

(Aus dem Pathologischen Institut der Medizinischen Akademie in Danzig
[Vorstand: Prof. F. Feyrter].)

Zur Histochemie des Hirnanhanges.

Von
Dr. F. Bienwald.

(Eingegangen am 24. Dezember 1938.)

1.

In den Arbeiten *F. Feyrters*: „Über ein sehr einfaches Verfahren der Markscheidenfärbung, zugleich eine neue Art der Färberei“, „Über den Naevus“, „Über den Nachweis eines blutdrucksteigernden Stoffes im Carcinoïd“ und „Über diffuse endokrine epitheliale Organe“ findet sich die kurze Angabe, daß beim Einschluß von Gefrierschnitten formol-fixierten Materials in ein Weinsteinsäure-Thioningemisch (Einschlußfärberei) der *Hinterlappen des Hirnanhanges* *rosenrote Metachromasie* zeigt, und überdies die Angabe, daß von den *Zellen der Adenohypophyse* bei Anwendung dieses Färbeverfahrens ein Teil *ungefärbt*, ein anderer *gelb*, und wieder ein anderer *metachromatisch rosenrot getönt* erscheint.

Feyrter fügt dieser Angabe kurz hinzu, daß im wesentlichen, wenn auch vielleicht nicht ganz genau, die ungefärbten Zellen den Hauptzellen, die gelben den eosinophilen und die metachromatisch rot gefärbten den basophilen Zellen entsprächen.

Aufgabe vorliegender Arbeit ist es, die nur für die Hypophyse des Menschen gemachte Angabe *Feyrters* durch ausgedehntere Untersuchungen auf ihre Gültigkeit auch für das Tierreich zu erproben, ihre Abhängigkeit von äußeren Umständen (Lebensfrische, bzw. Fäulniszustand und Fixation des Untersuchungsgutes) zu erforschen und insbesondere das Bemerkenswerte dieser Erscheinungen der Metachromasie hinsichtlich des Chemismus der Lebenstätigkeit der Hypophyse zu betonen. In der letztgenannten Hinsicht will die vorliegende Arbeit als vorbereitende Untersuchung für den Chemiker, bzw. für ein Zusammenarbeiten des Chemikers mit dem Morphologen, gewertet sein.

2.

Zum richtigen Verständnis der Befunde, die vorliegende Arbeit mitteilt, ist eine Erörterung über die oben angeführte sog. Einschlußfärberei und die dabei in Erscheinung tretende Metachromasie nicht zu umgehen.

In Gefrierschnitten *formolfixierter*, uneingebetteter oder in Gelatine eingebetteter Gewebsstücke, welche auf dem Objektträger in wäßrige

Thionin-Weinsteinsäurelösung¹ (Thionin 1,0, Weinsteinsäure 0,5, Aqua dest. 100,0) eingeschlossen werden, tritt eine allmählich und bis zu voller Ausbildung fortschreitende Metachromasie in Erscheinung, von mannigfacher Art, aber dabei für bestimmte Stoffe, Zellen und Gewebe jeweils kennzeichnend und gesetzmäßig.

Ein Teilergebnis des Verfahrens ist die oben angeführte Metachromasie im Bereich der Adeno- und Neurohypophyse.

Die Bedingungen des Zustandekommens der in Rede stehenden Metachromasien bei Anwendung der sog. Einschlußfärberei in ein Weinsteinsäure-Thioningemisch sind vorderhand nicht erschöpfend erforscht. Kurz sei hier daran erinnert², daß die Ergebnisse der Einschlußfärberei sich weder durch den Luftabschluß, noch etwa durch eine chemische Einwirkung von Seiten des Glases erklären lassen. Man kann statt Glas Bergkristall nehmen, das Ergebnis ist das gleiche. Man kann die Schnitte auf dem Objektträger mit dem Deckglas zudecken, das Deckglas nur an den vier Ecken mit Kitt befestigen, die derart versorgten Schnitte in die Farbwanne einstellen, so daß die Farblösung von allen Seiten Zutritt hat, man kann zur Einschlußfärbung eine Farblösung verwenden, aus welcher der Sauerstoff durch Einleiten von Stickstoff völlig verdrängt wurde, das Ergebnis ist das gleiche. Einleiten von Wasserstoff macht die Farblösung unbrauchbar, da sie dabei ausflockt, aber nach längerem Stehen an der Luft wird sie wieder brauchbar.

Laienhaft betrachtet sieht es so aus, „als ob lediglich die spaltförmige Kammer es wäre, die den Schnitt zu einer anderen physikalisch-chemischen Auseinandersetzung mit dem Farbstoff nötigt, als sie bei gewöhnlicher Art zu färben, in der Färbewanne, vor sich zu gehen pflegt“ (Feyrer, s. Schulz³). Den physikalisch-chemischen Vorgang an sich möchten E. Königs und F. Feyrer als Reduktion deuten (s. Feyrer: „Über den Naevus“ u. s. S. 580).

Hinsichtlich der *chemischen Beschaffenheit der metachromatisierenden Stoffe* läßt sich folgendes vorläufig sagen:

Die altbekannte Metachromasie des Schleimes, der Knorpelgrundmasse und der Mastzellenkörnchen, die man bei Anwendung einer wäßrigen Thioninlösung und bei Vornahme der Färbung auf die gewöhnliche Weise, also in der Färbewanne, beobachtet, tritt auch bei Anwendung der Einschlußfärberei in Erscheinung. Auch für eine, in unserem Schrifttum wenig bekannte Metachromasie, nämlich die karmoisinrote Färbung der Reichschen sog. π -Granula (= protagonartigen Körnchen) in den Schwannschen Zellen des Nervengewebes, gilt das eben Gesagte. An allen anderen Geweben, die Feyrer anführt, tritt die Metachromasie ausschließlich bei Anwendung der Einschlußfärberei auf.

