

(Aus der Chirurgischen Universitätsklinik [Direktor: Geh.-Rat *Küttner*] und der Medizinischen Universitätsklinik [Direktor: Professor *Stepp*] zu Breslau.)

Über den mikrochemischen Nachweis von Kernträmmern als echte Kernsubstanz durch die Nuclealreaktion.

Von
C. Barthels und K. Voit.

Mit 4 Abbildungen im Text.

(Eingegangen am 5. Februar 1931.)

Die meisten der in der Histologie und Bakteriologie zur Verwendung kommenden Färbemethoden arbeiten mit präformierten Farbstoffen. Es wird dabei im morphologischen Objekte immer da zum Haften des Farbstoffes kommen, wo die histologische Materie die entsprechenden chemischen oder physikalischen Bedingungen dazu enthält (*Feulgen*). Doch sind wir im allgemeinen nicht in der Lage, den ganzen Färbevorgang so zu zerlegen, daß wir bei den Methoden mit fertigen Farbstoffen etwa von einer mikrochemischen Reaktion im strengen Sinne des Wortes sprechen können. Es sei nur daran erinnert, daß es z. B. verhältnismäßig leicht gelingt, ein Präparat zu überfärben, so daß sich auch schließlich Zellbestandteile anfärben, die sonst im allgemeinen den betreffenden Farbstoff nicht anzunehmen pflegen. Auch wird wohl niemand so weit gehen, in der Anfärbbarkeit des Kerns mit basischem Methylenblau oder Hämatoxylin etwa eine spezifische Reaktion auf eine Nucleinsäure zu erblicken, wenn man auch ganz allgemein der Anschaung ist, daß das im Zellkern vorhandene saure Prinzip, das die Aufnahme des basischen Farbstoffes bedingt (Salzbildung ?), vorwiegend auf die im Kern enthaltenen Nucleinsäuren zurückzuführen ist. Es gibt aber bekanntlich auch eine Reihe anderer Zellbestandteile, die sich mit basischen Farbstoffen anfärben und die ganz bestimmt nicht das Geringste mit Nucleinsäure zu tun haben. Man würde großen Trugschlüssen zum Opfer fallen, wollte man aus dem Verhalten einzelner Zellbestandteile bestimmten Farbstoffen gegenüber weitgehende und bindende Schlüsse hinsichtlich ihrer chemischen Beschaffenheit oder ihrer Entstehung ziehen.

Viel eindeutiger liegen die Verhältnisse bei der von *Feulgen* und *Rossebeck* angegebenen *Nuclealfärbung*, die einen wirklichen mikrochemischen Nachweis einer Nucleinsäure, nämlich der Thymonucleinsäure, darstellt.

Der Nuclealfärbung liegt die *Nuclealreaktion* zugrunde. Diese beruht auf der Fähigkeit der Thymonucleinsäure, nach milder, partieller Hydrolyse unter Abspaltung der beiden Purinderivate Guanin und Adenin reduzierende Gruppen freizumachen, die sich wie echte Aldehydgruppen verhalten und mit fuchsin-schwefliger Säure unter Bildung eines blauvioletten Farbstoffes reagieren. Diese Eigenschaft wird dazu benutzt, eine „Färbung“ anzustellen, die nichts weiter darstellt als die Anwendung einer chemischen Reaktion, die auch jederzeit im Reagensglas ausführbar ist, auf mikroskopische Präparate zum Nachweis eines chemisch wohl bestimmten Körpers, eben der Thymonucleinsäure. Wir haben hierbei keine präformiert vorhandenen Farbstoffe, sondern erst bei der Reaktion entsteht auf chemischem Wege ein Farbstoff, der dann die „Färbung“ liefert. Fehlt im Präparat der chemisch nachzuweisende Körper, so kann es auch nicht zur Reaktion und damit auch nicht zur Anfärbung kommen; eine Überfärbung ist also beispielsweise völlig unmöglich. Hydrolysiert man ein beliebiges mikroskopisches Präparat in n-Salzsäure bei 60° 4 Minuten lang, und behandelt das Präparat nach Auswaschen der Säure $\frac{3}{4}$ —1 Stunde mit fuchsin-schwefliger Säure, so tritt überall da, wo Thymonucleinsäure vorhanden ist, eine starke Violettfärbung auf. Auf den genaueren chemischen Mechanismus und die an die Nuclealreaktion sich anschließenden biologischen Fragen, sowie auf die ausführlichere Technik soll hier nicht mehr eingegangen werden; wir verweisen auf die Arbeiten von *Feulgen* und seiner Schüler, sowie auf die Untersuchungen von *Redenz*, *Voss*, *Wermel*, *Breslau* und *Skremin* u. a.

