

(Aus der Radiopathologischen Abteilung des Radiumhemmet, Stockholm
[Chef: Dr. med. O. Reuterwall].)

Über die Elektivität und die Fehlerquellen der Schleimfärbung mit Mucicarmin im Vergleich mit metachromatischer Färbung.

Von
Bengt Sylvén.

Mit 1 Tabelle.

(Eingegangen am 5. November 1938.)

Zu der Zeit, da noch keine Methoden zur elektiven Schleimfärbung zur Verfügung standen, bediente man sich zum Nachweis des Mucins der chemischen Eigenschaft dieses Stoffes, von Essigsäure gefällt zu werden. Um beispielsweise Pseudomucin nachzuweisen, benutzte man Alkohol als Fällungsmittel. Diese Methoden kamen in der Pathologie frühzeitig zur Verwendung, um epithelialen und mesodermalen Schleim zu diagnostizieren. Als Beispiel sei erwähnt, daß *Virchow* schon 1852 Schleimgewebe im Hahnenkamm nachwies. Daß Schleim diffus im Stroma gewisser Geschwülste vorkam, war bereits bekannt, und die Einstellung dieser Erscheinung gegenüber war ziemlich gegeben. Derartige Befunde wurden so gut wie ausnahmslos als Zeichen einer Entartung des betreffenden Gewebes aufgefaßt. War eine hochgradige Anhäufung von Schleim z. B. in einer Geschwulst mesenchymalen Ursprungs vorhanden, so wurde sie oft myxomatös genannt. *P. Mayers* erste Mitteilung über die Möglichkeit, mittels der Mucicarminmethode Schleim elektiv zu färben, bezog sich, seiner Darstellung nach zu urteilen, nur auf intraepithelialen Schleim in Becherzellen und Speicheldrüsen. Früher hatte *Hoyer* gefunden, daß metachromatische Farbstoffe solchen Schleim besser färbten als die zu jener Zeit verwendeten Hämatoxylinpräparate. Diese beiden Forscher bauten auf sicherem Grunde, indem sie aus den Arbeiten anderer wußten, daß die Sekretionsprodukte von Speicheldrüsen und Becherzellen Mucin enthielten. Daneben hatte man auch beobachtet, daß die Grundsubstanz des Knorpels und das Bindegewebe des Nabelstrangs sich nach den beiden Methoden färben ließen.

Als die genannten Färbungsmethoden, die anscheinend ein gewisses elektives Färbungsvermögen für intraepithelialen Schleim besaßen, in Gebrauch kamen, lag es für Pathologen nahe, dieselbe Methodik und dieselben Ansprüche auf Elektivität auf „mesodermalen Schleim“ zu übertragen. Daß man die Färbungsmethoden einander gleichstellte, wenn es sich um epithelialen Schleim z. B. in einem Adenocarcinom mit Schleimsekretion handelte, konnte berechtigt erscheinen, denn in solchen

Fällen hatte man eine gewisse Kontrolle in dem morphologischen Bilde des fraglichen Epithelgewebes. Aber man schrieb den Methoden dieselbe Elektivität auch zu, wenn es sich um extraepithelial liegende Substanz handelte, die positive Schleimfärbung zeigte. Das Resultat war, daß alles, was sich mit Mucicarmin färben ließ, mit Ausnahme des Exoplasmas des Knorpels, als „Schleimgewebe“ angesprochen wurde. Auch die alte Deutung des Schleimgewebes als Zeichen einer Entartung blieb bestehen. Das gewöhnlichste morphologische Kennzeichen für das Schleimgewebe in Geschwülsten und an anderen Stellen war, daß es embryonalem Bindegewebe ähnelte, wie man es im Nabelstrang antrifft.

In der Literatur findet man eine große Anzahl Angaben über mit der Mucicarminnmethode ausgeführte Schleimfärbungen an Material aus allen Gebieten der pathologisch-anatomischen Diagnostik. Viele Pathologen haben sicherlich eine gewisse Vorsicht beobachtet, wenn es galt, Fälle zu beurteilen, bei denen man eine positive Schleimfärbung mit Mucicarmin im Bindegewebe erhalten hatte, z. B. diffus im Stroma eines Mammarcarcinoms. Andere haben die Methode als zuverlässig betrachtet und geradezu behauptet, daß das Stroma Sitz einer „schleimigen Entartung“, einer „myxomatösen Umwandlung“ oder einer „schleimigen Paratrophie“ (*v. Gierke*) sei. Wieder andere sind so weit gegangen, daß sie dem Befund positiver „Schleimfärbung“ in einem Krebsstroma prognostische Bedeutung beigegeben haben (*Perrot 1932*); das Vorkommen von „mucicarminophiler Substanz“ sei als eine der Abwehrmaßnahmen des Körpers gegen die Geschwulst aufzufassen.

Man weiß, daß in dem Schleim von Becherzellen und Speicheldrüsen eine hochmolekulare Monoesterschwefelsäure, Mucoitinschwefelsäure, kommt, und man nimmt an, daß diese es ist, die bei der Mucicarminnmethode sich färbt. Eine nahestehende Säure, Chondroitinschwefelsäure, findet sich im Exoplasma des Knorpels. Außerdem kommt in den Granula der Mastzellen Heparin vor, das eine Polyester schwefelsäure ist (*Holmgren und Wilander 1937*). Durch *Lisons* Arbeiten ist erwiesen, daß metachromatische Färbbarkeit spezifisch ist für eine bestimmte chemische Struktur, nämlich Esterschwefelsäuren hohen Molekulargewichts. Dies nur unter der Voraussetzung, daß bei der Arbeit mit einer metachromatischen Farbe, wie z. B. Toluidinblau, eine geeignete Technik verwendet wird.

