

(Aus dem Pathologischen Institut [Direktor: Professor Dr. *Fr. Henke*] und der Medizinischen Klinik [Direktor: Professor Dr. *Stepp*] der Universität Breslau.)

## Untersuchungen über das Vorkommen von Thymonucleinsäure in ausgepflanzten und embryonalen Geweben.

Von

Martin Silberberg und Kurt Voit.

Mit 2 Abbildungen im Text.

(Eingegangen am 22. Juli 1931.)

Mit den in der Gewebelehre üblichen Färbungen mit unmittelbar färbenden Stoffen kann man zwar weitgehend den gestaltlichen Aufbau der Zellen und ihrer Bestandteile untersuchen, doch man ist meist nicht in der Lage, aus dem färberischen Verhalten bindende Rückschlüsse auf die chemische Zusammensetzung der die Zellen aufbauenden Stoffe zu ziehen. Man nimmt im allgemeinen an, daß z. B. die Anfärbung des Kerns mit basischen Farbstoffen auf eine Art Salzbildung zurückzuführen ist; es wird aber niemand einfallen, hierin etwa einen echten mikrochemischen Nachweis auf Nucleinsäuren, die ja wohl vorwiegend das saure Prinzip im Kern darstellen, zu sehen (*Feulgen*<sup>1)</sup>).

So gelingt es leicht, durch Überfärbung auch Zellbestandteile mit basischen Farbstoffen anzufärben, die an sich nicht sauer ansprechen, und es ist ferner allgemein bekannt, daß auch Körper, die mit Nucleinsäure chemisch ganz sicher nichts zu tun haben, eine besondere Verwandtschaft zu manchen dieser Farbstoffe besitzen können wie beispielsweise die Dottermasse, der Schleim usw.

Es ist also nicht möglich, auf rein färberischem Wege die Frage nach der chemischen Beschaffenheit der Zellbestandteile genauer zu klären; man ist dabei vielmehr auf meist umständliche Trennungswege angewiesen, die zwar dann in vielen Fällen Aufschluß über die chemische Zusammensetzung der untersuchten Stoffe geben, die aber häufig keinen sicheren Schluß zulassen, ob die gefundenen Körper auch wirklich nur dem Kern der Zelle und nicht auch dem Zelleib angehören. Eine Ausnahme macht in dieser Hinsicht die Nuclealfärbung von *Feulgen* und *Rossenbeck*, die es einwandfrei ermöglicht, einen ganz bezeichnenden chemischen Bestandteil des Kerns, nämlich die Thymonucleinsäure, wirklich als solchen streng chemisch in ihren Lagebeziehungen nachzuweisen.

Der Nuclealfärbung liegt die Nuclealreaktion zugrunde. Man versteht unter dieser die Eigenschaft der Thymonucleinsäure, nach milder teilweiser saurer Hydrolyse bei 60° echte Aldehydgruppen abzuspalten, die mit fuchsin-schwefliger Säure unter Bildung eines blauvioletten Farbstoffes reagieren. Wendet man die Nuclealreaktion auf histologische Schnitte an, so erhält man die Nuclealfärbung. Läßt man also auf irgendeinen histologischen Untersuchungsstoff Normalsalzsäure 4 Minuten lang bei 60° einwirken und behandelt man ihn dann einige Stunden lang mit fuchsin-schwefliger Säure, so wird überall da im Schnitt, wo sich Thymonucleinsäure findet, die oben beschriebene Reaktion auftreten. Man hat auf diese Weise einen genauen und verhältnismäßig einfachen Weg an der Hand, einen wichtigen Kernbestandteil, die Thymonucleinsäure, oder wie man vielleicht besser sagt, Nuclealkörper mikrochemisch nachzuweisen und zu untersuchen, in welchen Zellbestandteilen diese Körper sich tatsächlich finden. Eine Überfärbung ist natürlich ausgeschlossen.

Bezüglich der Durchführung der Nuclealfärbung und der ihr zugrunde liegenden genaueren chemischen Reaktionen sei auf die eingehenden Arbeiten von *Feulgen* und seiner Schüler verwiesen.

