

Aus dem Pathologischen Institut der Westfälischen Landesuniversität zu Münster
(Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. HERBERT SIEGMUND).

Untersuchungen zur histochemischen Indophenolblau-Synthese der Herzmuskelzellen und Leukocyten*.

Von

NORBERT SCHÜMMELFEDER.

Mit 18 Textabbildungen.

(Eingegangen am 18. Mai 1949.)

Einleitung.

Die morphologische Untersuchung normaler und erkrankter Organe hat mit den in der Histologie allgemein gebräuchlichen Färbemethoden einen gewissen Abschluß erreicht. Diese an sich vielfältigen Methoden erlauben einen weitgehenden Einblick in die Morphologie der Gewebe, jedoch über die Zellfunktion selbst und den funktionellen Zustand der Zelle können sie nur sehr wenig aussagen. Allerdings zeigt eine Anzahl histochemischer Methoden einen erfolgversprechenden Anfang zu einer Histologie des Funktionszustandes der Zellen und Gewebe. Es sei an die Nachweismethoden von Glykogen, Eisen, Glutathion, Vitaminen und der Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration, des isoelektrischen Punktes der Zelleiweiße sowie des Redoxpotentials der Zelle erinnert. Allerdings muß man sich darüber klar sein, daß mit derartigen Methoden nicht Funktionsabläufe, sondern nur der Funktionszustand im Augenblick der Untersuchung festgestellt werden kann.

Eine sehr bedeutende Rolle im funktionellen Zellgeschehen nehmen die Fermente ein. Eine Reihe von Methoden wurde im Schrifttum angegeben, um Enzyme in den Zellen der Gewebe nachweisen zu können. Es sind dies vorwiegend die sog. Oxydase-Reaktionen, und zwar der Nachweis von Phenolasen, Peroxydasen, Tyrosinase, die Dopa-Reaktion und die eigentlichen Oxydase-Reaktionen mit Hilfe von Dimethyl-p-Phenylendiamin. Bei all diesen Reaktionen handelt es sich in jedem Fall um Oxydationsvorgänge, deren Nachweis dadurch möglich wird, daß farblose oder farbschwache Lösungen durch katalytisch wirkende Substanzen (Fermente) zu dunklen Farbstoffen oxydiert werden, welche dabei in den Gewebszellen zur Ablagerung kommen. Ob es sich aber tatsächlich in jedem Fall um Fermentreaktionen handelt, wurde nicht immer mit der unbedingt erforderlichen Exaktheit nachgewiesen. Wenn

* Die Arbeit hat als Habilitationsschrift (Teil I) der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Landesuniversität zu Münster vorgelegen.

es auch sicher ist, daß derartige Oxydationsfermente in den Zellen vorkommen, so bestehen doch noch Lücken in unserer Erkenntnis, inwieweit die genannten Reaktionen mit Hilfe solcher Enzyme allein oder aber zusammen mit anderen katalytisch wirkenden Substanzen (nicht fermentativer Art) wirken. Möglicherweise könnten ja auch letztere allein als oxydationsbeschleunigende Agentien in Frage kommen.

Die eigenen Untersuchungen befassen sich in dieser Arbeit mit der Indophenolblau-Synthese im histologischen Schnittpräparat. Am Beispiel des Herzmuskels und der Leukocyten sollen die Grundlagen dieser Reaktionen und ihre Beziehungen zur Zellatmung weitmöglichst klargestellt werden.

Die Anwendung der Indophenolblau-Synthese in der Gewebelehre als Nachweis oxydativer Fähigkeiten des Gewebes geht zurück auf Untersuchungen von P. EHRLICH¹ (1885). Dieser injizierte Kaninchen intravenös eine wäßrige Lösung von α -Naphthol ($\frac{1}{2}\%$) und Dimethyl-p-Phenylendiamin ($\frac{1}{2}\%$) und fand eine Bläuung bestimmter Organe. Er nahm an, der infolge fehlender Reduktionswirkung am „sauerstoffgesättigten Parenchym“ über das Leukoprodukt hinaus gebildete Farbstoff (Indophenolblau) lagere sich als körnige Substanz im Protoplasma ab. Mikroskopische Untersuchungen wurden jedoch von EHRLICH nicht unternommen. Eine bereits im Blut erfolgende Farbstoffbildung konnte im übrigen mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Diese Untersuchungen von EHRLICH wurden in der Folgezeit nicht wieder aufgenommen, dagegen berichtete WURSTER² (1886), daß Papier, welches mit Di- oder Tetramethyl-p-Phenylendiamin getränkt war, sich beim Bestreichen mit Gewebsbrei blau färbte. RÖHMANN und SPITZER³ (1895) beobachteten in Lösungen von α -Naphthol + Dimethyl-p-Phenylendiamin unter der Einwirkung bestimmter Organbreie in kürzester Zeit die Bildung eines blauen Farbstoffes. Sie führten diesen Befund auf Oxydase-wirkung, also fermentativen Einfluß, zurück und lokalisierten die Synthese des Indophenolblaus ebenso wie EHRLICH in den Zellen selbst, da die Körperflüssigkeiten sich als kaum wirksam erwiesen.

Den nächsten bedeutenden Schritt in der Entwicklung der Reaktion brachten 1907 die Versuche von WINKLER⁴ an mit Formol oder Alkohol fixierten, aber auch frischen Objektträgerausstrichen von Blut, Eiter usw. Durch alkalische α -Naphthol- und Dimethyl-p-Phenylendiamin-Lösungen konnten hier im Protoplasma von polymorphkernigen Leukocyten blaue Granula zur Darstellung gebracht werden. Er nahm eine unter der Wirkung von Oxydasen vollzogene Färbung sauerstoffaffiner Granula an. Zur Annahme einer fermentativen Leistung wurde er durch die Tatsache veranlaßt, daß gekochte Ausstriche keine entsprechende Reaktion gaben.