Die chemische Beschaffenheit der metachromatisierenden Stoffe des Schleimes, der Mastzellenkörnchen und der Knorpelgrundsubstanz ist bekanntlich von den verschiedenen Untersuchern im Laufe der Zeit sehr verschieden gewertet worden. Sehr bemerkenswerte Untersuchungen über diesen Gegenstand stammen aus neuerer Zeit von L. Lison.

¹ Wir verwenden ausschließlich Thionin pur. *Ehrlich*, bezogen von der Firma Grubler & Co., Leipzig und *Ehrlichs* Thionin (*Lauths* Violett), bezogen von der Firma E. Riedel de Haen, Berlin. Das Thionin H 363 der Firma Dr. K. Hollborn & Söhne färbt zu blaustichig, etwas weniger blaustichig färbt das Thionin *Bayer-Meister Lucius*, das durch die gleiche Firma vertrieben wird.

² Siehe Virchows Arch. 296, 652 (1936).

³ Eine ganz gleiche Auffassung hat unabhängig von Feyrer kürzlich auch Gönner geäußert. Daß die Umrandung des Deckglases mit Kittmasse keine Rolle spielt, versteht sich von selbst; sie soll den Schnitt lediglich vor der Austrocknung schützen.

Der nachfolgende kurze Bericht über das Ergebnis der *Lisonschen* Untersuchungen hält sich im wesentlichen an die einschlägige Darstellung *K. Zeigers* (Physico-chemische Grundlagen der histologischen Methodik, 1938).

Ihren Ausgang nahmen die Forschungen *Lisons* davon, daß alle bekannten metachromatisierenden Gewebsbestandteile ausgesprochen basophil sind, und daß die Basophilie des Knorpels nach den Untersuchungen von *Hansen* durch die Chondroitinschwefelsäure bedingt ist. So gelangte *Lison* zur Frage, ob nicht die chromatotropen (= die metachromatische Färbung bedingenden) Eigenschaften des Knorpels durch den Gehalt an dieser Substanz hervorgerufen würden. Die Chondroitinschwefelsäure erwies sich nun *in vitro*, ebenso wie einige ihrer Salze, auch in minimalen Mengen als ausgesprochen chromatotrop. Das Gleiche gilt für die Mucoitinschwefelsäure, die im Schleim vieler Drüsen vorkommt und mit der Chondroitinschwefelsäure nahe verwandt ist; beide sind nämlich Schwefelsäureester komplexer Polysaccharide.

Ausgedehnte Untersuchungen *Lisons* führten nun zu dem Ergebnis, daß der metachromatische Farbumschlag der verwendeten basophilen Farbstoffe eine spezifische chemische Reaktion darstellt, die ausschließlich an die Gegenwart von Schwefelestern vom Typ $R-\text{OSO}_3\text{H}$ und ihren Salzen gebunden ist. Die chromatotrope Kraft dieser Ester steigt mit ihrem Molekulargewicht. Unter ihnen sind die biologisch bedeutsamsten Abkömmlinge von Polysacchariden. Dementsprechend hat *Lison* der Metachromasie der oben angeführten Gewebsbestandteile den Wert einer spezifischen histochemischen Reaktion auf Schwefelester höheren Molekulargewichtes zugesprochen.

Von größtem Interesse ist also zunächst, ob auch die von *Feyrter* aufgedeckte, nur bei Anwendung der Einschlußfärberei in Erscheinung tretende Metachromasie den gleichen Wert einer histochemischen Reaktion auf Schwefelester höheren Molekulargewichtes im Sinne *Lisons* hat wie die altbekannte Metachromasie des Schleimes, der Knorpelgrundmasse und der Mastzellenkörnchen¹.

Feyrter hat hinsichtlich der chemischen Beschaffenheit der von ihm nur bei Anwendung der Einschlußfärberei beobachteten metachromatisch sich färbenden Stoffe betont, daß es sich um *fettige* Stoffe handelt, insoweit als die Vorbehandlung von Gefrierschnitten formolfixierten Untersuchungsgutes mit fettlöslichen Mitteln die nach dem Einschlußverfahren zu erzielenden Metachromasien nicht mehr in Erscheinung treten läßt².

¹ Es gibt eine wenig erforschte Gruppe von Lipoiden; die Sulfatide, bei denen es sich um Phosphatid-Schwefelsäure-Cerebroside handeln soll.

² Völlig beweisend für die fettige Beschaffenheit der metachromatisch sich färbenden Stoffe ist dieser Vorgang an sich nicht, es könnte sich denkbarerweise auch um nicht fettige wasserunlösliche, stets mit Fetten zusammen vorkommende Stoffe handeln, die sich zugleich mit diesen Fetten lösen.

Welcher genaueren chemischen Art diese metachromasierenden Fettstoffe sind, erscheint jedoch vorläufig nicht ganz durchsichtig.

Naturgemäß hat *Feyrter* zunächst versucht, durch Anwendung seiner Einschlußfärberei auf *reine* Fettstoffe zu klären, welcher Art die ausschließlich nach diesem Verfahren sich metachromatisch rot färbenden Fettstoffe seien, wobei er sich freilich von vornherein vor Augen hielt, daß *im Gewebe* in der Regel keine freien Fettstoffe vorliegen und überdies mit Fettgemischen zu rechnen ist.