Wir haben mit dieser Methode also einen sehr exakten Nachweis eines ganz charakteristischen chemischen Kernbestandteiles, nämlich der Nucleinsäuren vom Typus der Thymonucleinsäure, oder, wie wir vielleicht jetzt besser sagen, der Nuclealkörper. Da die Nuclealkörper obligatorisch für Kerne sind (*Feulgen*, *K. Voit*), insbesondere bisher beim tierischen Gewebe noch keine Kerne beschrieben wurden, die anucleal wären und da im Zelleib die Reaktion immer negativ blieb¹, so darf man annehmen, daß ein Zellbestandteil, bei dem die Nuclealfärbung positiv ausfällt, echte Nuclealkörper enthält, also mit dem Zellkern in engstem Entstehungsgeschichtlichen und chemischen Zusammenhang steht.

Mit Hilfe der Nuclealfärbung ist es gelungen, eine Reihe biologisch wichtiger Fragen zu klären, insbesondere sind wir jetzt viel eingehender als früher über das Vorkommen der ursprünglich — und wie sich jetzt zeigte, fälschlicherweise — nur als „tierische“ Nucleinsäure benannten Thymonucleinsäure unterrichtet; ferner ist es gelungen, bei den verschiedensten Zellbestandteilen ihren engsten Zusammenhang mit dem Zellkern nach-

¹ Auf das von *Feulgen* und *K. Voit* im Protoplasma der Zellen gefundene „Plasmal“, einen aldehydartigen Körper, der gleichfalls mit fuchsin-schwefliger Säure eine Reaktion gibt, mit dem Zellkern aber in keinerlei Zusammenhang steht, sei hier nur verwiesen. Bezüglich seines andersgearteten chemischen Verhaltens und seiner Abgrenzung gegen die Nuclealkörper siehe die Arbeiten von *Feulgen* und *K. Voit*.

zuweisen. Wir verweisen auch hier auf die obenerwähnten Arbeiten von *Feulgen* und seinen Schülern.

Verhältnismäßig gering ist die Zahl der rein anatomischen Arbeiten, die sich mit den Ergebnissen der Nuclealfärbung befassen (*Redenz, Berg, Voss*); noch gar nicht hat unseres Wissens der pathologische Histologe die neue Methode in den Bereich seiner Untersuchungen hereingezogen. Dies mag vielleicht teilweise seinen Grund darin haben, daß sich der Histologe im allgemeinen scheut, ein Präparat der salzsauren Hydrolyse bei 60° auszusetzen; es erscheint natürlich nicht unmöglich, daß es durch den Eingriff zu Veränderungen in dem Bau der Zellbestandteile kommt, die die spätere *morphologische* Betrachtung und Deutung des Befundes zum mindesten erschweren, vielleicht sogar unmöglich machen. Wir haben kürzlich gemeinsam mit Herrn Medizinalpraktikant *Balzer* eingehende Untersuchungen über diese Frage begonnen und werden darüber nach Abschluß unserer Versuche an anderer Stelle ausführlich berichten.

Wenn es nach dem derzeitigen Stand unserer Kenntnisse also auch vielleicht noch nicht erlaubt ist, allzu weitgehende morphologische Schlüsse auf Grund des Verhaltens eines Zellbestandteiles zur Nuclealfärbung zu ziehen, so bleibt der große Wert der neuen Methode als *mikrochemischer Nachweis der Thymonucleinsäure*, als eines spezifischen Kernbestandteils, weiter bestehen. Und damit übertrifft die Nucleal-,färbung“ die meisten anderen in der Histologie gebräuchlichen Färbemethoden. Sie wird darum immer dort Anwendung finden müssen, wo es gilt, festzustellen, ob ein Zellbestandteil tatsächlich echtes Kernmaterial darstellt oder nicht. Fällt die Reaktion in dem zu untersuchenden Gebilde positiv aus, so darf, wie erwähnt, mit Sicherheit geschlossen werden, daß hier echte Kernsubstanzen vorliegen. Diese Art der Fragestellung ist für den Histologen unter Umständen von Bedeutung, denn man findet bei ausführlichen Beschreibungen von eingehenden Untersuchungen immer wieder die Angabe, daß diese und jene stark gefärbten Gebilde „wohl als Kernsubstanzen anzusprechen sind“. Es gibt in der Pathologie tatsächlich eine Reihe von Zellbestandteilen, von denen bis heute nicht beweisend gesagt werden kann, ob sie mit den Kernen in Zusammenhang stehen oder nicht.