Bereits 1902 sahen DIETRICH und LIEBERMEISTER⁵ bei Anwendung einer frisch bereiteten, schwach alkalischen Lösung von α -Naphthol- und Dimethyl-p-Phenylendiaminchlorhydrat in den verschiedensten Bakterien, am deutlichsten bei *B. anthracis*, die „Körnchen“ des Zelleibes sich blau färben und stellten die große Widerstandsfähigkeit dieser gefärbten Körnchen gegen eine Reihe sonst „lösender und zerstörender“ Agentien fest. Sie nahmen ein oxydierendes Ferment als synthetisierenden Faktor an, welches vielleicht in den Körnchen selbst lokalisiert sei. Jedoch wies MEYER⁶ (1903) darauf hin, daß der blaue Farbstoff ein ausgezeichnetes Reagens auf Fett sei, die Blaufärbung der Körnchen daher nur deren Fettnatur beweise. DIETRICH⁷ geht nun 1908 auf die Arbeiten von WINKLER

und MEYER ein. Auf Grund seiner neuerlichen Untersuchungen an frischen und fixierten Eiterausstrichen sowie Doppelmesserschnitten von frischem, unfixiertem Gewebe kommt er zum Schluß, es handle sich bei der Indophenolblau-Reaktion zwar zum wesentlichen Teil um eine fermentative, synthetisierende Leistung des Gewebes oder der Zellen, jedoch lasse sich aus der Lokalisation der Färbung auf die Lagerung derartiger Fermente kein Schluß ziehen. Der gebildete Farbstoff würde vielmehr von fettartigen Elementen aufgenommen und wohl auch gespeichert. DIETRICH war bereits aufgefallen, daß größere Fetttropfen eine rotviolette Färbung im Gegensatz zu den feineren Granula aufweisen. Er führte diese „Metachromasie“ auf die Größe der Tropfen und der dadurch veränderten Transparenz zurück.

1909 veröffentlichte W. H. SCHULTZE⁸ eingehende Untersuchungen zur Indophenolblau-Reaktion mit stark alkalischen Lösungen und führte dabei die Reaktion am formolfixierten Gewebsschnitt in die histologische Methodik ein. Im Gegensatz zu DIETRICH nimmt er für die Reaktion selbst einen alleinigen fermentativen Mechanismus an.

Neue Ergebnisse und Ansichten brachten 1911 Untersuchungen durch v. GIERKE⁹. Er konnte nachweisen, daß bei Verwendung alkalifreier Lösungen von α -Naphthol und Dimethyl-p-Phenylendiamin am unfixierten, frischen Material nicht nur die Leukocyten, sondern auch eine Reihe anderer Zellen, insbesondere Muskelgewebe und drüsige Organe einen deutlich positiven Reaktionsausfall zeigen. v. GIERKE führte die Bildung des blauen Farbstoffes ebenfalls auf oxydative Fermentwirkung zurück und sah die gefärbten Granula als präexistent an. An diese Beobachtung anschließend, untersuchte GRÄFF¹⁰ (1912) sehr eingehend die Indophenolblau-Synthese im unfixierten Gewebsmaterial mit alkalifreien Lösungen. GRÄFF verwandte bei seinen ersten Untersuchungen sehr verdünnte, farblose Lösungen (in physiologischer Kochsalzlösung) der durch v. GIERKE angegebenen Gemische. Seine Befunde ergaben folgendes Bild:

„Plattes und cylindrisches, ebenso flimmerndes *Epithel* in einfacher und mehrfacher Schicht wie auch Übergangsepithel enthält im Protoplasma oxydierende Granula, die bald gleichmäßig verteilt liegen, bald hauptsächlich den Raum gegen die freie Oberfläche der Zelle einnehmen oder nur der Kernwand anliegen. Hingegen lassen die *Endothelzellen* der Gefäßwände kaum Granula erkennen, verbreiteter sind sie in den *Mesothelzellen* des Peritoneums und des Perikards. *Drüsenzellen* scheinen im allgemeinen besonders reich an oxydierenden Granula zu sein. *Bindegewebszellen* geben meist nur geringe Reaktion, einzelne oft sehr wenige Granula am Rande des Kerns, indes scheint der Reichtum derselben an Granula vom Alter der Zellen abhängig zu sein. Im hyalinen *Knorpelgewebe* fand ich (d. h. GRÄFF) ebenfalls zum Teil Granula, aber oft auch größere, unregelmäßig geformte, mattviolette Körnchen. Besonders schöne Bilder gibt die quergestreifte *Skelettmuskulatur*. Die oxydierenden Granula finden sich in großer Anzahl im interfibrillären Sarkoplasma in Höhe der anisotropen Schicht. Bald findet man die Längs-, bald die Queranordnung stärker hervorgehoben; doch sieht man auch Fasern, in denen die Granula regellos zerstreut zu liegen scheinen. Die Muskelkerne sind oft noch besonders von Granula umgeben. Die Fasern des *Herzmuskels* geben ein ähnliches Bild. *Glatte Muskeln* zeigen nur sehr feine Granulierung ohne besondere Anordnung. Die *Ganglienzellen* weisen meist einen außerordentlichen Reichtum an oxydierenden Granula auf, während die *Gliazellen* diese so gut wie ganz vermissen lassen. *Leukocyten* und *Spermien* enthalten zahlreiche oxydierende Granula, bald gleichmäßig verteilt, bald hauptsächlich der Kernwand anliegend. Doch scheint der Gehalt in den Leukocyten stärkeren Schwankungen zu unterliegen. — *Leberzellen* enthalten sehr reichlich oxydierende