Das Ergebnis dieser bisher nicht veröffentlichten, 1936¹ durchgeführten vergleichenden Versuche war folgendes:

1. *Neutralfett*. Das Fett gewöhnlicher Fettzellen in formolfixiertem menschlichem Gewebe erscheint ungefärbt, manchmal grünlich, niemals rot gefärbt. Das Gleiche gilt meist auch von den Fetttropfen der Talgdrüsenzellen, wenigstens für die am Rande der Drüsen gelegenen Zellen, während in der inneren Zone der Drüsen wiederholt metachromatisch rot sich färbende tropfig-körnige Masse aufscheint, wobei zu bemerken ist, daß gelegentlich am gleichen Orte ungefärbte, doppeltbrechende cholesterinige Masse zur Beobachtung kommt. *Freies reines*, unvorbehandeltes oder formolbehandeltes Neutralfett zeigt jedenfalls *keine Metachromasie*, und nimmt überhaupt keine Farbe an. Ebensowenig zeigen die untersuchten Fettsäuren Metachromasie.

2. *Cholesterin und Cholesterinester* zeigen in chemisch reinem Zustand, unvorbehandelt oder formolbehandelt, keine Metachromasie und nehmen überhaupt keine Farbe an. Das gleiche gilt offenbar für diese Stoffe so und sooft auch in formolfixiertem Gewebe, z. B. im Xanthelasma, in den Schnenscheidengeschwülsten. In jenen Fällen, wo cholesterin- oder cholesterinesterhaltige Zellen neben der nicht metachromasierenden Masse auch metachromatisch sich rötende fettige Tropfen oder eine mehr verwaschene rote Anfärbung aufweisen, liegt gewiß in erster Linie die Vermutung nahe, daß eine andersartige fettige Beimengung der besagten Metachromasie zugrunde liege.

3. *Phosphatide*. a) *Lecithin*. Reines Lecithin, unvorbehandelt oder formolbehandelt, zeigt *keine Metachromasie*, färbt sich mit dem Thionin vielmehr zart blau, gleichgültig, ob auf gewöhnliche Weise gefärbt oder in die Farblösung eingeschlossen. b) *Sphingomyelin*. Das Verhalten dieses Stoffes ist das gleiche wie das des Lecithins.

4. *Cerebroside*. Zur Verfügung stand lediglich ein von Prof. *E. Schmitz* (Breslau) überlassenes, von Prof. *E. Klenk* (Köln) stammendes pulviförmiges Material, das mit der Aufschrift „*Phrenosin*“ versehen war und nach *Klenks* schriftlicher Mitteilung an *Schmitz* ein Cerebrosidgemisch darstellte. Diese Masse zeigte, unvorbehandelt oder formolbehandelt, auf gewöhnliche Weise gefärbt oder in die Farblösung eingeschlossen, stets eine sehr kräftige, leuchtend rote *Metachromasie*.

Alle diese Proben wurden mit den in Formalin aufbewahrten Stoffen im Laufe eines Jahres mehrmals wiederholt. Das Ergebnis war stets das gleiche.

Nach dem Einschlußverfahren in ein Weinstinsäure-Thioningemisch behandelt, verhalten sich demnach die verschiedenen untersuchten *reinen* Fettstoffe grundsätzlich so, als ob man sie auf die *gewöhnliche* Weise mit wässriger Thioninlösung färbte, d. h. von allen untersuchten reinen Fettstoffen zeigen ausschließlich die *Cerebroside Metachromasie*, und diese

¹ Aus der in *Virchows Arch.* 301, 417 (1938) erschienenen Arbeit „Über den Naevus“ aus Gründen der gebotenen Raumbeschränkung seinerzeit ausgeschaltet.

zeigen sie bei der gewöhnlichen Art zu färben ebenso wie bei Anwendung der Einschlußfärberei. In dieser Hinsicht stehen die bejahenden und die verneinenden Ergebnisse *Feyrters* im Einklang mit den älteren einschlägigen Befunden *F. Reichs* (1907), wenn wir hier davon abssehen, daß *Reich* von den Phosphatiden nur das Lecithin erprobte und über keine *reinen* Cerebroside, vielmehr nur über das Protagon verfügte.

Wieweit läßt sich das an *reinen* Fettstoffen erzielte Färbeergebnis verwenden zur Bewertung der an den Geweben bei Anwendung der sog. Einschlußfärberei beobachteten Metachromasien?

Allem Anschein nach ist zunächst nur der Schluß auf cerebosidige Natur der π -Granula möglich, insofern als diese Körnchen schon bei der gewöhnlichen Art, mit dem Thionin zu färben, Metachromasie zeigen (*F. Reich*), genau so wie Protagon (*F. Reich*), besser gesagt: genau so wie die Cerebroside (*Feyter*), mit denen sie überdies die Eigenschaft, sich nur in heißem Alkohol zu lösen, teilen (*Feyter*). Formolfixation ist für die Metachromasie der π -Granula nicht unbedingte Voraussetzung, man kann auch in Müllerscher Flüssigkeit, in *Orths* Gemisch, in wässriger Sublimatlösung fixieren.

Auf die Frage, welcher Art jene Fettstoffe in den Geweben seien, die *nur* bei Anwendung der sog. Einschlußfärberei Metachromasie zeigen, geben demnach die an reinen Fettstoffen angestellten Versuche keine Antwort, insofern, als *reine* Fettstoffe mit einem *derartigen* Verhalten nicht zur Beobachtung kamen.