Das gilt unter anderem für die sog. *Flemmingschen Körperchen*, insbesondere aber für mehr oder weniger formlose Bildungen innerhalb von Gewächsen. Ihr Verhalten bestimmten Farbstoffen gegenüber läßt zwar gewisse Analogieschlüsse zu, die auch in vielen Fällen zum richtigen Ergebnis führen; ein einwandfreier mikrochemischer Nachweis konnte jedoch unseres Wissens bis jetzt nicht erbracht werden.

Wir machten es uns daher zur Aufgabe, den Wert der Methode an einigen Schulbeispielen zu erproben, um ihr einen größeren Anwendungskreis, auch in der Histologie zu sichern.

Aus einer großen Zahl pathologischer Präparate wählen wir hier zwei aus, in denen bei den üblichen Färbemethoden diese eigenartigen Gebilde sich stark mit basischen Farbstoffen färben. Es handelt sich hierbei den zugrundeliegenden Krankheitsbildern entsprechend, um Gebilde, die nach den bisherigen Anschauungen schon immer als Kerntrümmer angesprochen wurden; doch stützte sich diese Annahme auf das färberische Verhalten, und dieser Rückschluß beruhte in erster Linie auf morphologischen Eigentümlichkeiten und auf der Beobachtung von Übergangsbildern, die sich noch mehr Ähnlichkeiten mit Kernstrukturen erhalten hatten. Schwierigkeiten in der Deutung stellten sich bisher hierbei immer dann ein, wenn es sich um kleine Teile handelte, die völlig strukturlos waren und in denen sich gelegentlich protoplasmaähnliche Substanzen eingeschlossen fanden.

Da es uns zunächst lediglich darauf ankommt, zu zeigen, welche Anwendungsmöglichkeiten auch für die Histologie diese Methode besitzt, beabsichtigen wir in dieser Veröffentlichung nicht, für spezielle Fälle noch gegebenenfalls bestehende Streitpunkte zu klären. Unsere „Schul“beispiele beziehen sich darum lediglich auf Veränderungen, deren Kernnatur heute kaum mehr in Zweifel steht.

So zeigt Abb. 1 Schnitte durch die Milz eines mit Diphtherietoxin getöteten Meerschweinchens¹; man erkennt mühelos die zahlreichen Kerntrümmer, wie sie sich bei der Hämatoxylin-Eosinfärbung darstellen. Die großen noch erhaltenen Kerne heben sich deutlich von den oftmals punktförmigen, stark gefärbten Teilen ab, die zum Teil in protoplasmaähnlicher Umsäumung gelegen in dem Fachschrifttum unter anderem auch als *Flemmingsche* Körper bezeichnet werden. An anderen Stellen sieht man Übergangsbilder zu den noch besser erhaltenen Kernen.

Abb. 1 a veranschaulicht eine ähnliche Stelle in einem Schnitte, den wir mit der *Nuclealreaktion* behandelten. Das an sich völlig farblose Protoplasma ist zur besseren Gegenwirkung ganz leicht mit Eosin getönt. Die hier leuchtend violettblau (in der Photographie schwarz) dargestellten fraglichen Gebilde zeigen somit durch ihr positives Verhalten der Nuclealreaktion gegenüber, daß es sich hierbei um Nuclealkörper, also mit volliger Sicherheit um echtes Kernmaterial im chemischen Sinne handeln muß.

Von vornherein möchten wir dem Einwande begegnen, es könnten hier Kunstprodukte vorliegen, die etwa durch die vorausgegangene Hydrolyse oder die Behandlung mit fuchsinschweißiger Säure entstanden wären. Schon *Feulgen* und seine Schüler wiesen wiederholt darauf hin, daß die milde Hydrolyse, abgesehen von einer ganz geringen

¹ Das Präparat wurde uns in liebenswürdiger Weise aus einer Versuchsreihe von Herrn Dr. *Jeckeln* aus dem hiesigen pathologischen Institut zur Verfügung gestellt.