Granula, oft mit besonderer Betonung der Anordnung um den Kern. Ebenso die Zellen des *Nierenapparates*, ohne daß hier allgemein ein einzelner Kanälchenabschnitt besonders bevorzugt wäre; allerdings aber scheinen in den verschiedenen Einzelpräparaten immer bestimmte Kanälchenabschnitte von der Färbung bevorzugt zu werden. Das *Milzparenchym* muß als oxydasefrei gelten. Die granulierten Leukocyten, die manchmal in großer Anzahl anzutreffen sind, enthalten auch hier selbstredend oxydierende Granula. Die *Schleimhaut* des *Magen-* und *Darmkanals* gibt starke Reaktion; die *glatte Längs-* und *Quermuskulatur* ist sehr fein und spärlich granuliert, wodurch das Geflecht des *Plexus myentericus* in seiner fortlaufenden regelmäßigen blauen Granulierung meist um so deutlicher hervortritt.

Die *Drüsenzellen* des *Pankreas* wie die Zellen der abführenden Gänge scheinen in gleicher Weise stark granuliert; in anderen Fällen war die Granulierung nur mangelhaft. Die Zymogenkörnchen lassen keinen Zusammenhang mit den oxydierenden Granula erkennen. Die Zellen der *Nebenniere* von Rinde und Mark besitzen ebenfalls reichlich oxydierende Granula, wenn auch anscheinend nicht ausschließlich und in verschiedener Menge. (Das Fett der Nebennierenrinde färbt sich violett.) Die *Schilddrüsenepithelien* geben deutliche Reaktion mit häufiger Anordnung der Granula um den Kern, auch das zwischenliegende Bindegewebe zeigt Körnelung. Eine Ausscheidung der oxydierenden Granula in das Kolloid konnte ich (d. h. GRÄFF) nicht beobachten. Die *Prostata* weist selten vereinzelt oxydierende Granula in den Muskelfasern auf. Die Zellen der *Hodenkanälchen* zeigen verschiedenen Gehalt an oxydierenden Granula; oft sind sie reichlich, manchmal erscheinen sie nur in geringer Menge. — Die Epithelien und Zellen der *Tunica propria* des *Uterus* enthalten reichlich oxydierende Granula, dagegen findet man solche in den Muskelfasern nur sehr vereinzelt. — Im *Zottenepithel* der *Placenta* wie im zwischenliegenden Bindegewebe finden sich reichlich oxydierende Granula“ (GRÄFF).

Dieser Befund unterscheidet sich nun sehr erheblich von dem Ausfall der Indophenolblau-Reaktion wie sie WINKLER und W. H. SCHULTZE durchführten. Bei der letzteren zeigen nur die polymorphkernigen Leukocyten, die basophilen Mastleukocyten des Blutes und Knochenmarks, Drüsenzellen der Speichel- und Tränendrüsen und die syncytiale Auskleidung der Placenta einen positiven Befund in Form blauer Granula. Nach v. GIERKE sollen die Granula der letzteren Färbung „stabile Oxydasen“ darstellen, während nach der v. GIERKE-GRÄFFschen Methode außerdem „labile Oxydasen“ gefärbt würden. Später stellte GRÄFF fest, daß der Ausfall der *Gewebs-Nadi-Reaktion* ($Na-Di = Na-phthol-Di-methyl-p-Phenylendiamin$), wie er seine Methode bezeichnete, sehr von der Wasserstoffionenkonzentration des Gewebes und der Reaktionslösung abhängig ist. GRÄFF untersuchte in späteren Arbeiten¹¹ diese Faktoren genauer und stellte fest, daß zur Einhaltung optimaler Bedingungen der Gebrauch eines gepufferten Reaktionsgemisches erforderlich ist, wobei der günstigste Pufferbereich für tierisches Gewebe bei $p_H = 8$ liegt. Im Gegensatz zu DIETRICH ist GRÄFF der Ansicht, daß die auftretenden Farbkörnchen am Ort der Oxydation entstehen und abgelagert werden, allerdings wohl weniger in oxydierenden Granula selbst als vielmehr an deren Oberfläche.

1924 faßte KATSUNUMA¹² die bisherigen Ergebnisse der Histochemie der „Oxydase-Reaktionen“ in einer Monographie zusammen und brachte dabei eine Reihe eigener Untersuchungen. Schon GRÄFF war auf Grund von Versuchen zu der Auffassung gelangt, es müsse sich bei dem oxydierenden Agens der Gewebs-Nadi-Reaktion um einen Eisenkatalysator handeln. KATSUNUMA glaubte, diese Auffassung stützen zu können durch die Anwendung der supravitalen Eisen-

Reaktion an Gewebsschnitten (Schwefelammoniummethode QUINCKES¹³, an frischem Leber- und Nierengewebe). Hierbei wurden intracellulär Eisen-Granula beobachtet, die in ihrer Lokalisation mit den Indophenolblau-Granula übereinstimmen.