An anderem Orte habe ich über die wichtigsten Ergebnisse einer Untersuchung über das Vorkommen metachromatischer Substanz, d. h. hochmolekularer Esterschwefelsäuren, in einem Material berichtet, das Bindegewebe aus verschiedenen Gebieten der pathologischen Anatomie umfaßt. Es konnte nachgewiesen werden, daß Fibroblasten aus *jungem Granulationsgewebe*, spezifischem wie auch unspezifischem, *wachsende Fibroblasten* z. B. in einem Krebsstroma und *wachsende Sarkomzellen* stets eine diffuse Metachromasie von Cytoplasma und Grundsubstanz

zeigten, d. h. daß das ganze Zellterritorium von Kerngebiet zu Kerngebiet stets die genannten Esterschwefelsäuren enthielt. Um zur Klarheit über den Wert der Mucicarminkmethode zu kommen und um die Fehlerquellen bei Anwendung der Methode auf Material der genannten Art zu untersuchen, habe ich eine Reihe von besonderen Versuchen ausgeführt. Es ergab sich dabei, daß ein Gewebe oder ein Element in einem Gewebe saure Eigenschaften haben muß, um mit Mucicarmin gefärbt werden zu können.

Unter „mucicarminophiler Substanz“ verstehe ich in der Folge alles, was mit Mucicarmin gefärbt werden kann. Nur extraepithelial liegende, diffus in Bindegewebe vorkommende „mucicarminophile Substanz“ ist untersucht worden. Dem oben Gesagten gemäß muß alle mucicarminophile Substanz saure Eigenschaften haben. Im Körper finden sich 2 Systeme von Säuren, nämlich wasserlösliche und fettlösliche, und in diese Hauptgruppen gehen teils hochmolekulare und teils niedrigmolekulare Säuren ein. Zu den hochmolekularen Säuren gehören die Monoesterschwefelsäuren, von denen die Chondroitin- und die Mucoitinschwefelsäuren bekannt sind, und ferner die Polyesterschwefelsäuren, zu denen das Heparin gehört. Damit diese Säuren in einem histologischen Präparat nachweisbar sein sollen, müssen sie in dem Präparat auch noch nach Fixierung, Einbettung und Weglösung des Einbettungsmittels vorhanden sein. Bei der Behandlung der Präparate werden sicherlich die wasserlöslichen niedrigmolekularen Säuren zum größten Teil herausgelöst. Meine Untersuchung betrifft nur hochmolekulare Esterschwefelsäuren, die sich auch mit metachromatischer Technik färben lassen. Auf das Verhalten der Mucicarminkmethode gegenüber anderen wasser- oder fettlöslichen Säuren niedrigeren Molekulargewichts gehe ich nicht ein. Der Zweck des vorliegenden Aufsatza ist, neue Beiträge zur Kenntnis der Elektivität, des Empfindlichkeitgrades und der Fehlerquellen der Mucicarminkmethode bei Färbung der oben genannten Esterschwefelsäuren zu liefern. Gleichzeitig wird ein Vergleich zwischen dieser Methode und der metachromatischen Färbung mit Toluidinblau angestellt.

1. Färbung mit Mucicarminlösungen verschiedenen Säuregrades.

In einer früheren Arbeit habe ich durch Färbung von Lunge, Dünndarm und Colon des Meerschweinchens mit Mucicarminlösungen (0,1%) verschiedenen Säuregrades gezeigt, daß das Exoplasma des Knorpels und der Schleim der Becherzellen nur von Mucicarminlösung eines Säuregrades zwischen $p_{H} 7$ und 4 gefärbt werden. Bei höherem Säuregrad als $p_{H} 4$ wurde keine Färbung erhalten. Dies wurde in der Weise erklärt, daß die Färbbarkeit der genannten Elemente durch Mucicarmin an die Gegenwart von Aluminiumcarminat gebunden ist, das sich bei stärkerem Säuregrad als $p_{H} 4$ nicht in Lösung finden kann. Zwischen $p_{H} 4$ und 3 beginnt die Carminsäure auszufallen.

Um zu prüfen, ob das gleiche für Färbung diffus vorkommenden „Schleimgewebes“ oder „mucicarminophiler Substanz“ gilt, wurden diese Färbungsversuche mit Mucicarminlösungen derselben Säuregrade wie in der früheren Untersuchung an Plattenepithelcarcinomen mit mucicarminophiler Substanz in den Zellenkolben und diffus im Stroma vorkommender metachromatischer Substanz, an schleimproduzierenden Adenocarcinomen vom Uterus mit derselben Metachromasie im Stroma und an zwei Fällen von Myxo-Lipo-Sarkom mit starker diffuser Metachromasie wiederholt. Das Material war in Sublimat-Formol fixiert.

Die Färbungsresultate waren genau die gleichen wie bei der früheren Untersuchung, weshalb betreffs der Einzelheiten auf diese verwiesen sei. Man kann also die im obigen Material erwähnte, diffus im Stroma vorkommende mucicarminophile Substanz nur mit Mucicarminlösungen zwischen p_{H} 7 und 4 färben. Hieraus folgt, daß bei Färbung mit Mucicarmin dasselbe Verhältnis zwischen Färbbarkeit und Säuregrad der Farblösung vorliegt, ob es sich nun um den Schleim der Becherzellen, die Grundsubstanz des Knorpels oder diffus in einem Geschwulststroma vorkommende mucicarminophile Substanz handelt.

2. Vergleich zwischen der Empfindlichkeit der Mucicarminmethode und metachromatischer Färbung mit Toluidinblau bei Färbung von diffus in Bindegewebe vorkommenden hochmolekularen Esterschwefelsäuren.

Um die Verhältnisse in dieser Beziehung zu untersuchen, führte ich Färbungen nach den beiden Methoden an geeigneten Fällen aus dem laufenden Material des Radiumhemmet aus. Die Fixierung geschah mit etwa 10%iger Formalinlösung oder mit Sublimat-Formol. Die schönsten Bilder von diffuser Metachromasie z. B. in einem Fibroadenoma mammae werden nach Sublimatfixierung (Sublimat-Formol) erhalten. Es scheint dies darauf zu beruhen, daß das Sublimat die in wachsendem Bindegewebe vorhandene Esterschwefelsäure ausfällt. Wenn man aber Sublimatfixierung zu diesem Zweck verwendet, darf man die Sublimatkristalle nicht auf gewöhnliche Weise mittels Jodspiritus und Thiosulfat weglassen, da solchenfalls das Quecksilber-Esterschwefelsäuresalz und damit auch die metachromatische Substanz herausgelöst werden. Ferner darf man nicht vergessen, daß Jod chemisch eine sehr aktive Substanz ist, und Lecene hat gezeigt, daß gewisse Esterschwefelsäuren, besonders eine Form der Mucoitschwefelsäure, insofern empfindlich und instabil sind, als die Esterbindung leicht verloren geht. Aus diesem Grunde muß man die Sublimatkristalle in den Präparaten lassen, wenn man die im Cytoplasma und in der Intercellularsubstanz der Bindegewebszellen vorkommende diffuse Metachromasie, die wahrscheinlich durch mit der Chondroitin- und den Mucoitschwefelsäuren verwandte Monoesterschwefelsäuren verursacht wird, so viel wie möglich zutage treten lassen will.