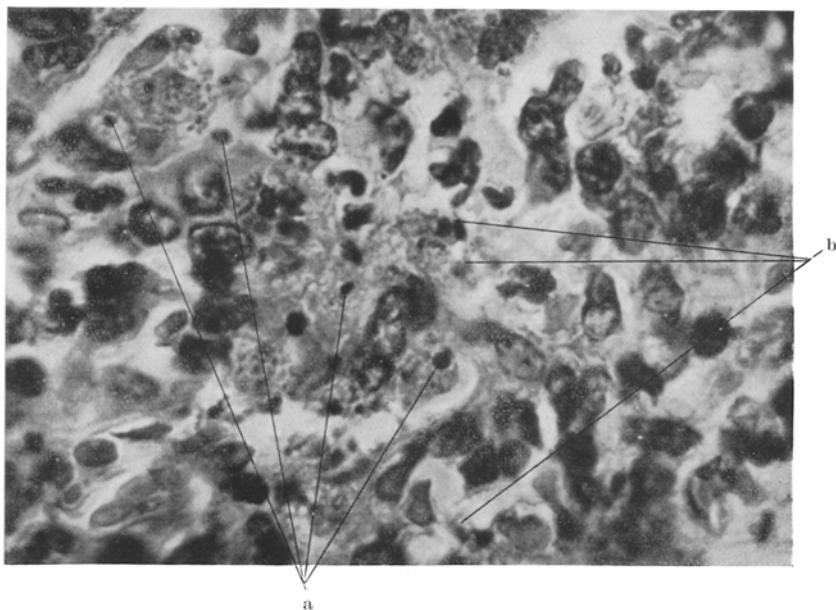


Abb. 1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung. a Flemmingsche Körperchen. b Kerntrümmer (?).

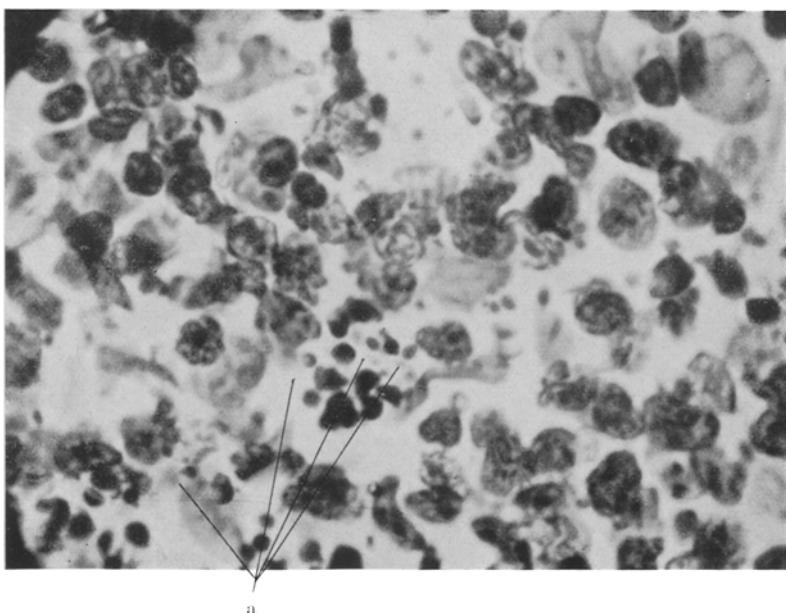


Abb. 1a. Nuclearreaktion. a Chemisch dargestellte Nuclealkörper.

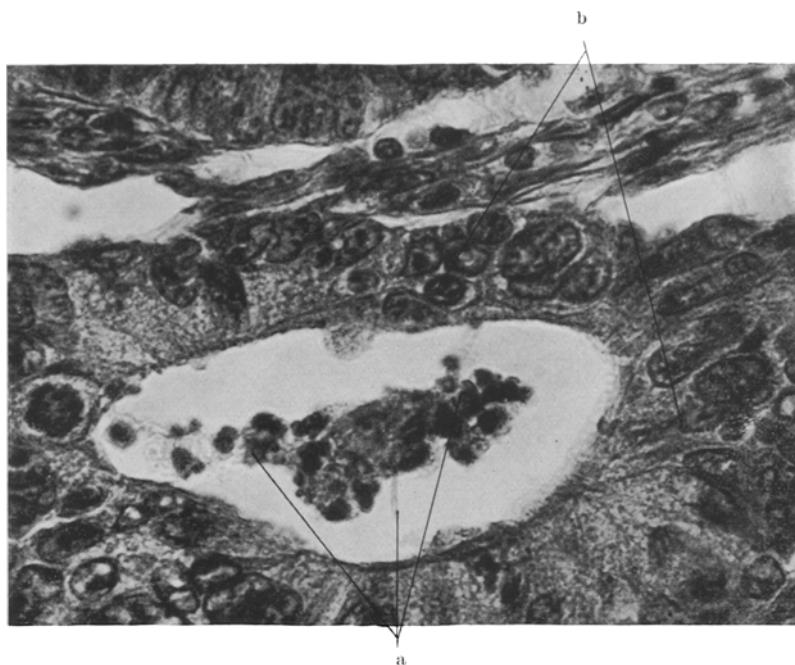


Abb. 2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung. a Bläscheninhalt aus strukturlosen Bestandteilen.
b Zylinderzelliger kareinomatöser Drüsenschlauch.