Auf Grund der Versuche von KATSUNUMA sowie der Arbeiten von WARBURG¹⁴ gelangte 1929 SEHRT¹⁵ im Anschluß an seine Versuche zur Darstellung sudanophiler Granula in Leukocyten und im Herzmuskel zu der Ansicht, „daß die Zellatmung und deren histologischer Ausdruck, die Oxydase-Reaktion, der tierischen Zelle unbedingt abhängig von dem Vorhandensein von Lipoiden ist“. Nach seiner Meinung sei das unbedingte Nebeneinander von Eisenkatalyse und Lipoid histologisch erwiesen. SEHRT diskutiert dabei die Frage, ob das Lipoid das Funktionseisen der Zelle mittel- oder unmittelbar katalytisch wirksam mache. Eine echte fermentative Wirkung wäre hiernach ausgeschlossen.

In der Folgezeit wurden von seiten der Histochemie keine neuen Ergebnisse erzielt, die den Reaktionsmechanismus der Indophenolblau-Reaktion oder der Gewebs-Nadi-Reaktion weiter zu klären vermocht hätten, jedoch brachte die biochemische Fermentforschung neues Licht in diesen Fragenkomplex.

Ausgehend von den Untersuchungen durch KEILIN und HARTREE¹⁶ konnten 1938 STOTZ und Mitarbeiter¹⁷ in biochemischen Versuchen feststellen, daß die Indophenolblau-Synthese im Nadi-Gemisch durch Gewebe mit Hilfe des Systems Cytochrom-Cytochromoxydase erfolgt. Dabei kann sowohl Cytochrom B wie auch in erhöhtem Maße Cytochrom C zusammen mit der Cytochromoxydase wirken. Damit stellt die „Indophenol-Oxydase“ früherer Untersucher also einen Teil des WARBURG-KEILIN-Systems der Atemfermente der Zelle dar. Es sei bemerkt, daß die Oxydation des Hydrochinons durch Gewebe zu Chinhydron nur durch Cytochrom C + Cytochromoxydase vor sich geht, hier ist das Cytochrom B ohne Einfluß. Durch diese Feststellung von STOTZ sind zwar weitgehend die Faktoren für die fermentative Oxydation des Nadi-Gemisches durch Gewebsbrei geklärt, wenn auch noch die genaue Konstitutionsaufklärung der Cytochrome und der Cytochromoxydase offenbleibt. Auch ist meines Wissens eine Reindarstellung des letzten Fermentes bisher nicht gelungen. Und doch bleiben für die Histochemie noch weitere Fragen offen. So ist als erstes zu klären, ob auch im Gewebsschnitt die mikroskopisch beobachtbaren Oxydase-Reaktionen mit α -Naphthol und Dimethyl-p-Phenylendiamin auf die Wirkung des Systems der Atemfermente der Zelle zurückzuführen sind. Weiterhin ist der Anteil von Lipoidkomplexen (SEHRT) und auch der ungesättigter, organischer Verbindungen, die infolge Oxydation zu „Peroxyden“ den aktivierten Sauerstoff an das Nadi-Gemisch weitergeben könnten, an den Reaktionen festzustellen. LISON¹⁸ machte 1936 an Hand von Untersuchungen darauf aufmerksam, daß neben den enzymbedingten, durch Cyan und Hitze hemmbaren positiven Reaktionsausfällen noch unter Umständen weitere Möglichkeiten der Färbung

übrig bleiben. Durch Reagensglasversuche und an Gewebsschnitten formalinfixierten Materials konnte es LISON wahrscheinlich machen, daß ungesättigte Fettsäuren sich ebenfalls mit Nadi-Gemischen färben. Da die mit Nadi-Reagens färbbaren Fettstoffe Jodkalium spalten und verschiedene Leukofarbstoffe oxydieren, möchte er den Anteil der Indophenolblau-Synthese durch Zellfett auf die Peroxydnatur von an der Luft oxydierten ungesättigten Fettkörpern zurückgeführt wissen. Diese Ansicht von LISON ist nicht unbedingt neu. Schon 1932 wollte REMESOW¹⁹ sehr einseitig die Nadi-Reaktion ausschließlich auf eine katalytische Reaktion des Cholesterins der Zellen und Gewebe zurückführen, wobei die Granulabildung in den Zellen einen Ausflockungsvorgang kolloidalen Cholesterins des Gewebes darstellen sollte.

Sodann ist der Mechanismus der Bildung von Farbgranula bei den Oxydase-Reaktionen nochmals eingehend zu untersuchen, damit entschieden werden kann, ob es sich hierbei um eine Neuentstehung handelt oder ob die Farbgranula in einer Beziehung stehen zu granulartigen Ansammlungen von Oxydationsfermenten.

Wenn man das vorhandene Schrifttum kritisch auswertet, so ist zunächst festzustellen, daß die beiden Hauptmethoden der Indophenolblau-Synthese: Indophenolblau-Reaktion nach WINKLER-W. H. SCHULTZE mit Verwendung alkalischer Lösungen und die Gewebs-Nadi-Reaktion nach GRÄFF unter Benützung gepufferter Reaktionsgemische sehr verschiedene Ergebnisse zeigen und daß weiterhin auch scheinbar unbedeutende Modifikationen in der Reaktionsausführung bei beiden Färbemethoden die Ergebnisse wesentlich verändern. Diese Tatsache, auf die auch ROMEIS²⁰ eindringlich hinweist, ist Ursache einer Reihe von Widersprüchen zwischen verschiedenen Arbeiten und führte unter anderem zu der Annahme, es handle sich entweder um unterschiedliche Oxydasen bei den einzelnen Reaktionen (HALLHEIMER²¹) oder aber um durch sekundäre Bedingungen in verschiedenem Ausmaß angreifbare Fermente (v. GIERKE), während eine dritte Gruppe von Untersuchern die fermentative Natur der oxydationsbeschleunigenden Agentien bei den einzelnen Reaktionen überhaupt leugnete (HOLLANDE²²).