Die Mucicarminfärbung wurde in 0,1%iger Lösung nach *P. Mayer* ausgeführt, sowohl mit als auch ohne Vorfärbung der Kerne in *Mayers* neutralem Hämalaun. Metachromatische Färbung wurde in $\frac{1}{2}\%$ iger Lösung von Toluidinblau in destilliertem Wasser nach *Lisons* Anweisungen vorgenommen. Der Raumersparnis halber werden die Ergebnisse hier in Tabellenform zusammengestellt.

Tabelle 1.

Abkürzungen: Metachromasie = Mtch. Mucicarminophile Substanz = Mc. Mastzellen = MZ.

Journal-Nr.	Diagnose	Färbung mit Toluidinblau $\frac{1}{2}\%$	Färbung mit Mucicarmin 0,1%
B 1018/38	Myxoedema circumscriptum	Starke diffuse Mtch. lokal im Corium	Deutlich positive Mc. in demselben Gebiet
B 728/38	Normale Mamma	Keine diffuse Mtch.	Mc. negativ
B 728/38	Fibroadenoma mammae	Leichte diffuse Mtch. im Mantelgewebe	Mc. negativ
Rw 92/38	Fibroadenoma intracanaliculum mammae	Sehr starke diffuse Mtch. in Mantelgewebe und intrakanal. Proliferationen	Deutlich positive Mc. in demselben Gebiet
Rw 89/38	Fibroadenoma mammae	In gewissen Knoten starke diffuse Mtch.	Deutlich positive Mc. in denselben Gebieten
Rw 422/38	Carcinoma mammae scirrhosum Desgl.	Starke diffuse Mtch. im Stroma	An denselben Stellen deutlich positive Mc.
B 942/38		Mäßige diffuse Mtch. im Stroma	Negative Mc.
H 470/38	Ca. colli uteri (Plattenepithelcarcinom)	Keine diffuse Mtch. Vereinzelte MZ.	Mc. negativ. Keine MZ.
H 502/38	Desgl.	Mäßige diffuse Mtch. im Stroma. Vereinzelte MZ.	Negative Mc. Keine MZ.
H 533/38	"	Keine diffuse Mtch. Das Stroma unerhört reich an MZ.	Negative Mc. MZ. nicht gefärbt, aber diffus am Orte der größten Anhäufungen von MZ. schwach positive Mc.
H 537/38	"	Schwache diffuse Mtch. im Stroma. Stroma sehr reich an MZ.	Desgl.
H 502/38	"	Starke diffuse Mtch. Keine MZ.	Deutlich positive Mc. in denselben Teilen des Stromas
B 848/38	Hautcarcinom	Keine diffuse Mtch. Keine MZ.	Negative Mc.
B 968/38	"	Starke diffuse Mtch. im Stroma. Keine MZ.	Schwach positive Mc. in denselben Teilen des Stromas
B 995/38	"		
B 1029/38	"		

Vergleichen wir die Resultate der beiden Färbungsmethoden in Tabelle 1 miteinander, so ergibt sich, daß *Färbung mit Toluidinblau weit empfindlicher als die Mucicarminemethode ist*, wenn es sich um den Nachweis diffus in Bindegewebe vorkommender Esterschwefelsäuren handelt. Die von mir in der Tabelle angegebenen Grade von diffuser Metachromasie

stützen sich auf eine große Menge Beobachtungen, und zwischen diesen Graden ist der Unterschied nicht haarfein, sondern sehr augenfällig für den, der sich mit diesen Dingen zu beschäftigen gewohnt ist. Nur bei den höchsten Graden von diffuser Metachromasie (sehr stark und stark) hat das Bindegewebe einen hinreichend hohen Gehalt an Esterschwefelsäuren, damit eine Rotfärbung durch Mucicarmin zustande kommen könne.

3. Können die Mastzellen mit Mucicarmin gefärbt werden?

Raudnitz zeigte 1883, daß die Granula der Mastzellen in Wasser löslich sind. Es lieferte dies die Erklärung dafür, daß viele Untersucher um die Mastzellen herum „metachromatische Höfe“ (*Unna*) sahen: Man hatte nämlich durch ungeeignete Fixierung die Granula herausgelöst oder war dabei, sie herauszulösen. Da man die Chemie der Mastzellen nicht kannte, war es schwer, ein geeignetes Fixiermittel zu finden, das die Fähigkeit besaß, die Granula zu fällen und zu konservieren. Durch *Holmgrens* und *Wilanders* Arbeit 1937 wurde es bekannt, daß die Granula der Mastzellen Heparin enthalten, und diese Verfasser berichteten über eine ausgezeichnete Fixiermethode, nämlich basisches Bleiacetat, das ein in Wasser unlösliches Blei-Heparinsalz bildet. Benzidin-Alkohol gab nicht so gute Resultate. Beobachtungen über das Vorkommen und das Aussehen von Mastzellen und Angaben über ihre Anzahl können also nicht als zuverlässig betrachtet werden, wenn andere Fixiermittel, wie z. B. 10%ige Formalinlösung (*Stockinger, Möllendorff* 1927, 28 u. a.), verwendet wurden.