Die Erforschung der besagten Frage leidet zunächst vielleicht schon daran, daß das eigentliche Wesen der in Rede stehenden Art der Färberei vorläufig nicht enträtselt ist (s. S. 577).

E. Königs (briefliche Mitteilung an *Feyter*, 1937) hält es, wie bereits erwähnt, für möglich, daß die bei Anwendung der Einschlußfärberei auftretenden Metachromasien auf *Reduktion* beruhen, eine Vermutung, zu deren Gunsten sich aus früheren Erfahrungen *Feyrters* folgende wesentliche Beobachtungen anführen lassen:

Eine sehr einfache Markscheidendarstellung an Rückenmarkgefrierschnitten kann durch Einlegen der Schnitte des formolfixierten Untersuchungsgutes in eine Kaliumpermanganatlösung ausgeführt werden. Die hierbei auftretende Schwärzung der Markscheiden läßt sich wohl nicht gut anders denn als Reduktion der Kaliumpermanganatlösung durch die Markscheidenmasse deuten. Und wohl das gleiche gilt für die Schwärzung der Markscheiden, die man bei Behandlung formolfixierter Gefrierschnitte mit der *Fontanaschen* Silbernitratlösung nach dem *Massonschen* Verfahren eintreten sieht. Die bei Anwendung der Einflußfärberei auftretenden Metachromasien könnten nach *Königs* Vermutung gefärbte Zwischenstufen in der von reduzierenden Stoffen der Gewebe bewirkten Überführung des Thionins in einen Leukokörper sein, welche Zwischenstufen (*Mesochinone*) möglicherweise eben nur bei Anwendung des besagten Färbeverfahrens in Erscheinung treten würden. Es wäre denkbar, daß bei gewöhnlicher Vornahme der Färbung (nämlich im *Schälchen*, also bei Vorhandensein eines Überschusses an Farblösung), diese rosa bis rot gefärbten Zwischenstufen übersprungen oder *in situ* nascendi weiter verändert werden; unter den Bedingungen der Einschlußfärberei hingegen, bei der die reduzierenden Stoffe sich nur mit einer kleinen und nicht ständig erneuerten Farbstoffmenge auseinandersetzen, könnte Stufe für Stufe des Ablaufes der Überführung

des Thionins in den Leukokörper sicht- und faßbar werden. Daß der Färbevorgang bei Anwendung des in Rede stehenden Verfahrens mit der Umwandlung des Farbstoffes in einen Leukokörper endet, geht ja wohl schon daraus hervor, daß die dabei erzielten Metachromasien ganz in der Regel im Verlauf von Tagen, Wochen oder Monaten abblassen und schließlich völlig verschwinden¹.

Mag auch die Theorie der Einschlußfärberei vorläufig noch unsicher sein, soviel glauben wir schon heute auf Grund der angeführten Untersuchungsergebnisse annehmen zu dürfen, daß die nach dem besagten Färbeverfahren metachromatisch sich rötenden Stoffe weder reines neutrales Fett, noch reines Cholesterin, noch reine Cholesterinester sind: eine *Beimengung* dieser Körper in metachromatisch sich rötenden andersartigen Fetten erscheint naturgemäß nicht ausgeschlossen. In erster Linie hatte *Feyrer* zunächst die Cerebroside vor Augen, insoferne, als von den verschiedenen, in reiner Form untersuchten Fettstoffen zunächst nur die Cerebroside Metachromasie zeigten, ferner auch deswegen, weil das an den *Gaucher*-Zellen mit ihrer cerebrosidigen (kerasinigen) Inhaltsmasse erzielte Färbeergebnis in dem ersten untersuchten Fall völlig damit im Einklang zu stehen schien². *Feyrer* glaubte dabei in wenig bestimmter Vermutung das Kohlehydrat in den Cerebrosiden, nämlich die Galaktose, auf wesentlich an dem Zustandekommen der Färbung beteiligt verächtigen zu dürfen. Wobei er sich daran erinnern zu müssen glaubte, daß für die Metachromasie des Schleimes sein Gehalt an Glucosamin beschuldigt werde, welcher chemische Körper ja auch im Knorpel, der bekanntlich gleichfalls Metachromasie zeigt, sich findet (s. aber hierzu S. 578, *Lison*). Die Tatsache, daß auch die kennzeichnenden Zellen eines Falles von *Niemann-Pickscher* Krankheit mit ihrer phosphatidigen Inhaltsmasse metachromatische Rotfärbung zeigten², mußte für sich allein noch nicht zum Fallenlassen der ersten Vermutung führen, da eine, wenn auch nur sehr geringfügige Beimengung von Cerebrosiden vielleicht nicht ganz unmöglich erschien, und weil schließlich für eines der Phosphatide, für das Sphingomyelin, von berufener Seite (*Klenk*) eine nahe chemische Verwandtschaft mit den Cerebrosiden betont wird. Immerhin mahnte das mit dem reinen Sphingomyelin erzielte verneinende Ergebnis und die mit den *Niemann-Pick*-Zellen gemachte Erfahrung zur Vorsicht. Hierzu kamen aber bald noch andere Bedenken. So findet sich schon bei *Reich* folgende Angabe: „Unter gewissen Umständen, die ich noch nicht genauer definieren kann, kommt aber auch bei dem Lecithin eine metachromatische Rotfärbung zustande“. Soll man hier gleichfalls Beimengungen andersartiger Fette in Frage ziehen? Oder soll man sich in diesem Zusammenhang an die im Schrifttum freilich sehr bestrittene Angabe (*Bing*) erinnern, daß es Lezithinzucker gebe? Für uns vorläufig unlösbare Fragen.