Um bei den eigenen Untersuchungen nicht durch unklare Bezeichnungen der einzelnen Reaktionen neue Verwirrung zu stiften, wurde die Indophenolblau-Synthese im histologischen Schnittpräparat nach GRÄFF unter Verwendung gepufferter Lösungen grundsätzlich als „Gewebs-Nadi-Reaktion“ und die Methode von WINKLER und W. H. SCHULTZE mit Benützung starker alkalischer Farbgemische als „Indophenolblau-Reaktion“ bezeichnet. Die beiden Ausdrücke „Indophenolblau-Synthese“ und „Oxydase-Reaktion“ wurden als übergeordnete Begriffe für beide Reaktionen verwandt.

Eigene Untersuchungen.

A. Färbemethoden.

I. Die Gewebs-Nadi-Reaktion.

Auf Grund von Vorversuchen wurde für die Untersuchung des unfixierten, frischen Herzmuskels laufend das gleiche Reaktionsgemisch angewandt.

Lösungen. a) $10\text{ cm}^3 \frac{1}{15}$ mol. sekundäres Natriumphosphat.

b) $+12,5\text{ cm}^3$ 0,12%ige wäßrige Lösung von Dimethyl-p-Phenylendiaminchlorhydrat, -base oder -sulfat.

c) $+12,5\text{ cm}^3$ 0,1%ige wäßrige α -Naphthollösung.

p_H der Gesamtlösung = 8,0.

Die einzelnen Flüssigkeitsmengen wurden mit der Pipette abgemessen und kurz vor Durchführung der Färbung gemischt. Das Reaktionsgemisch wurde jeweils nur für wenige Schnitte benutzt.

Herstellung der Lösungen. a) 23,9 g sekundäres Natriumphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 12\text{ H}_2\text{O}$, Mol.-Gew. 358,21) wurden in einem Meßkolben in dest. Wasser gelöst und die Gesamtflüssigkeit mit dest. Wasser auf 1000 cm^3 aufgefüllt.

b) 0,3 g Dimethyl-p-Phenylendiaminchlorhydrat (-sulfat oder -base) „Merck“ [$\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{N}(\text{CH}_3)_2 + 2\text{ HCl}$ (1,4)] wurden in Wasser gelöst und im Meßkolben auf 250 cm^3 mit dest. Wasser aufgefüllt. Die Lösung wurde nur innerhalb der ersten 3 Tage nach dem Ansetzen benutzt und im Dunklen aufbewahrt. Für Vergleichsuntersuchungen an verschiedenen Herzen wurde die Lösung täglich frisch angesetzt.

c) 1,0 g α -Naphthol puriss. pro analysi „Merck“ ($\text{C}_{10}\text{H}_7 \cdot \text{OH}$) wurden mit 96%igem Äthylalkohol gelöst und mit dem gleichen Lösungsmittel im Meßkolben auf 10 cm^3 aufgefüllt. Diese Stammlösung wurde in einer braunen Flasche im Dunklen aufbewahrt. Zur Vermeidung oxydativer Einwirkungen des Luftsauerstoffes wurde der Stopfen der Flasche mit Paraffin überzogen. Von dieser Stammlösung wurde $1,0\text{ cm}^3$ mit der Pipette in einen Meßkolben abgefüllt, die Pipette mit 96%igem Alkohol nachgewaschen und die Lösung mit dest. Wasser auf 100 cm^3 aufgefüllt. Auch diese Lösung wurde nur innerhalb der ersten 3 Tage nach dem Ansetzen benutzt und während dieser Zeit im Dunklen aufbewahrt. Für Vergleichsuntersuchungen an verschiedenen Herzen wurde die Lösung täglich frisch angesetzt.

Die einzelnen Lösungen des Reaktionsgemisches wurden vor Gebrauch jeweils filtriert.

Die Kontrolle der Pufferlösungen und des Nadi-Gemisches auf ihre Wasserstoffionenkonzentration erfolgte mittels elektrometrischer p_H -Bestimmung an der Chinhydronelektrode. Als Vergleichselektrode diente die gesättigte Kaliumchlorid-Calomelektrode. Die p_H -Bestimmung erfolgte nach dem Kompensationsverfahren am Potentiometer nach Dr. THUN (Herstellerrfirma: Ströhlein & Co.). Die Chinhydronelektrode ist im Bereich von $p_H = 0-8$ ohne Schwierigkeiten zu gebrauchen, bei gut gepufferten Lösungen, wie sie in den eigenen Untersuchungen vorlagen, läßt sich der Meßbereich bei schneller Ablesung bis auf $p_H 9$ ausdehnen (KORDATZKI²³).