Betreffs der Färbung der Granula der Mastzellen ist es seit langem bekannt, daß die metachromatische Technik gute Resultate liefert. *Arnoldi* färbte 1913 die Granula der Mastzellen mit *Bests* Carmin. Andere Forscher (*Lehner* 1924, *Wermel* und *Sassuchin* 1928) erhielten mit dieser Carminfarbe keine hinreichend typische Färbung. Die letzteren schreiben: „Auch war die Färbung mit Mucicarmin eine oberflächliche und wenig intensive.“

Wie eingangs dieses Aufsatzes erwähnt wurde, finden sich in der pathologisch-anatomischen Literatur eine Menge Angaben über das Vorkommen von „mucicarminphiler Substanz“ besonders in Geschwülsten und ihrem Stroma. Aus Tabelle I kann man den Schluß ziehen, daß ein Teil dieser „mucicarminphilen Substanz“ aus diffus im Gewebe vorkommenden Esterschwefelsäuren besteht. Aber nur wenige haben sich der Mühe unterzogen, zu untersuchen, ob gleichzeitig Mastzellen vorkommen. In formalin- oder sublimatfixiertem Material (Tabelle I) fließen Granula aus den Mastzellen aus und bilden „metachromatische Höfe“, und an den Stellen, wo Mastzellen reichlich vorhanden sind, z. B. in dem Stroma eines Cancer mammae, erhält man bei Färbung mit Mucicarmin einen unscharf begrenzten Fleck von „mucicarminphiler Substanz“. Dieser

durch eine ungeeignete Technik zustande kommende Befund muß bei Anwendung der Mucicarminkmethode das Vorhandensein von „Schleim“ im Stroma der betreffenden Geschwulst vortäuschen.

Um zu untersuchen, ob eine Färbung der Granula der Mastzellen mit Mucicarmin überhaupt möglich ist, wählte ich folgendes Material. *Holmgren* und *Wilander* teilten mit, daß die Kapsel und das interlobuläre Bindegewebe der Kuhleber besonders reich an Mastzellen ist, sowie daß in der Kuhlunge Mastzellen im Bindegewebe um die Gefäße und die Bronchien herum vorkommen. Material eben dieser Art, fixiert in basischem Bleiacetat (3%), waren die genannten Herren so freundlich mir zu überlassen. Die Färbung der Schnitte geschah teils mit Mucicarmin 0,1% und teils mit Toluidinblau $\frac{1}{2}\%$ in dest. Wasser.

In mit Toluidinblau gefärbten Schnitten waren in reichlicher Menge schöne Mastzellen mit metachromatischen Granula zu sehen. Bei Mucicarminfärbung konnten nur in Ausnahmefällen vereinzelte diffuse rotgefärbte, undifferenzierte Flecke in der Kapsel der Kuhleber und im Bindegewebe um die Gefäße und die Bronchien herum in der Kuhlunge wahrgenommen werden. Durch Vergleich mit toluidinblaugefärbten Schnitten konnte man feststellen, daß in solchen Fällen eine oder mehrere Mastzellen örtlich diesem roten Fleck entsprachen. Dagegen zeigten die Kapsel der ganzen Kuhleber und viele Gebiete im Bindegewebe der Kuhlunge und im interlobulären Bindegewebe der Leber, wo Mastzellen besonders reichlich vorhanden waren, mit Mucicarmin eine diffuse Rotfärbung. Diese Rotfärbung würde also, wenn nicht Kontrollfärbung mit Toluidinblau vorgenommen worden wäre, dahin gedeutet werden sein, daß ein Schleimgewebe vorläge. In Wirklichkeit waren reichlich Mastzellen vorhanden, und die „diffuse mucicarminophile Substanz“ rührte von einer undifferenzierten Färbung der heparinhaltigen Granula dieser Mastzellen her.

Es ergibt sich demnach, daß ein Befund mucicarminphiler Substanz in einem gewissen Bindegewebe nicht immer auf dem Vorkommen diffuser metachromatischer Substanz zu beruhen braucht, sondern es kann eine Anhäufung von Mastzellen an dieser Stelle vorliegen. Wir haben hier eine wichtige Quelle von Fehldeutungen bei histo-pathologischen Diagnosen, die sich lediglich auf Färbung mit Mucicarmin ohne Kontrollfärbung mit metachromatischer Technik stützen.

In einer früheren Arbeit über die Wirkungsweise der Mucicarminkmethode habe ich gezeigt, daß, in Übereinstimmung mit *Bechers* Auffassung von dem Wesen der Beizung, Färbung mit Mucicarmin an die Gegenwart von Aluminiumcarminat gebunden ist, und daß eine Substanz saure Eigenschaften haben muß, damit eine Färbung mit Mucicarmin, d. h. eine Bindung an eine freie Valenz des dreiwertigen Aluminiums im Aluminiumcarminat, möglich sein soll. Um zu zeigen, daß Heparin, das eine Polyesterschwefelsäure ist, wirklich an das Aluminium-

carminat im Mucicarmin gebunden wird, führte ich einige weitere einfache Versuche aus.

Von *Holmgren* und *Wilander* 1937 ist gezeigt worden, daß man bei Zusatz von Toluidinblau zu einer Heparinlösung eine quantitative Ausfällung des Heparins erhält. Der Niederschlag ist von violetter Farbe und besteht aus feinen, faserigen Flocken. -- Chemisch reines Heparin löste ich in destilliertem Wasser und verwendete die Lösung zu folgenden Versuchen. Die Heparinkonzentration war nicht genau bekannt, sie war aber höher als 3 γ, denn die Lösung war mit Toluidinblau metachromatisch (*Jorpes* und *Bergström*).

A 1. Die Heparinlösung gibt mit nach *P. Mayer* hergestellter Mucicarminlösung (1%) einen klar roten, flockigen Niederschlag. Bei geeigneter Menge Mucicarmin ist das Filtrat farblos und frei von metachromatischer Substanz. Das Filtrat ist auch frei von Aluminium, woraus folgt, daß eine Bindung zwischen dem Aluminiumcarminat und dem Heparin erfolgt ist.

A 2. Der Niederschlag wird abfiltriert und in destilliertem Wasser aufgerührt. Sodann wird unter dem Ultropakmikroskop bei 80facher Vergrößerung Toluidinblau in 1%iger wässriger Lösung zugesetzt. Im Mikroskop sieht man dann, wie allmählich die roten Flocken erst an den Rändern und danach über die ganze Fläche hin violett werden. Ein violetter faseriger Niederschlag von dem Typ, wie er bei Toluidinblau-Heparin gesehen wird, ist nicht wahrzunehmen.

Die in A 1 und A 2 beschriebenen Versuche wurden mit Mucoid, von *Holmgren* und *Aurell* aus Cornea von Kuh hergestellt, wiederholt. Die Ergebnisse waren genau die gleichen.