Noch bedenklicher erscheinen folgende, seit der ersten Veröffentlichung² gemachten Beobachtungen: Ein von *E. Epstein* überlassenes, aus einem *Gaucher*-Fall rein gewonnenes Kerasin, also ein Cerebrosid, zeigt mit wäßriger Thioninlösung behandelt, überhaupt keine Metachromasie, mit einem Weinsteinsäure-Thioningemisch nur Spuren von Metachromasie, mag man die Farblösung auf gewöhnliche Weise oder nach dem Einschlußverfahren einwirken lassen.

Hinzu kommt, daß wir seither eine Reihe von *Gaucher*-Milzen auf Metachromasie der *Gaucher*-Zellen nachzuprüfen in der Lage waren, mit dem Ergebnis, daß in einem Teil der Fälle die besagten Zellen sich rot anfärbten, in einem andern Teil aber nur in kaum merklichen Spuren. Kommt hier das vieljährige Liegen der Stücke in Formaldehyd als störend in Frage? Ohne weiteres kaum. Auch die Stücke mit

¹ Ungeklärt bleibt dabei aber zunächst die Tatsache, warum die Metachromasie wiederholt monatelang sich gut erhält in Schnitten, bei deren Herstellung und Färbung keine Abweichung vom üblichen Gang des Verfahrens sich fassen läßt.

² Siehe Virchows Arch. 296, 651 (1936).

Metachromasie waren jahrelang in der Fixierungsflüssigkeit gelegen¹. Waren die Stücke, die nicht von uns selbst gewonnen worden waren, in der Zwischenzeit nur mit Formaldehyd in Berührung gekommen? Für uns vorläufig noch unbeantwortbare Fragen.

Der Umstand, daß ein Teil der metachromatisch sich färbenden fettigen Stoffe schon in kaltem Alkohol sich löst, spräche an sich vermutlich nicht unbedingt gegen ihre cerebrosidige Natur, sie könnten ja durch ihre Vermengung mit anderen, leichter löslichen fettigen Körpern in ihrer Löslichkeit geändert, nämlich leichter löslich geworden sein.

Die in Rede stehende besondere Art metachromatischer Färberei hat Fixation der Gewebe in *Formaldehyd* zur Voraussetzung: an unfixiertem Gewebe tritt sie nicht in Erscheinung. Sublimatfixierung oder Fixation in *Müllerscher Flüssigkeit* führt zu keinem Ergebnis².

Ist es unter Berücksichtigung dieses Umstandes erlaubt, die chemische Beschaffenheit der in formolfixierter Gewebsmasse metachromatisch sich rötenden Stoffe auf die Weise zu ergründen, daß man reine, vom Chemiker durch ganz andere Vorbehandlung gewonnene Fettstoffe der vergleichenden färberischen Betrachtung zugrunde legt? Das erscheint wohl fraglich.

Dürfen wir das histochemische Wirkungsvermögen von Stoffen, zu deren Reindarstellung eingreifende Maßnahmen vonnöten waren, mit jenem Wirkungsvermögen gleichsetzen, das sie im Gewebe, verkettet³, haben? Auch das ist wohl fraglich.

Wir befürchten, in den Augen des Lesers fast allzu viele Fragen aufgeworfen zu haben. Doch handelt es sich hier um schwierige *chemische* Dinge, für deren Klarstellung der Morphologe für sich allein gewiß nicht zuständig ist. Sehr zu begrüßen wäre eben, wenn sich die chemische Forschung für die hier aufgerollten Fragen erwärmen wollte.

Soviel aber scheint, wie bereits oben betont, heute schon erlaubt, daß als Grundlage der bei der Anwendung der sog. Einschlußfärberei im Bereich der verschiedenen Gewebe auftretenden Metachromasie besondere lipoidige Stoffe angenommen werden dürfen. *Feyrter* hatte, wie oben dargelegt, zunächst in erster Linie Stoffe aus der Gruppe der *Cerebroside* vor Augen, „doch spielen aus den oben dargelegten Gründen offenbar auch *Phosphatide* eine bedeutsame Rolle“⁴.

¹ Daß aber gegebenenfalls auch ein nur monatelanges Liegen in der Formaldehydlösung die Voraussetzung des Auftretens der Metachromasie an den *Gaucher-Zellen* zerstören kann, haben wir einmal feststellen können. Die „außerordentlich distinkte Darstellung, welche die *Gaucher-Zellen* durch die *Feyrtersche Thioninmethode*“ in dem von *W. Köhlmeier* vorgewiesenen Fall [s. Zbl. Path. 69, 440 (1937)] „erfuhren“, war an dem uns nach einigen Monaten von Prof. *Chiari* freundlichst überlassenen Untersuchungsgut nicht mehr zu erzielen.

² Von den Metachromasien, die bei gewöhnlicher Art mit dem Thionin zu färben, also in der Farbwanne, eintreten, gilt diese Einschränkung nicht.