Abb. 2a. Nuclearreaktion. a Der Inhalt als „echte“ Kernsubstanz durch die Nuclearreaktion nachgewiesen. b Karzinomatöser Drüsenschlauch.

Quellung, keine wesentlicheren morphologischen Veränderungen hervorruft, wie ja aber auch die meisten der in der histologischen Technik verwandten Einbettungs- und Darstellungsverfahren vom morphologischen Standpunkte aus nicht als gleichgültige Verfahren bezeichnet werden können. Wir haben, wie oben schon erwähnt, uns bei zahllosen Schnitten, namentlich am normalen Gewebe immer wieder überzeugen können, daß in morphologischer Hinsicht bei dieser Anwendung der Nuclealfärbung, eine nennenswerte Änderung nicht stattfindet. Wir fanden im Gegenteil, daß auch nach der Hydrolyse die Kernstruktur meistens klar und auffallend deutlich zutage tritt.

Abb. 2 bringt die Wiedergabe eines zylinderzelligen Adenocarcinoms. Innerhalb der krebsigen Drüsenschläuche befinden sich Gebilde, die in ihrer Größe in auffälligem Gegensatz zu den großen Kernen der Gewächszellen stehen, und die sich durch ihre tiefdunkle Färbung auszeichnen. Auch hier ist wohl ohne Zweifel anzunehmen, daß es sich um degenerative Kernbestandteile handelt, obgleich die stark chromatinreichen, mehr oder weniger verklumpten Gebilde keinerlei Bau mehr erkennen lassen.

Abb. 2 a zeigt einen entsprechenden Abschnitt, den wir ebenfalls mit der *Nuclealreaktion* behandelten. Die Gebilde innerhalb des umrandenden krebsigen Drüsenschlauches sind deutlich nuclealpositiv und müssen dadurch einwandfrei als Kernsubstanz angesprochen werden. Besonders auffallend ist die scharfe Umgrenzung dieser Kerntrümmer, die im Gegensatz zu den verschwommeneren Strukturen steht, die sich bei der Hämatoxylin-Eosinfärbung zeigen. Dies ist verständlich, wenn man berücksichtigt, daß es bei dieser nur zu einer Darstellung mittels bestimmter Farbstoffe gekommen ist, während es sich bei den Nuclealpräparaten um eine mikrochemische Reaktion und hierdurch hervorgerufene Farbstoffbildung handelt. Naturgemäß ist sie nur dazu sehen, wo Thymonucleinsäure vorhanden ist; alle übrigen Teile des Schnittes sind, wie die Abbildung zeigt, vollkommen farblos und die thymonucleinsäurehaltigen Gebilde heben sich im Originalpräparat leuchtend violett vom glasklaren Untergrunde ab, in der Abbildung schwarz.

Sämtliche Präparate wurden genau nach der Originalvorschrift von *Feulgen* unter strengster Berücksichtigung aller technischen Einzelheiten ausgeführt. Die „Färbung“ des aufgezogenen Schnittes dauert allerhöchstens zwei Stunden. Beziiglich der Vorbehandlung sei bemerkt, daß die Einbettung des Materials wie üblich erfolgt, lediglich ist Formalin wegen seines Aldehydcharakters zu vermeiden und die Fixation am besten in Sublimat-Eisessig vorzunehmen.

Zusammenfassung.

Vermittels der Nuclealreaktion *Feulgens* lassen sich bekanntlich echte Kernsubstanzen mikrochemisch nachweisen. Die Bedeutung der Methode zur Identifizierung von Kerntrümmern und ähnlichen Gebilden wird an Hand einiger histologischer Beispiele dargetan.

Schrifttum.

Berg, W.: Z. mikrosk.-anat. Forschg **7**, 421 (1926). — *Feulgen, R.:* Die Nuclealfärbung bei *E. Abderhalden*: Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. 5, Teil 2, S. 1055 (dort weiteres Schrifttum). — *Feulgen, R. u. K. Voit:* Pflügers Arch. **206**, 389 (1924). — *Redenz, E.:* Verh. physik.-med. Ges. Würzburg **40**, 220 (1924). — *Voit, K.:* Arch. exper. Path. **122**, 66 (1927); Fol. haemat. (Lpz.) **39**, 496 (1930); Z. exper. Med. **55**, 564 (1927). — *Voss, H.:* Klin. Wschr. **19**, 887 (1929). — *Wermel, E.:* Z. Zellforschg **5**, 400 (1927).