B 1. Die Heparinlösung gab mit Toluidinblau einen violetten faserig-flockigen Niederschlag, der im Ultrapakmikroskop ein sehr charakteristisches Aussehen hat. Wird zu diesem Niederschlag Mucicarmin (1%) hinzugesetzt, so wird kein neuer Niederschlag erhalten, sondern das Mucicarmin diffundiert durch die Lösung und gibt ihr eine rotviolette Färbung. Hieraus kann nur geschlossen werden, daß kein Heparin in der Lösung vorhanden ist, dieses ist vielmehr bereits stöchiometrisch von dem Toluidinblau ausgefällt. Dasselbe Ergebnis wurde auch mit dem oben erwähnten Mucoid aus Cornea erhalten. Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, daß bei Zusammengießen der Toluidinblaulösung und der Mucicarminlösung kein Niederschlag erhalten wird, sondern daß die Farben sich miteinander mischen.

Diese Versuche zeigen, daß in dem Probierglas eine Bindung zwischen Mucicarmin und Heparin ad modum Becher erfolgt. Da dieser Niederschlag mit Toluidinblau metachromatisch färbbar ist, hat das Heparin seine Esterschwefelsäuregruppen nicht verloren. Dasselbe ergibt sich aus gleichen Versuchen mit dem aus Cornea hergestellten Mucoid.

Die Frage, ob die Mastzellen mit Mucicarmin gefärbt werden können, ist also dahin zu beantworten, daß in gewissen Probierglasversuchen mit reinem Heparin eine Färbung möglich ist, handelt es sich aber darum, einen histologischen Schnitt zu färben, so liegen die Verhältnisse offenbar anders. Hier gibt nämlich bei Anwendung einer geeigneten Fixierung metachromatische Färbung weit differenziertere und exaktere Bilder als die Mucicarminmethode. Die Mucicarminmethode ist, praktisch genommen, zur Färbung von Mastzellen unbranchbar.

Besprechung.

Die Unterscheidung von epithelialem und mesodermalem Schleim ist innig mit der Kenntnis ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften verbunden. Der epithiale Schleim wurde am frühesten studiert, und ihm wurden folgende physikalische Eigenschaften zugeschrieben: Eine viscose, fadenziehende Flüssigkeit, die sich bei Berührung schlüpfrig anfühlte, und die bei Zusatz von Essigsäure einen faserigen Niederschlag von charakteristischen Aussehen gab. Diesen Stoff, der ausgefällt werden konnte, nannte man Mucin, und man hielt ihn für einen Eiweißstoff irgendwelcher Art. Chemische Analysen wurden frühzeitig ausgeführt, und man fand nach saurer Hydrolyse eine reduzierende Substanz. Bei Elementaranalyse von wässrigem Auszug aus dem Nabelstrang fand Jernström 1880, daß das extrahierte Mucoid Schwefel enthielt. Durch weitere Arbeiten von Hammarsten und Landwehr kam man zur Klarheit darüber, daß Mucin aus Speicheldrüsen und Becherzellen stets eine komplexe schwefelhaltige Substanz enthält, die ihrer Struktur nach den Mucoproteinen ähnelt. Von späteren Forschern hat besonders Levene die Eigenschaften und die Struktur dieser Stoffe studiert. Die einzige charakteristische Substanz in epithelialem „Schleim“ ist die Mucoitinschwefelsäure, eine hochmolekulare Esterschwefelsäure. — Den „Schleim“ der Becherzellen und der Speicheldrüsen kann man also dahin definieren: Ein epitheliales Sekretionsprodukt mit Mucoitinschwefelsäure als einzigm charakteristischem Bestandteil.

Für das Zustandekommen einer elektiven Färbung von epithelialem Schleim ist die Anwesenheit dieser Mucoitinschwefelsäure absolut notwendig. Wird zu diesem Zweck Mucicarmin verwendet, so erfolgt eine Bindung zwischen dem Aluminiumcarminat der Mucicarminlösung und der Mucoitinschwefelsäure (Sylvén 1938). Die Anwendung metachromatischer Technik ist dadurch möglich, daß die Mucoitinschwefelsäure eine Esterschwefelsäure ist (Lison 1935). — Die Färbungsresultate hängen in beiden Fällen von der Wahl der Fixiermethode ab. Löst man durch ungeeignete Fixierung die Mucoitinschwefelsäure heraus, so kann natürlich keine Färbung zustande kommen. Fixierung in starkem Alkohol bewirkt eine kräftige Schrumpfung des betreffenden Epithels, das Sekret

der Becherzellen wird in die Lumina hinausgepreßt, und das morphologische Bild wird entstellt.

Ich bin also der Auffassung, daß, wenn es sich um die Färbung epithelialer Sekretionsprodukte, die Mucoitinschwefelsäure enthalten, mit anderen Worten um die Färbung epithelialen Schleims handelt, die Anwendung sowohl der Mucicarminmethode als auch der metachromatischen Technik berechtigt ist. In diesem Falle kann jedoch die Diagnose nicht lediglich auf Grund des Färbungsresultats gestellt werden, sondern das morphologische Bild muß den Ausschlag geben.

In der Einleitung habe ich darauf hingewiesen, daß die Anwendung der Mucicarminmethode zum Fortbestande solcher Begriffe wie „extraepithelialer Schleim“, „mesenchymales Schleimgewebe“, „schleimige Entartung“, „schleimige Paratrophie“ usw. beigetragen hat. Zur Aufstellung dieser Begriffe und den verschiedenen Begriffsbestimmungen ist man auf folgende Weise gelangt.

