vermehren, wenn auch immer nur Centrosomen (Centriolen) neue Centrosomen erzeugen (*Meves*). Das tut aber auch die Nucleolar-substanz, die allein Nucleolen bilden kann (*Zimmermann*). Die Rolle der Centrosomen liegt wohl darin, daß die bei der Lösung der Kernkörperchen frei werdenden Fermente durch Vermittlung der Centriolen in ihren Wirkungen mengenmäßig geregelt werden. An Stelle der in Wegfall kommenden Oberfläche der Kernkörperchen tritt eine zweite Oberfläche mit spezifischen Leistungen.

Noch weniger konstant als die Kernbestandteile sind die Strukturen des Protoplasmas.

Das Wesentliche eines Lebewesens sind demnach nicht mikroskopische Strukturen, sondern eine bestimmte Menge Chromatin, Nucleolarsubstanz, Chromosom und Plasma. Das heißt aber, die Bildung jeder mikro- oder makroskopischen Struktur ist beeinflußbar. Hierin liegt die Möglichkeit der Veränderung und Mutation. Auf Grund der Untersuchungen über Oxydasen ist es möglich, sich eine Anschauung über die Entstehung dauernder und vorübergehender Veränderungen zu bilden. Angenommen, das Leben einer Zelle hinge von der Bildung einer Membran ab, und diese Bildung sei nur möglich, wenn eine bestimmte Menge Lipoideiweiß, Peroxydase, H_2O_2 und Chromogen vorhanden ist. In der Umgebung der Zelle seien Chromogene vorhanden, die aufgenommen werden, und daneben NH_2 -Verbindungen, die nicht in die Zelle eintreten. Die Lipoideiweißmembran, die gebildet werden muß, soll sich so verhalten, wie die Substanz der roten Blutkörperchen nach Eintritt der Naphtholperoxydasereaktion. Kommt die Zelle in eine andere Umgebung, die so einwirkt, daß die der Zelle zur Verfügung stehende Menge H_2O_2 herabgesetzt wird, so kann die Membran sich nicht bilden und die Zelle geht zugrunde. Nun ist aus Blutversuchen bekannt, daß die Menge H_2O_2 herabgesetzt werden kann, wenn NH_2 -Verbindungen anwesend sind. Würde die Zelle die NH_2 -Verbindungen nunmehr aus der Umgebung aufnehmen, dann bleibt sie erhalten. Es ist denkbar, daß der Einbau von NH_2 -Gruppen die Struktur der Zelle verändert, man braucht nur an den Einfluß von Amidoessigsäure auf die Form von *Bacterium Metschnikoff*, *Typhi* und *Coli* zu denken. Kommt die Zelle wieder in ihre alte Umgebung, so kann sie entweder die Aufnahme der Amidoverbindungen fortsetzen und damit ihre neue Form beibehalten, sie ist mutiert, oder sie nimmt wie früher die Stickstoffverbindungen nicht mehr auf und erhält ihre alte Form wieder. Dann lag nur eine Variation vor.

Die spezifische Leistung einer Zelle beruht darauf, daß durch Vermittlung des Kernkörperchens in der Zelle bestimmte Ersatzvorräte aufgespeichert werden. Nur solange diese nicht aufgebraucht sind, reagiert die Zelle ununterbrochen in der gleichen Weise. Sind die Re-

servevorräte zu Ende, so bedarf die Zelle der Ruhe, um die Aufspeicherung zu erneuern, die Zeit zwischen Abbau und Aufbau ist am geeignetesten, um einen Einblick in die Arbeit der Zelle zu gewinnen und die Bedeutung der Strukturen festzulegen. Dieser Satz hat auch für geistige Vorgänge seine Bedeutung. Das farbige Sehen ist abhängig vom Zustand der Zapfen und von der Wellenlänge des Lichtes. Solange die Ersatzvorräte der Zapfen nicht erschöpft sind, entspricht einer bestimmten Wellenlänge eine bestimmte Farbempfindung, und das Nachbild ist immer die entsprechende Gegenfarbe. Blickt man länger in eine Lichtquelle, etwa in Gasglühlicht, so tritt Verbrauch der Ersatzstoffe bis zur Erschöpfung ein. Schließt man nun die Augen und läßt sich die Zellen wiederherstellen, so erscheinen die Farben in der Reihenfolge: gelb, rot, grün, blau, d. h. der Farbe gelb entspricht der tiefste Abbau, dann folgt rot, und bei der Empfindung blau ist der Aufbau vollkommen. Von diesem Augenblick an erscheinen die Kontrastfarben in der gewöhnlichen Folge. Der Gesetzmäßigkeit dieser Erscheinungen muß eine gesetzmäßige Aufeinanderfolge der physikalisch-chemischen Vorgänge in der Zelle entsprechen, die, wenn wir geeignete Färbemethoden besäßen, auch nachweisbar sein müßten.

Derjenige Teil der Nucleolarsubstanzen der durch die sekundäre Naphtholmethode darstellbar ist, zeigt, wie bereits gesagt, folgendes Verhalten.