In der normalen und pathologischen Gewebelehre hat dieser neue einfache mikrochemische Nachweis bis jetzt im allgemeinen nur wenig Anwendung erfahren. Und doch wird man die Methode nicht entbehren können bei allen Fragen, bei denen es sich darum handelt, festzustellen, inwieweit ein fraglicher Zelleinschluß echte Kernbestandteile darstellt (*K. Voit* und *Roese*, *Barthels* und *K. Voit*<sup>2</sup>). Ihre Anwendung wird weiter immer dann von Bedeutung sein, wenn es gilt, nachzuweisen, ob die Kerne irgendwelcher pathologischer oder in normalen Geweben meist nicht vorhandener Zellen in gleicher Weise wie die normalen Zellkerne Nuclealkörper enthalten. Es wurde daher untersucht, ob die Kerne der bei der Gewebszüchtung entstehenden Zellen hinsichtlich ihres Gehaltes an Thymonucleinsäure das gleiche Bild wie die Zellen, aus denen sie hervorgehen, bieten.

Um im ausgepflanzten Gewebe festzustellen, ob überhaupt und inwieweit die neugebildeten wachsenden Zellen Thymonucleinsäure enthalten, wurden Gewebsstückchen in der gebräuchlichen Weise ausgepflanzt. Keimfrei dem Kaninchen entnommene Milz wurde zerkleinert, dann wurden die Stückchen als Deckglaskulturen in heparinisiertem normalem Kaninchenblutplasma angelegt. Verfolgt man das Wachstum der Kulturen, so zeigt sich wie gewöhnlich nach 2—3 Tagen die bekannte Zellwanderung und echtes Wachstum mit Kernteilung einhergehend. Nebenausgewanderten Lymph-, Reticulum- und polyblastischen Freßzellen sieht man eindeutige Bindegewebszellen, die sich zum Teil unmittelbar teilend vermehren. Unter den sich teilenden Zellformen fallen in erster Reihe Doppelsterne auf. Die Kulturen wurden in einem Gemisch von Sublimat-eisessig gehärtet und in Celloidin eingebettet, dann zur Oberfläche gleichgeführt in Reihen geschnitten. Näheres über die Technik vergleiche *Silberberg* und *Voit*<sup>3</sup>.

Bei der Durchsicht der mikroskopischen Schnitte sieht man, daß auch in den ausgepflanzten Gewebsstückchen die wachsenden Zellen *einen*

reichen Gehalt an Thymonucleinsäure aufweisen, wie es die folgende Abbildung (Abb. 1) darstellt. Bei den Zellen im Wachstumshofe fällt

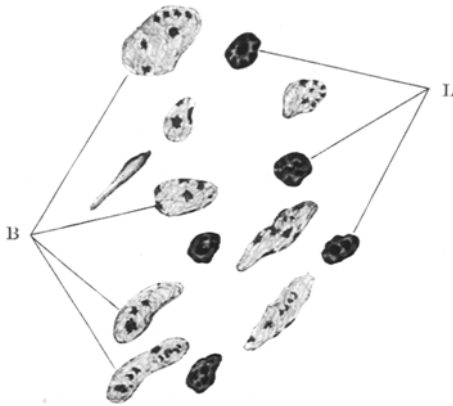


Abb. 1. Ausgepflanzte Kaninchenmilz. 3 Tage Wachstum. Darstellung der Nuclealkörper. Das Protoplasma ist völlig ungefärbt und daher unsichtbar. L Lymphzellen, B verschiedenartige Bindegewebszellen. Zeiss: Obj. 2 mm, Ap. Öl-Immersion Okul. 8 x.

es auf, daß die Polyblasten und die übrigen Lymphzellformen sowie die fressenden Reticulumzellen anscheinend mehr Thymonucleinsäure enthalten als die gekörnten weißen Blutzellen. Ganz besonders eindrucksvoll erscheinen die Kernkörperchen der Lymphzellen, die der Kernhaut breitbasig aufsitzen und ebenso wie am gefärbten Schnitt bei der Reaktion auf Thymonucleinsäure in der bezeichnenden Weise angeordnet stark positiv ansprechen. Auch bei

ausgepflanzten Gewebsstücken, die nur einen Tag im Glase wuchsen, ist der Unterschied zwischen den gekörnten weißen

Blutzellen und den ausgereiften Bindegewebszellen einerseits, den Lymph- und Freßzellen andererseits deutlich.