Schwann hatte gefunden, daß embryonales Bindegewebe eine schleimige, gallertartige Beschaffenheit hatte, und er beschrieb dieses Bindegewebe als eine homogene Masse mit einliegenden Zellkörpern. *Tilanus* schreibt 1849, daß das Bindegewebe denselben Schleim enthält, wie er von Epithel abgesondert wird. *Reichert* trat dieser Auffassung entgegen und meinte, daß die gallertartige Substanz reine Intercellularsubstanz sei. *Virchow* beschrieb 1852, wie er die schleimige Intercellularsubstanz aus dem Bindegewebe des Nabelstrangs hinausgepreßt hätte, und zeigte, daß diese dieselben physikalischen und chemischen Eigenschaften wie epithelialer Schleim habe. Er meinte daher, daß das Bindegewebe im Nabelstrang mit Schleimstoff angefüllt sei, und daß man dieses Gewebe mit *Borden* als „Tissu muqueux“ oder „Schleimgewebe“ bezeichnen müsse. Hierhin wollte *Virchow* auch das Bindegewebe im Chorion und im Stroma einiger Carcinome, sog. Kolloidkrebsen, rechnen. Er untersuchte weitere schleimartige Gewebe durch Auspressen und Fällung des Schleimstoffs mittels Essigsäure. Die physikalische Beschaffenheit des Glaskörpers veranlaßte ihn, diesen näher zu untersuchen, und er fand, daß man die Substanz, die ihm seine schleimartige Beschaffenheit verleiht, extrahieren und ausfällen konnte. *Virchow* betont 1852 das enorme Hydratationsvermögen des Schleimstoffs, wodurch die starke Durchsichtigkeit mit einem Minimum von organischer Substanz zustande kommt. *Virchow* scheint jedoch nicht der Ansicht gewesen zu sein, daß diese Substanz wirklicher Schleim sei, und er spricht sich gegen die Identität mit epithelialem Schleim aus. Stattdessen verwendet er die Bezeichnung „Schleimstoff“.

Durch Extraktion verschiedener Bindegewebsformen und Fällung mit Essigsäure haben danach viele Forscher Schleim oder Mucin in Bindegewebe nachweisen zu können geglaubt. *Rolle* beschreibt 1858 und 1860 Mucin aus Sehnen und Cornea. *Loebisch* untersucht 1886 Sehnemucin

und *Chittenden* und *Gies* 1896. Durch chemische Untersuchungen von *Jernström*, *Hammarsten* und *Landwehr* (1881) wurde die Zusammensetzung dieses Schleimstoffs in ihren Hauptzügen klargestellt. *Schaffer* (1901) sagt, daß die Grund- oder Kittsubstanz des Bindegewebes ihrer chemischen Natur nach mit dem Mucin übereinstimme, und stützt sich hierbei auf *Rollett* und *Loebisch*.

Beurteilen wir diese Untersuchungen unter Zugrundelegung unserer gegenwärtigen Kenntnis von der Chemie der Mucoproteine und den Möglichkeiten, sie nachzuweisen, so ergibt sich, daß die obengenannten Forscher Mucoproteine in embryonalem Bindegewebe, im Nabelstrang, im Hahnenkamm, im Glaskörper und in der Cornea, in Sehnengewebe und anderen Arten von Bindegewebe sowie im Stroma gewisser Geschwülste gefunden haben. Diese Esterschwefelsäuren haben gewisse gemeinsame Eigenschaften; großes Hydratationsvermögen, in wässriger Lösung verliehen sie der Lösung eine schleimige Beschaffenheit, d. h. die Lösung wird viscos, und ferner erhält Bindegewebe, das reich an Esterschwefelsäuren ist, ein schleimiges, gallertartiges Aussehen mit erhöhter Durchsichtigkeit (Cornea). — Betreffs einer dieser Eigenschaften, des Hydratationsvermögens, sei noch erwähnt, daß nach *Needhams* Ansicht (1931) der große Wassergehalt in den Geweben des Fetus möglicherweise auf dem reichlichen Vorkommen von mucoider Substanz, d. h. Esterschwefelsäuren, in den Stützgeweben des Fetus beruht.

Gegenwärtig stehen bei histologischer Untersuchung zwei Färbungsmethoden zur Verfügung, wenn es gilt, das Vorkommen dieser Esterschwefelsäuren festzustellen: Die Mucicarminkmethode und metachromatische Technik. Auf den Wert der beiden Methoden im Verhältnis zueinander komme ich noch unten zu sprechen. Die einzige spezifische Färbungsmethode ist die metachromatische (*Lison*). — Wendet man bei einem Gewebe metachromatische Färbung an und findet man eine Metachromasie in Epithel, Knorpel oder Bindegewebe, so kann man nur einen Schluß aus diesem Befunde ziehen, den nämlich, daß am Orte dieser Metachromasie in dem Gewebe eine hochmolekulare Esterschwefelsäure vorhanden ist. Wenn diese Metachromasie intraepithelial, z. B. in den Epithelzellen der Darmschleimhaut, vorhanden ist, so ist man auf Grund des morphologischen Bildes berechtigt, den Schluß zu ziehen: Hier liegt eine Sekretion vor, und dieses Sekretionsprodukt enthält eine hochmolekulare Esterschwefelsäure. In diesem Falle (Darmschleimhaut) weiß man auf Grund chemischer Analyse (*Levène*), daß es sich um Mucotinschwefelsäure handelt. Seit alters ist dieses Sekretionsprodukt gleich vielen anderen epithelialen Sekretionsprodukten aus Becherzellen und Speicheldrüsen wegen seiner physikalischen Beschaffenheit als Schleim bezeichnet worden, genau genommen sollte man aber die Bezeichnung mucoproteinhaltiges oder mucoides Sekretionsprodukt verwenden. Hat man sich zum Nachweis metachromatischer Technik bedient, so sollte

man das Sekretionsprodukt im Hinblick auf das verwendete Verfahren „ein metachromatisch färbbares Sekretionsprodukt“ nennen.

Als ein anderes Beispiel möge der Knorpel dienen. Das Exoplasma des Knorpels enthält kollagene Fibrillen und Chondroitinschwefelsäure (*Mörner, Schmiedeberg*). Das Exoplasma ist sowohl mit Mucicarmin als auch beispielsweise mit Toluidinblau färbbar, was eben auf seinem Gehalt an Chondroitinschwefelsäure beruht. Das morphologische Bild ist völlig charakteristisch, und aus dem Färbeergebnis sollte lediglich auf das Vorkommen metachromatischer Substanz geschlossen werden. Unzulässig wäre es, das Exoplasma daraufhin als Schleimgewebe o. dgl. zu bezeichnen. — Das gleiche gilt betreffs der Cornea und des Glaskörpers. Es kommt hier eine metachromatisch färbbare Substanz vor, deren Zusammensetzung wohlbekannt ist, und auf deren Eigenschaften bereits *Virchow* 1852 hingewiesen hat. Den Befund als „Schleim“ zu deuten, wäre unberechtigt.