Für die histochemischen Untersuchungen wurde möglichst frisches Gewebematerial bis zur Untersuchung im Kühlschrank bei -10°C aufbewahrt. Ein Unterschied im Ausfall der Reaktion gegen körperwarm verarbeitetem Gewebe ergab sich bei der angewandten Aufbewahrungsart und -zeit nicht. Das Gewebe wurde sodann auf dem Gefriermikrotom bei einer Schnittdicke von 20μ mit tiefgekühltem Messer geschnitten. Die einzelnen Schnitte kamen sofort vom Mikrotom in die Farblösung und wurden durchschnittlich 20–40 min darin

belassen. Für vergleichende Untersuchungen wurden immer gleiche Färbezeiten eingehalten, die jeweils in den einzelnen Versuchsreihen angegeben werden. Nach der Färbung kamen die Schnitte kurz in physiologische Kochsalzlösung (0,9%ig), wurden auf ein Deckglas aufgezogen, dieses vorsichtig am Rande abgetrocknet und die Schnitte sodann in gesättigte, wäßrige Lösung von Kaliumacetat oder Lävulose eingeschlossen und sofort untersucht. Für bestimmte Untersuchungen und besonders zur Gewinnung von Übersichtsbildern wurden die Gefrierschnitte nach SCHULTZ-BRAUNS²⁴ vom Messer unmittelbar auf den Objektträger übertragen und auf diesem gefärbt. Bei Anstellung der Nadi-Reaktion am formfixierten Material wurden die Gefrierschnitte in der gleichen Weise behandelt, wie Schnitte unfixierten Gewebes.

Entsprechend dem Vorgehen von GRÄFF wurde der makroskopisch sichtbare Ausfall der Reaktion als Ma-Effekt und der mikroskopisch feststellbare als Mi-Effekt bezeichnet.

Die Methode der Färbung mittels Dimethyl-p-Phenylendiaminchlorhydrat galt für alle folgenden Untersuchungen als Standardfärbung, mit welcher die übrigen Indophenolblau-Synthesen am histologischen Gewebsschnitt verglichen wurden. Bei der Durchführung der Versuche zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus der Färbungen wurde aus zeitbedingten Gründen (Beschaffungsschwierigkeiten) meist Dimethyl-p-Phenylendiaminsulfat angewandt, sofern es in den Versuchsprotokollen nicht anders angegeben wurde.

II. Die Indophenolblau-Reaktion nach WINKLER-SCHULTZE.

Das zur Untersuchung kommende Gewebe wurde in 10%igem, neutralem Formol fixiert. Vor dem Schneiden auf dem Gefriermikrotom wurde das durchfixierte Gewebe in fließendem Wasser ausgewaschen.

Lösungen. a) 1,0%ige alkalische α -Naphthollösung,

b) 1,0%ige wäßrige Lösung von Dimethyl-p-Phenylendiaminbase wurden zu gleichen Teilen im Färbeschälchen gemischt. Die Lösung wurde jeweils frisch angesetzt und nur für wenige Schnitte benutzt (Modifikation a).

Herstellung der Lösungen. a) 1,0 g α -Naphthol wurden in einem Erlenmeyerkölbchen in 100 cm³ dest. Wasser erhitzt, bis das Wasser zu kochen begann und die am Boden des Gefäßes liegende Substanz geschmolzen war. Sodann wurde unter leichtem Umschwenken des Kölbchens tropfenweise so viel einer 25%igen Kalilauge (Kaliumhydroxyd p. a., „Merck“) zugesetzt, bis das geschmolzene α -Naphthol vollständig gelöst war. Beim Erkalten fiel unter Umständen wieder etwas Substanz in Kristallen aus. Die überstehende, leicht gelblich gefärbte Flüssigkeit wurde für die Färbung verwendet; sie wurde in brauner, fest verschlossener Flasche im Dunkeln aufbewahrt und nur für die Dauer von 4 Wochen nach Ansetzen benützt.

b) 0,5 g Dimethyl-p-Phenylendiaminbase „Merck“ (in Glasröhrchen eingeschmolzen) wurden bei Zimmertemperatur in 50 cm³ dest. Wasser gelöst. Da die Lösung erst nach 1–2 Tagen ihre volle Färbekraft zeigte, wurde sie nach Alterung von 2 Tagen in Benutzung genommen. Auch diese Farblösung wurde in fest verschlossener, brauner Flasche im Dunkeln aufbewahrt und konnte für die Dauer von 2 Wochen verwendet werden.

Für verschiedene Zwecke wurden zur Färbung die beiden Lösungen getrennt nacheinander angewandt (Modifikation b). Der Färbecerfolg ist bei beiden Arten der Ausführung an sich der gleiche, doch war es auf diese Weise möglich, alkaliempfindliche Substanzen auch während der Färbung durch Zusatz zur Lösung b anzuwenden.

Für einzelne weitere Versuche wurde mit Vorteil an Stelle der konzentrierten Farblösung eine 0,2%ige Lösung von Dimethyl-p-Phenylendiamin in Verbindung mit einer 1,0%igen α -Naphthollösung verwandt (Modifikation c). Diese Lösung wurde nach KATSUNUMA¹² hergestellt unter Verwendung von durch Auskochen sauerstofffrei gemachtem Wasser. Diese Lösung ist unmittelbar nach dem Ansetzen verwendbar, sie hält sich dann allerdings auch nur für 24 Std und muß nach dieser Zeit durch frische Lösungen ersetzt werden. Die Anwendung der Lösung nach KATSUNUMA ergibt gegenüber der Originalmethode klarere Bilder und vermeidet Farbstoffniederschläge und diffuse Färbungen, die mit der Zellreaktion an sich nichts zu tun haben (ROMEIS²⁰).

Um die Färbungen länger haltbar zu machen, wurde die Fixierung derselben nach SCHMORL²⁵ versucht. Hierzu wurden die gefärbten Schnitte in dest. Wasser kurz abgespült und für 5—10 min in gesättigte, wäßrige Lösung von Ammoniummolybdat eingelegt. Aus dieser Lösung wurden sie kurz in Wasser übertragen, auf dem Deckglas aufgezogen und in gesättigter Lävuloselösung eingedeckt. Die spätere Kontrolle dieser Präparate zeigte jedoch ein wenig befriedigendes Ergebnis. Zwar wurde die Haltbarkeit der Färbung für kurze Zeit (bis zu 14 Tagen) verlängert, doch ließ sich weder eine längere Haltbarkeit erreichen noch vermeiden, daß einzelne Schnittpräparate bereits Auskristallisation des Farbstoffes zeigten.