³ Das verneinende Ergebnis der an reinen Fettstoffen nach dem Einschlußverfahren vorgenommenen Färbeversuche läßt gewiß auch daran denken, daß es sich bei den im Gewebe metachromatisch sich rötenden Fettstoffen um *Lipoide in chemischer Bindung an gewisse, nicht lipoidige Stoffe* handeln könnte, welche Verbindungen möglicherweise reduzierende Eigenschaften hätten (*Feyrter*, s. *Schulz*, I. e., S. 35).

⁴ Virchows Arch. 301, 462 (1938).

3.

Aus der Klasse der *Säugetiere* gelangten zur Untersuchung: *Pferd*, *Schwein*, *Meerschweinchen* und *Hund*.

Bei allen diesen Tieren zeigt der *Hinterlappen* der Hypophyse gesetzmäßig nach dem Einschluß von Gefrierschnitten formolfixierten Untersuchungsgutes in ein Weinsteinsäure-Thioningemisch eine *rosarote bis rote Metachromasie*¹. Dabei handelt es sich um eine *diffuse* Färbung der Zellen, der Zelleiber und Fasern. Daneben treten in einem Teil der Zellen auch rot gefärbte Körnchen in Erscheinung.

Der Befund am Vorderlappen und Zwischenlappen wechselte bei den genannten Tieren bis zu einem gewissen Grade.

Im *Vorderlappen* des untersuchten *Pferdes* fanden sich reichlich *grünlich-gelbe* (= oxyphile) Zellen, daneben plasmaarme *chromophobe* (= Hauptzellen) und spärlich eingestreute, ein reichlicheres Plasma als die Hauptzellen aufweisende Zellen, deren Zelleib leicht *rötlich angefärbt erscheint* (= basophile Zellen). Wesentlich der gleiche Befund war an dem *Vorderlappen* des untersuchten *Meerschweinchens* zu erheben.

Im *Vorderlappen* des untersuchten *Hundes* fanden sich *chromophobe* (= Hauptzellen) und *grünlichgelbe* (= oxyphile) Zellen, wobei die grünlichgelben (= oxyphilen) Zellen stellenweise einen rötlichen Schimmer zeigten. Wohlgekennzeichnete, *metachromatisch rot gefärbte* (= basophile) Zellen waren *nicht* zu beobachten. Auffälligerweise fand sich im Vorderlappen verstreut eine ganze Reihe großer, eigenartig *bläulich* getönter Zellen.

Im *Vorderlappen* des untersuchten *Schweines* fanden sich sehr reichliche, mehr homogene, also ungekörnte, ziemlich umfängliche, *rosarot* gefärbte (= basophile) Zellen. Zahlenmäßig an 2. Stelle stehend fanden sich *grünlichgelb* glänzende (= oxyphile) Zellen und *chromophobe* Zellen (= Hauptzellen) vor, deren spärliches Plasma eher zart blau erschien. Daneben aber waren auch Zellen zu beobachten, die hinsichtlich der Homogenität und des Umfanges des Zelleibes ganz das Aussehen der basophilen Zellen aufwiesen, jedoch ohne Metachromasie zu zeigen. Ihr Plasma war vielmehr zart *blau* oder *farblos*. Stellenweise zeigten die grünlichgelben (= oxyphilen) Zellen einen ganz zarten rötlichgelben Beiton. Beim Durchmustern zahlreicher Schnitte schienen mannigfache Übergänge zwischen den angeführten Zellformen auf.

Die Zellen des *Mittellappens* wiesen beim *Pferd*, *Schwein*, *Meerschweinchen* eine zarte *rosarote* Tönung auf, die beim Schwein einen bläulichen Beiton zeigte. Das *Kolloid* in den Bläschen des Mittellappens (beim

¹ Aus Gründen der Kostenersparnis sehen wir hier von einer farbigen Zeichnung ab. Der in Rede stehende metachromatische Farbton entspricht im großen und ganzen den rosaroten Tönen, die in Abb. 1b in Virchows Arch. 296, 650 (1936) wiedergegeben sind.

Schwein) war von kräftig *dunkelroter* Farbe. Beim Hund war eine eigentliche Pars intermedia nicht aufzufinden.

Aus der Klasse der Vögel gelangte die *Taube* zur Untersuchung. Auch der *Hinterlappen* der Taube zeigte eine deutliche zarte *Metachromasie* in rosenrotem Tone. Im Hinterlappen mehrere, von Epithel ausgekleidete Hohlräume (= Fortsätze des Proc. infundibularis). Ein Zwischenlappen in den durchmusternden Schnitten nicht aufgefunden.

Im *Vorderlappen* ließen sich unterscheiden: a) Kleine chromophobe Zellen, b) größere blasses Zellen mit spärlichen, grünlich glänzenden Körnchen, die etwas metachromasierten. Wohlgekennzeichnete Zellen vom Aussuchen der *oxyphilen* Zellen, also dichtgekörnte grünlich glänzende Zellen, fanden sich *nicht* vor. c) An umschriebener Stelle um eine Lichtung angeordnete regelrecht *metachromasierende*, also offenbar *basophile* Zellen. d) Um einen größeren Hohlraum mit capillärer Wandung angeordnete, mitten im Lappen gelegene, größere, auffallend bläulich sich anfärbende, etwas langgestreckte Zellen, von denen sich nicht mit Sicherheit entscheiden ließ, ob es sich um epitheliale Zellen handele.