Betreffs des lockeren Bindegewebes habe ich in einer früheren Arbeit mitgeteilt, daß man in *wachsendem Bindegewebe* verschiedener Art (Granulationsgewebe, spontane Keloide, Sarkomzellen und Stromazellen aus wachsendem Krebsgewebe usw.) eine diffuse Metachromasie findet, d. h. das betreffende Gewebe enthält in *wachsendem Zustand* hochmolekulare Esterschwefelsäuren. Diese sind wahrscheinlich niedrigverestert von demselben Typ wie die Mucoitin- und die Chondroitinschwefelsäure. Das morphologische Bild ist in typischen Fällen: Eine diffuse Metachromasie durch das ganze Gewebe von Kerngebiet zu Kerngebiet. Eine Grenze zwischen den Zellterritorien ist nicht wahrzunehmen, sondern das fragliche Gewebe sieht aus wie ein völlig zusammenhängendes Syncytium, in dem alles Protoplasma metachromatische Substanz enthält. Allmählich, wenn das Bindegewebe älter geworden ist, Fibrillen entwickelt hat und fibröser geworden ist, und *wenn das Wachstum aufgehört hat, findet man keine Metachromasie mehr*. — Das Bindegewebe enthält also in wachsendem Zustand Mucoproteine, und diese haben zur Folge, daß das Bindegewebe wasserhaltiger wird, als älteres Bindegewebe es zu sein pflegt. Hieraus darf aber nicht der Schluß gezogen werden, daß das Bindegewebe einer schleimigen Umwandlung, einer schleimigen Paratrophe o. dgl. ausgesetzt wäre. Es fehlt an einer morphologischen Stütze für eine solche Behauptung (vgl. *Roulet* 1937).

Was die Deutung des Vorkommens von diffus in Bindegewebe zerstreuter „mucinöser Substanz“ betrifft, so ist diese Erscheinung, bis auf einige Ausnahmen (*Kuru, Ssolowjew, Brezovnik*), als Zeichen einer Entartung aufgefaßt worden. Weshalb das Bindegewebe des Fetus, wachsendes Granulationsgewebe, das Mantelbindegewebe im Fibroadenoma mammae (*Berka u. a.*) usw. sich in Entartung befinden sollte, ist bisher nicht erklärt worden. — Neue Gesichtspunkte sind nun mehr für die

Beurteilung des *Vorkommens der obengenannten Esterschwefelsäuren* im Bindegewebe aufgestellt worden, und neue Untersuchungen (an pathologisch-anatomischem Material von *Sylvén*; noch nicht veröffentlichte Untersuchungen an embryologischen Material von *Hj. Holmgren*) haben zu der Erkenntnis geführt, daß ihr Vorhandensein *vielmehr für wachsendes Bindegewebe charakteristisch ist*.

Betreffs des Wertes der beiden in der histo-pathologischen Diagnostik verwendeten „Schleimfärbungsmethoden“ möchte ich folgendes bemerken. Durch Vergleich mit metachromatischer Färbung an gleichem Material findet man, daß die Mucicarminfärbung bedeutend weniger empfindlich ist als beispielsweise Färbung mit Toluidinblau (Tabelle 1). Beiden Methoden gemeinsam ist, daß hochmolekulare Esterschwefelsäuren gefärbt werden. Mittels Toluidinblau wird das Vorkommen solcher Esterschwefelsäuren bei bedeutend geringeren Konzentrationen festgestellt, als es mittels der Mucicarminfärbung möglich wäre. Es hat sich hierbei herausgestellt, daß die Verbreitung dieser Esterschwefelsäuren im Organismus unter verschiedenen pathologischen Verhältnissen viel größer ist, als es bisher bekannt gewesen ist.

Außer mit dieser Fehlerquelle ist die Mucicarminfärbung auch noch mit anderen Unzulänglichkeiten behaftet. Mit Mucicarmine erhält man in einem histologischen Schnitt zumeist keine distinkte Färbung der Mastzellen. Wenn in einem Geschwulststroma vereinzelte Mastzellen hier und da vorkommen und dasselbe Stroma diffus verteilter Esterschwefelsäuren entbehrt, so wird in der Regel mit Mucicarmine keine Färbung erhalten. In Ausnahmefällen kann nach geeigneter Fixierung (basisches Bleiacetat) am Orte einer Mastzelle Mucicarminfärbung bestenfalls eine undifferenzierte, verschwommene und wenig hervortretende Rottfärbung geben. Kommen dagegen in einem Carcinomstroma große Mengen Mastzellen vor, was durchaus keine Seltenheit ist (z. B. Hautcarcinom, Mammaparacarcinom u. a.) so gibt Mucicarmine keine distinkte Färbung, sondern man erhält stattdessen den Eindruck einer diffus oder herdförmig verteilten „mucicarminophilen Substanz“. — Ein typisches Beispiel derartiger durch mangelhafte Technik erhaltener Resultate führt *Perrot* (1932) an, der ein großes Material von Cancer mammae (88 Fälle) behandelt, von denen 38 Fälle „muci-carminophilie du stroma“ und klinisch eine bessere Prognose aufwiesen. *Perrot* liefert keinerlei Angaben über das Vorkommen der Mastzellen, ist sich aber doch völlig klar darüber, daß die Auffassung, die von *Delbet* u. a. vertreten wird, und wonach die mucicarmophile Substanz Mucin wäre, das von den Krebszellen infolge einer „inversion de la polarité sécrétante“ in das Stroma ausgeschieden würde, fehlerhaft sein muß. *Perrot* betont zum Schluß seine Zweifel betreffs der Mucicarminfärbung, „car l'électivité colorante du muci-carmin est loin d'être absolue“.

Zusammenfassung.

Ein Vergleich der Färbungsresultate mittels der Mucicarminmethode nach *P. Mayer* und mittels metachromatischer Färbung mit Toluidinblau an einem pathologisch-anatomischen Material führt zu folgenden Ergebnissen betreffs mesodermalen „Schleimgewebes“.