III. Weitere Färbemethoden.

Zu Vergleichsuntersuchungen wurden eine Reihe von weiteren Färbemethoden herangezogen. Bei den gebräuchlichen Routinemethoden (Hämatoxylin-Eosin, Sudan III, Nilblausulfat usw.) kann auf die Beschreibung der Ausführungsart verzichtet werden, da diese nach den Angaben von ROMEIS²⁰ durchgeführt wurden. Spezielle Färbemethoden, soweit sie zur Beurteilung von Einzelfragen angewandt werden mußten, werden in den jeweiligen Versuchsbeschreibungen in ihren Einzelheiten angeführt.

B. Vergleich der Nadi-Reaktionen bei Verwendung von Dimethyl-p-Phenylendiaminchlorhydrat, -sulfat oder der freien Base.

Versuchsordnung. 20 μ dicke Gefrierschnitte vom unfixierten, menschlichen Herzmuskel wurden mit Nadi-Reagens entsprechend der S. 713 angegebenen Methodik gefärbt. Es wurden die Effekte der Färbungen von drei verschiedenen Reagentien miteinander verglichen.

Nadi-Reagens A: enthielt 0,12%ige, wäßrige Lösung von Dimethyl-p-Phenylendiaminchlorhydrat.

Nadi-Reagens B: enthielt statt dessen eine entsprechende Lösung von Dimethyl-p-Phenylendiaminbase.

Nadi-Reagens C: hier war die letztere durch das entsprechende Sulfat ersetzt worden.

Ergebnis. Der Ausfall der Reaktion sowohl hinsichtlich des Ma-Effektes wie des Mi-Effektes war bei gleich langer Färbedauer in allen drei Versuchen übereinstimmend. Die Autoxydation der Farblösungen war ebenso während der gesamten Versuchsdauer in allen Versuchen von gleicher Stärke und Geschwindigkeit, soweit dies nach dem sichtbaren Farbeffekt beurteilt werden konnte. Das Reaktionsgemisch mit Dimethyl-p-Phenylendiaminsulfat besaß zunächst eine mehr blauviolette

Tönung gegenüber der sehr blassen, mehr blauen des Chlorhydrats und der freien Base, hatte sich aber bald in seiner Färbung der Tönung der beiden anderen Reagentien angeglichen.

Bislang wurde, soweit ich das Schrifttum übersehen kann, nur das Chlorhydrat oder notfalls die freie Base zu Untersuchungen mittels der Gewebs-Nadi-Reaktion angegeben, aber sicher wurde das Sulfat bereits häufig gebraucht. Das Chlorhydrat hat dabei gegenüber der freien Base

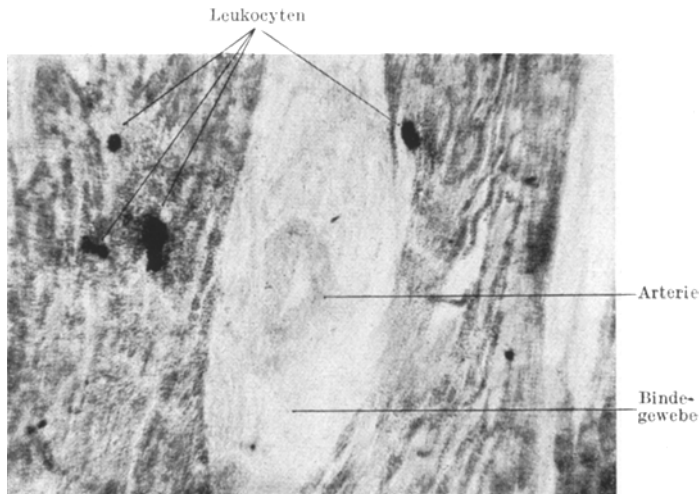


Abb. 1. Gewebs-Nadi-Reaktion am unfixierten Herzmuskel. Leitz-Panphot, Leitz-Objektiv 8 \times , Ocular 4 \times .

den Vorzug der besseren Haltbarkeit in Lösung und Substanz, außerdem ist es weniger hygroskopisch als die Base. Die gleichen Vorteile treffen für das Sulfat zu.

In gleicher Versuchsanordnung wurde auch p-Phenylendiaminbase chem. rein „Riedel-E. de Haen“ geprüft. Es zeigte sich jedoch, daß mit dieser Substanz ein wesentlich schwächerer Färbefeffekt und dieser auch erst nach erheblich verlängerter Färbezeit auftritt. Es wurde davon Abstand genommen, mit p-Phenylendiamin weitere Versuche durchzuführen.

C. Das histologische Bild des gesunden menschlichen Herzmuskels nach Anwendung der Gewebs-Nadi-Reaktion und der Indophenolblau-Reaktion.

I. Gewebs-Nadi-Reaktion.

Schon bei schwacher Vergrößerung fallen im mikroskopischen Präparat vom Herzmuskel als erstes die massiv dunkelblau gefärbten Leukocyten auf (vgl. Abb. 1). Einzelne Granula sind in den meisten

Fällen innerhalb der Leukocyten nicht mehr zu unterscheiden, auch ist der Zellkern sehr häufig von den zusammengeballten Körnchen völlig



Abb. 2. Unfixierter Herzmuskel, Gewebs-Nadi-Reaktion. Leitz-Panphot, Ölimmersion 2,2 mm, Ocular 4 ×.