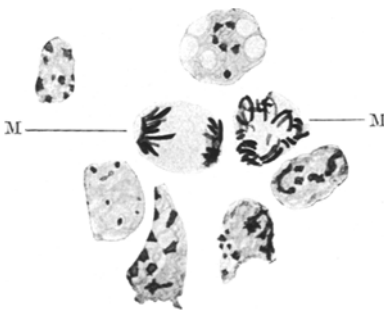


Abb. 2. Ausgepflanztes embryonales Gewebe von einem 3 Tage lang bebrüteten Hühnerei. 3 Tage Wachstum in der Auspflanzung. Kern und Kernkörperchen stark gefärbt, Zelleib völlig farblos und nicht sichtbar. M Mitose. Zeiss: Obj. 2 mm Ap. Öl-Immersion Okul. 8 x.

Die Bindegewebszellen im Wachstumshof ergeben einen außerordentlich stark bejahenden Ausfall der Reaktion ganz besonders dann, wenn sie sich im Zustand der Teilung befinden. Sind sie in ruhemdem Zustand, so ist der Gehalt der Zellen an Thymonucleinsäure geringer, soweit aus dem Grad des Reaktionsausfalles auf die Menge des vorhandenen Stoffes Schlüsse erlaubt sind (vgl. *Feulgen*).

Es erschien weiterhin wissenswert, zu untersuchen, wie sich die embryonalen Zellen zur Nuclealfärbung verhalten. Zu diesem Zweck wurden

befruchtete Hühnereier 3—5 Tage lang im Brutschrank gehalten, die Keimscheibe mit dem Embryo in Sublimatessig gehärtet, im ganzen ausgeschnitten, vom Dotter befreit und in der üblichen Weise in Paraffin eingebettet. Reihenschnitte durch den Embryo wurden der bekannten Reaktion ausgesetzt. Wie nicht anders zu erwarten war, ist ein positiver

*Ausfall der Reaktion* festzustellen, der in den Kernen der weißen Blutzellen genau so wie in den Erythrogonien nachzuweisen ist. Ein Unterschied der farblosen Stammzelle des Blutes, des Hämocytoblasten, gegenüber den primären und sekundären Erythroblasten vom ichthyoiden und sauroiden Bau ist nicht zu erkennen. Auch verhalten sich ektodermale, entodermale und mesodermale Zellen genau so wie die eben besprochenen Zellen mesenchymaler Herkunft. Es sei ausdrücklich betont, daß alle Zellen dann, wenn sie sich im Zustand der Teilung befinden, besonders starke Nuclealreaktion aufweisen, die sich in leuchtend violetter Färbung zeigt (Abb. 2).

Die Untersuchungen beweisen also, daß sowohl embryonale Zellen als auch bei der Gewebezüchtung sich neu bildende, wachsende Zellen in ihren Kernen reichlich Thymonucleinsäure enthalten. Damit ist ein erneuter Beweis für die Bedeutung und das allseitige Vorkommen der Nuclealkörper im lebenden Stoff erbracht.

---

#### Schrifttum.

<sup>1</sup> *Feulgen, R.*: Die Nuclealfärbung bei *E. Abderhalden*. Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. V, T. 2, S. 1055 (dort weitere Quellenangaben). — <sup>2</sup> *Barthels, C. u. K. Voit*: Virchows Arch. **281**, 499. — <sup>3</sup> *Silberberg, M. u. K. Voit*: Dtsch. Arch. klin. Med. **181**, 110.

---