1. In derselben Weise wie bei Färbung von epithelialem Schleim und der Grundsubstanz des Knorpels mit Mucicarmin wirkt die Mucicarminmethode auch bei der Färbung von diffus in gewissem Bindegewebe vorkommender „mucicarminophiler Substanz“. Die Färbung ist an die Gegenwart von Aluminiumearminat gebunden (*Sylvén*). Im übrigen wird der Färbungsverlauf in Übereinstimmung mit *Bechers* Ansichten über das Wesen der Beizung als Tripelverbindung aufgefaßt.

2. Im Vergleich mit den Ergebnissen, die durch geeignete Fixierung und Verwendung metachromatischer Technik gemäß *Lisons* Anweisungen leicht zu erhalten sind, muß die Mucicarminmethode als eine im Hinblick auf ihre geringe Empfindlichkeit wenig geeignete Methode zum Nachweis diffus in Geweben vorkommender hochmolekularer Esterschwefelsäuren betrachtet werden. Positive Färbung wird mittels dieser Methode nur bei den höchsten Konzentrationen der genannten Säuren im Gewebe erhalten.

3. Die Mucicarminmethode gibt keine sichere Färbung der Granula der Mastzellen. Die Methode ist zum Nachweis dieser Zellen nicht brauchbar. Sie liefert sogar in den meisten Fällen ein direkt falsches Resultat, indem bei ihrer Anwendung am Orte einer größeren Anhäufung von Mastzellen eine diffuse Rotfärbung eintritt.

4. Es wird davor gewarnt, unkritisch die Mucicarminfärbung als einzige „Schleimfärbungsmethode“ anzuwenden. Statt derselben oder auch zusammen mit ihr hat metachromatische Technik zur Verwendung zu kommen.

5. Bei Verwendung metachromatischer Technik, z. B. mit Toluidinblau in $\frac{1}{2}$ —1 %iger wässriger Lösung, zeigt es sich, daß in dem Stroma vieler Geschwülste die als „mucicarminophile Substanz“ bezeichnete Erscheinung teils durch diffus vorkommende Esterschwefelsäuren und teils durch die Granula vorhandener Mastzellen verursacht ist.

6. Die Ansicht von dem Vorkommen „mesodermaler Schleimbildung“ (*Letterer*) als Zeichen einer Entartung des betreffenden Bindegewebes ist unzutreffend.

7. Die alten Bezeichnungen „Schleimgewebe“, „schleimige Degeneration“ usw. sowie irreführende neue Bezeichnungen, wie „schleimige Paratrophie“ (*v. Gierke*) sind nicht weiter zu verwenden. Stattdessen sollte man sich objektiv begründeter Bezeichnungen, wie „metachromatisch färbbares Bindegewebe“, „diffuse Metachromasie in Bindegewebe“ bedienen oder auch direkt ein „Vorkommen von Mucoproteinen in Bindegewebe“ angeben. Bei der vorgeschlagenen Terminologie fiele der alte Degenerationsbegriff weg.

8. Der Begriff „mucicarminophile Substanz“ hat, wenn es sich darum handelt, in mesodermalen Geweben vorhandene Esterschwefelsäuren zu beschreiben, im Hinblick auf die Unempfindlichkeit und das mangelhafte Differenzierungsvermögen der Mucicarmethoden keine Berechtigung.

Literatur.

- Arnold, J.*: Zbl. Path. 21 (1913). — *Becher, S.*: Untersuchungen über Echtfärbung der Zellkerne mit künstlichen Beizenfarbstoffen usw. Berlin 1921. — *Brezovnik, V.*: Ref. in Néoplasmes 5 (1926). — *Chittenden u. Gies*: J. of exper. Med. 1 (1896). — *Garrault, H.*: Archives Anat. microsc. 30 (1934). — *Gierke, E. v.*: Störungen des Stoffwechsels in Aschoffs Pathologischer Anatomie, Bd. 1. Jena 1936. — *Hammarsten, O.*: Pflügers Arch. 36 (1885). — Hoppe-Seylers Z. 12 (1888). — Arch. f. Physiol. 36. — *Holmgren, Hj. u. O. Wiklander*: Z. mikrosk.-anat. Forsch. 42 (1937). — *Hoyer, H.*: Arch. mikrosk. Anat. 36 (1890). — *Jernström, E.*: Uppsala Läk.för. Förh. 15 (1880). — *Kuru, H.*: Dtsch. Z. Chir. 98 (1909). — *Landwehr, A.*: Hoppe-Seylers Z. 5, 8, 9 (1881—1885). — *Lechner, J.*: Erg. Anat. 25 (1924). — *Letterer, E.*: Über epitheliale und mesodermale Schleimbildung usw. Leipzig: S. Hirzel 1932. — *Levene, P.*: Hexosamines and Mucoproteines. London: Longmans 1925. — *Lison, L.*: Arch. Biol. 46 (1935). — *Loebisch, W.*: Hoppe-Seylers Z. 10 (1886). — *Mayer, P.*: Mitt. zool. Stat. Neapel 12 (1885—1897). — *Needham, J.*: Chemical Embryology. Cambridge Univ. Press 1931. — *Perrot, M.*: Etude anatomo-clinique des cancers du sein. Thèse. Paris 1932. — *Raudnitz*: Arch. mikrosk. Anat. 21 (1883). — *Rollett, A.*: Sitzgsber. Akad. Wiss. Wien. Math.-naturwiss. Kl. 30, 33 (1858), 39 (1860). — *Roulet, F.*: Lubarsch-Ostertags Ergebnisse der allgemeinen Pathologie und pathologischen Anatomie der Menschen und der Tiere, Bd. 32. 1937. — *Ssolowjew, A.*: Virchows Arch. 261 (1926). — *Stockinger, W.*: Z. Zellforsch. 6 (1927—28). — *Sylvén, B.*: Klin. Wschr. 1938, H. 44. — Z. Mikrosk. 1938, H. 4. — *Tilanus*: De saliva et muco. Amstelod. 1849. Ref. in *Virchow*: Würzburg, Verh. 2, 284 (1852). — *Wermel u. Sassachin*: Z. Zellforsch. 5 (1928). — *Virchow, R.*: Würzburg, Verh. 1852.
-