Bei der Teilung der Zelle geht er auf die Chromosomen über, wo er zugleich einen Schutzüberzug bildet, der nach erfolgter Teilung sich wieder loslässt und die Nucleolen- sowie gleichzeitig die Kernmembranbildung veranlaßt. Von den Nucleolen wird ständig diese Substanz gelöst und kann wieder granulär im Kern und Protoplasma verändert und ausgefällt werden. Wie weit bei der Zersetzung der Nucleolarsubstanzen (vielleicht durch Reduktion) primäre Oxydasen gebildet werden, ist nicht sicher, aber sehr wahrscheinlich für einige Zellen, so für die Eiterzellen, wo die gesamte Nucleolarsubstanz aus dem Kern verschwindet, oder bei den Eiweißzellen von Arion, wo einzelne Kernkörperchen, auch ohne daß Formol angewendet wird, die Oxydasereaktion geben. Sicher ist, daß diese ausgeschiedenen veränderten Kernkörperchensubstanzen die Fähigkeit besitzen, primäre Oxydasen an sich niederzuschlagen und vor Zersetzung zu schützen. Es ist somit auch der Gedanke naheliegend, daß Oxydasen, die von außen in die Zelle eingeführt werden und etwa aus der Nahrung stammen, von diesen Stoffen, die wie Rezeptoren wirken, gebunden und zum Aufbau der Zellen verwendet werden. Im weiteren Aufbau werden dann ringförmige Verbindungen (Chromogene) und der Komplex der Verdauungsfermente eingebaut, so daß die Substanz der Kernkörperchen eine Mischung der für die Zelle wichtigsten Stoffe enthält.

Da die Strukturen der Zellen verschieden sind, wird auch die Zusammensetzung der einzelnen Kernkörperchen nicht gleichmäßig sein, immer wird aber das Kernkörperchen die für den Stoffwechsel seiner Zelle wichtigsten Bausteine (wenn auch in Form von Partialen) enthalten. Bei den Stoffwechselvorgängen innerhalb von Zellen spielen fermentative Systeme meist eine größere Rolle als die Fermente. Der Unterschied zwischen beiden besteht nur darin, daß die Fermente stabile fermentative Systeme darstellen, während sonst der fermentative Vorgang durch Zusammentreten verschiedener Stoffe, die auch von verschiedenen Strukturen geliefert werden können, zustandekommt. Ein fermentatives System ist für die Zelle leichter zu regeln wie ein fertiges Ferment. Besonders in Hinsicht auf die verdauenden Fermente, die Verdauungsvorgänge und die autolytischen Prozesse sind diese Betrachtungen von Belang. Der Unterschied zwischen Wirbellosen und Wirbeltieren besteht darin, daß die Wirbellosen einen einheitlichen Verdauungssaft, die Wirbeltiere Enzymketten besitzen (*Jordan, Hirsch*). Nach *Hirsch* muß diese Tatsache von großer Bedeutung sein für den Schutz des Tieres vor einer Überschwemmung mit Produkten der Verdauung. Die Zerlegung in Enzymketten schützt zugleich den Körper vor der Einwirkung der Fermente selbst, indem er die Fermenttätigkeit in getrennte Gebiete verweist. Die einzelne Zelle verhält sich, was das Auftreten eigener lytischer Enzyme betrifft, die sie zu ihrem Auf- und Abbau braucht, wie die Wirbellosen, sie ist, wenn einmal lytische Fermente im Übermaß sich in ihr bilden, wenig gegen die Wirkung derselben geschützt.

Wie bei dem Abbau der Zelle oxydierende Stoffe frei werden, so werden sie bei dem Aufbau der Zelle eingebaut. Der Ab- und Aufbau kann so verlaufen, daß die oxydierenden Substanzen nicht selbst nachweisbar sind, weil sie im Intermediärstoffwechsel verändert werden. Bei dem Extrem des Zellaufbaues, der Geschwulst sind sie im Kern als sekundäre Oxydasen vermehrt nachweisbar, bei dem Extrem des Zellabbaus, dem d'Hérelleschen Phänomen, liegen noch keine Beobachtungen vor.

Es läßt sich aber aus Veränderungen, die man bei absterbenden, autolytisch zerfließenden Infusorien macht, der Schluß ziehen, daß auch hier oxydierende Substanzen auftreten, die in geeigneten Fällen der Untersuchung zugänglich sind.

Literaturverzeichnis.

¹ Höber, Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe. Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig und Berlin. — ² v. Gaza, Beobachtungen über Vitalfärbung an einem Knochensarkom. Bruns' Beitr. z. klin. Chir. **135**, 476. — ³ Loele, Über vitale Granulafärbung mit sauren Farbstoffen. Folia haematol. **14**, 11. 1912. —

⁴ Goldmann, Vitale Färbung und Chemotherapie. Berlin. klin. Wochenschr. 1912, S. 1689 u. Beitr. z. klin. Chir. **48**, Heft 1, S. 1. — ⁵ Lumière, Auguste, Sur les colorations vitales et l'immunité du granule micellaire. Bull. hist. appl. 1925, Bot. Zentralbl. 1925. — ⁶ Rost, Über Kernfärbung an unfixierten Zellen und innerhalb der lebenden Tiere. Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **137**, 359. — ⁷ Guillèremont, Sur la coloration vitale des chondriosomes. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **89**, 507. 1923. — ⁸ Bethe, Biol. Zentralbl. 1895, S. 140. — ⁹ Grunert, Augensymptome bei Vergiftung mit Paraphenyldiamin. Ber. d. ophth. Ges. Wiesbaden 1904. — ¹⁰ Spanjer, Herford, Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **205**, 276. 1911. — ¹¹ Hertwig, Allgemeine Biologie. Jena: Verlag Fischer. — ¹² Reddingius, A., Über die Kernkörperchen. Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **162**, 206. — ¹³ Unna, Chromolyse. Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden von Abderhalde, Abt. V, Teil 2, Heft 1. — ¹⁴ Loele, Sekundäre Naphtholreaktion. Leipzig: Verlag Dr. W. Klinkhardt. — ¹⁵ Jordan, H. J. und G. Chr. Hirsch. Einige vergleichend physiologische Probleme der Verdauung bei Metazoen. Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie Bd. III. Berlin: Verlag J. Springer.