Aus der Klasse der *Reptilien* stand uns nur eine *Schildkröte* zur Verfügung. Der *Hinterlappen* der Hypophyse weist zarte *rosenrote* Metachromasie auf. Im Innern des Hinterlappens ein von Epithel ausgekleideter Hohlraum, der sich nach vorne zu in 3 blind endigende Säcke verzweigte. Das Gewebe des vorderen Teiles der Hypophyse schlauch förmig gebaut. Die Schläuche enthalten in ihrer *Lichtung* eine *gräuliche* metachromasierende Masse. Die Schläuche selbst sind von einem einreihigen Zylinderepithel gebildet, dessen Zellen an der Basis wiederholt einen deutlich grünlichen Glanz aufwiesen. Eine Sonderung in Hauptzellen, *oxyphile* und *basophile* Zellen ist nicht vornehmbar. Offenbar handelt es sich bei dem eben beschriebenen epithelialen Körper um den Zwischenlappen. Der eigentliche Vorderlappen soll ja bei der Schildkröte rudimentär entwickelt sein.

Aus dem Angeführten geht demnach hervor, daß der Hinterlappen des Hirnanhanges beim Menschen und den übrigen Säugetieren, in gleicher Weise aber auch bei den Vögeln und Reptilien bei Anwendung der Einschlußfärbung in ein *Weinsteinsäure-Thioningemisch* eine deutliche metachromatische rosarote bis rote Anfärbung zeigt. Diese Metachromasie des Hinterlappengewebes ist nach dem früher Gesagten wohl auf den Gehalt des *Gewebes an fettigen Stoffen besonderer Art*, die unter bestimmten Bedingungen reduzierende Eigenschaften zeigen, zurückzuführen.

Die Zusammensetzung des Vorderlappens der Hypophyse aus chromophoben, gelben (= *oxyphilen*) und metachromatisch rosenrot sich färbenden (= *basophilen*) Zellen, wie sie beim Menschen bei Anwendung der besagten Färbung in Erscheinung tritt, kehrt bei den untersuchten

Säugetieren nicht in völlig gleicher Weise, sondern mit einigen Abänderungen wieder. Noch stärkere Unterschiede bestehen in dieser Hinsicht zwischen Säugetieren, Vögeln und Reptilien

Untersuchungen über die *Löslichkeit* dieser metachromasierenden Fettstoffe haben wir an der Hypophyse des Pferdes angestellt.

Die Alkoholvorbehandlung der Gefrierschnitte in 70% Alkohol über Nacht (= 24 Stunden) verhindert das Auftreten jeglicher Metachromasie nach dem Einstuß in das Weinsteinsäure-Thioningemisch, sowohl im Bereiche des Hinterlappens wie des Mittellappens und der oben aufgezählten Zellen des Vorderlappens in gleicher Weise. Keinerlei Einwirkung hat die Alkoholvorbehandlung auf das Metachromasievermögen des Kolloids im Zwischenlappen. Die Schnitte auch nach 48 Stunden langer Aufbewahrung unverändert.

5 Min. lange Vorbehandlung der Schnitte mit 70% Alkohol bei 37° beseitigt das Metachromasievermögen noch nicht. In Schnitten, die in 70% Alkohol bei 37° 1 Stunde belassen werden, tritt die Metachromasie des Hinterlappens noch etwas angedeutet in Erscheinung. Der Aufenthalt der Schnitte in 70% Alkohol auf 1 Stunde bei Zimmertemperatur führt zu keiner faßbaren Änderung des Metachromasievermögens.

Die Vorbehandlung der Schnitte in 95% Alkohol auf 24 Stunden bei Zimmertemperatur beseitigt die Metachromasie des Vorder- und Hinterlappens fast vollkommen, ein andermal vollkommen. Die Vorbehandlung der Schnitte in 95% Alkohol auf 24 Stunden bei 37° und bei 56° beseitigt die Metachromasie des Vorder- und Hinterlappens spurlos. 5 Min. lange Vorbehandlung der Schnitte mit 95% Alkohol bei Zimmertemperatur, bei 37° und im Brutschrank beseitigt das Metachromasievermögen noch nicht.

Einbringen der Schnitte in Xylool, Chloroform und Benzol bei 37° auf 24 Stunden beseitigt das Metachromasievermögen sowohl der Zellen des Vorder- und Mittellappens, wie auch des Hinterlappens vollkommen, bzw. fast vollkommen, Benzol, Äther und Aceton vollkommen. Nach 5 Min. langer Einwirkung dieser Stoffe bei Zimmertemperatur ist die Metachromasie nur abgeschwächt.

Es ist vielleicht müßig, eigens zu betonen, daß es sich im vorstehenden um die Löslichkeit der metachromasierenden fettigen Stoffe aus den *Geweben* handelt, und daß damit nichts vorausgesagt ist über die Löslichkeit später einmal rein dargestellter solcher Stoffe.

Der Erhaltungszustand der Hypophyse spielt hinsichtlich des Auftretens der aufgezählten Metachromasien kaum eine Rolle, insoferne als sie auch an Hypophysen, die erst viele Stunden nach dem Tode der Leiche entnommen wurden, in fast gleicher Weise in Erscheinung treten. Viele Monate oder Jahre dauerndes Liegen der Gewebsstücke in Formaldehyd schwächt die Metachromasie allerdings meist deutlich ab.

4.

Die *rosenrote Metachromasie*, die an den basophilen Zellen des Vorderlappens der Hypophyse regelmäßig in Erscheinung tritt, beobachteten wir in gleicher Weise an den Zellen eines basophilen Adenomes bei einem Fall von Morbus Cushing (vgl. Feyrter: „Über diffuse endokrine epithiale Organe“, S. 19).

Und ebenso läßt sich die *rosenrote Metachromasie*, die am Hinterlappengewebe der Hypophyse regelmäßig in Erscheinung tritt, auch regelmäßig an den Zellen der Prieselschen Gewächse der Neurohypophyse feststellen. Bekanntlich hat *Priesel* diese Gewächse für neurogen, später wegen ihres reichen Gehaltes an Gitterfasern für desmogen erklärt. *Feyrter* leitet sie vom eigentlichen Hinterlappengewebe ab und hält sie dementsprechend für neurogen.

5.

Daß der *Hinterlappen* der Hypophyse beim Menschen und bei den verschiedenen Tierklassen in diffus verteilter Form fettige Stoffe besonderer Art enthält, erscheint uns nach Durchsicht des einschlägigen Schrifttumess neu, doch die bisherige Unkenntnis dieser Tatsache vom Standpunkte des Morphologen nicht verwunderlich, da mit den bisher üblichen Fettfärbeverfahren histochemisch nachweisbares Fett in der Neurohypophyse nicht zu fassen war. Allerdings haben wir auch in dem uns zugänglichen *chemischen* Schrifttum keinerlei Angaben über einen Fettgehalt der Neurohypophyse gefunden.

Daß die Zellen des *Vorderlappens* Fett in *Tropfenform* enthalten, bzw. enthalten können, ist dem Morphologen an sich schon lange bekannt. Nach *E. J. Kraus* handelt es sich bei diesen *tropfig* eingelagerten Fettstoffen um verwickelte Gemische anisotroper und isotroper, teils leicht, teils schwer in Alkohol löslicher Lipide, welches Gemisch unter anderem Cholesterinester, Fettsäuren und Seifen enthält.

In diesem Zusammenhange ist wohl auch die diffuse blasser gelbliche Anfärbung der oxyphilen Zellen durch den Sudanfarbstoff anzuführen, auf die im Schrifttum, soweit wir sehen, kein besonderer Wert gelegt wird, die wir aber betonen möchten.

Die durch die Einschlußfärbung in ein Weinstainsäure-Thioningemisch aufscheinende diffuse Metachromasie der basophilen Zellen zeigt aber nach dem oben (s. S. 582) Gesagten die Anwesenheit von Phosphatiden oder Cerebrosiden oder von beiden, vielleicht in Bindung an nicht lipide Stoffe, an. Die bisherige Unkenntnis des Morphologen von dieser Tatsache nimmt nicht wunder, da für diffusen Fettgehalt charakteristische Färbeergebnisse an den basophilen Zellen mit den gebräuchlichen Fettfärbemitteln nicht erhoben wurden, bzw. im Schrifttum als solche nicht eigens betont wurden. Für die Erweiterung unserer Kenntnisse von der Lebenstätigkeit der Hypophyse ist der Befund eines besonderen Fettgehaltes des Hinterlappens sowie der basophilen Zellen des Vorderlappens der Hypophyse (s. *Feyrter*, 1936) vielleicht schon insoferne sehr bemerkenswert, als eine enge Beziehung der Tätigkeit der Hypophyse zum Fettstoffwechsel ja bereits wohl bekannt ist (s. *Jores*, Schrifttum).

Vom Standpunkte gestaltlicher Betrachtung ist jedenfalls die so ungemein häufige Vermehrung der basophilen Zellen im Vorderlappen

der Hypophyse bei den verschiedenen Formen der Fettsucht und ihre adenomatöse Wucherung beim Morbus *Cushing* sehr bemerkenswert.

Zusammenfassung.

1. In Gefrierschnitten formolfixierter Hypophysen tritt bei Anwendung der sog. Einschlußfärberei in ein Weinstinsäure-Thioningemisch eine rosenrote bis rote Metachromasie an den basophilen Zellen des Vorderlappens (Mensch, Pferd, Meerschweinchen, Schwein) und am Hinterlappengewebe (Mensch, Säugetiere, Vögel, Reptilien) regelmäßig in Erscheinung.

2. Diese Metachromasie zeigt das Vorhandensein besonderer Fettstoffe, die vermutlich zur Gruppe der Cerebroside und Phosphatide gehören, an.

3. Sie tritt auch an krankhaften Wucherungen der besagten Zellen, nämlich an den basophilen Adenomen des Vorder- und Hinterlappens sowie an den *Prieselschen* Gewächsen des Hinterlappens der Hypophyse in Erscheinung.

Schrifttum.

- Feyrter, F.:* Virchows Arch. **296**, 645 (1936); **298**, 187 (1936); **301**, 417 (1938); Über diffuse endokrine epitheliale Organe. Leipzig: Johann Ambrosius Barth 1938.
Gönnert, F.: Dermat. Wschr. **106**, 405 (1938). — *Hansen, Fr. C. C.:* Anat. H. 83, 535 (1905). — *Jores, A.:* Die Krankheiten des Hypophysenzwischenhirnsystems. Bumke u. Foerster Handbuch der Neurologie, 1937. — *Kraus, E. J.:* Beitr. path. Anat. **54**, 520 (1912). — *Lison, L.:* Arch. de Biol. **46**, 599 (1935). — *Priesel, A.:* Virchows Arch. **238**, 423 (1922). — *Reich, F.:* J. Psychol. u. Neur. **8**, 244 (1907). — *Schulz, P.:* Beitr. path. Anat. **101**, 32 (1938). — *Zeiger, K.:* Physikochemische Grundlagen der histologischen Methodik. Dresden u. Leipzig: Theodor Steinkopff, 1938.
-