Abb. 3. Herzmuskel, fixiert in 10%igem, neutralen Formol. Gewebs-Nadi-Reaktion (Färbedauer 40 min). Leitz-Panphot, Leitz-Objektiv 40 ×, Periplan-Ocular 10 ×.

überdeckt. In der unmittelbaren Umgebung der granulierten weißen Blutzellen zeigt das Gewebe oft eine stärkere Gewebs-Nadi-Reaktion als an anderen Stellen des gleichen Präparates. Die Herzmuskelzellen

weisen im diffus mittelblau gefärbten Plasma sehr feine, dunkelblaue Granula auf, welche häufig entsprechend dem Fibrillenverlauf angeordnet sind. Seltener ist eine völlig ungeordnete Lagerung anzutreffen, ebenso selten wurde eine Anordnung entlang der Querstreifung beobachtet, während letztere nach eigenen Beobachtungen im Skelettmuskel vorherrscht. Bei starker Vergrößerung läßt sich trotz der Feinheit der Granula feststellen, daß die einzelnen Körnchen nicht von gleicher

Größe sind (vgl. Abb. 2).

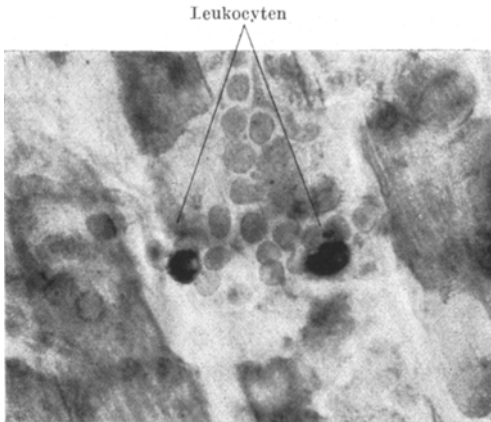


Abb. 4. Herzmuskel, fixiert in 10%igem, neutralen Formalin. Leitz-Panphot, Leitz-Objektiv 40 \times , Periplan-Ocular 10 \times .

Eine bevorzugte Anhäufung der Indophenolblau-Körnchen um den Kern der Muskelzelle konnte nicht beobachtet werden, jedoch war bei dem Vorkommen von Lipofuscin in der Zelle dieses meist mitgefärbt, so daß der Anschein einer Anhäufung von Farbkörnchen in der Umgebung des Zellkernes vorgetäuscht wurde. Auf diese Reaktion des Lipofuscins wird in einer späteren

Mitteilung eingegangen, so daß sich hier eine eingehende Beschreibung erübrigt. Nach Querschnitten zu urteilen, liegen die Farbkörnchen vorwiegend an der Zelloberfläche innerhalb des Sarkoplasmas. Die Kerne der Muskelzellen sind frei von Granula und können daher als helle, farblose Aussparungen auch bei fehlender Gegenfärbung ohne allzu große Schwierigkeiten unterschieden werden.

Endokard und Epikard zeigen nur wenige und unregelmäßig gelagerte Granula, ebenso das interstitielle Bindegewebe. Die Muscularis und das Endothel von Blutgefäßen des Herzens reagierten wenig stärker als das adventitielle Bindegewebe (vgl. Abb. 1).

Bei Anwendung der Gewebs-Nadi-Reaktion am formolfixierten Material kommen mit der üblichen Färbedauer bis zu 40 min nur die Leukocyten innerhalb der Blutgefäße und Capillaren oder auch außerhalb dieser zur Darstellung (Abb. 3). Die Muskelzelle selbst und das übrige Gewebe sind praktisch farblos.

II. Indophenolblau-Reaktion nach WINKLER-SCHULTZE.

Der Ausfall dieser Reaktion innerhalb der üblichen Färbedauer bis zu 40 min am gesunden, in 10%igem neutralen Formol fixierten

menschlichen Herzmuskel entspricht völlig dem der Gewebs-Nadi-Reaktion am gleichen, formolfixierten Material. Auch hier geben ausschließlich die sog. Myelo-Oxydasen in den Leukocyten positive Indophenolblau-Reaktion (Abb. 4). Die Muskelzellen sind völlig frei von Indophenolblau-Körnchen, ebenso Bindegewebe, Endokard, Epikard, sowie Muscularis und Endothel der Blutgefäße. Bei Verlängerung der Färbezeit auf 2 Std werden die Leukocyten-Granula erheblich massiver gefärbt, die Herzmuskelzellen zeigen nun eine diffuse, mittelblaue Färbung, jedoch in diesen untersuchten Schnittpreparaten ohne Auftreten von Indophenolblau-Körnchen. Das übrige Gewebe ist weiterhin ohne jede typische Anfärbung. Tröpfchen von Fett sind wie bei allen Indophenolblau-Synthesen im histologischen Schnitt durch Aufnahme des Farbstoffes violett gefärbt.

D. Der fermentative Anteil an der Gewebs-Nadi-Reaktion des unfixierten Herzmuskels.

Zur Klärung der Natur des oxydationsbeschleunigenden Agens bei der Gewebs-Nadi-Reaktion am Gefrierschnitt vom unfixierten Herzmuskel wurden Versuche unter Anwendung von Fermentgiften und mit gekochtem Gewebe angeschlossen.

I. Gekochtes Gewebe.

Versuchsanordnung. Muskelgewebe vom Herzen (Mensch) wurde kurz in physiologischer Kochsalzlösung gekocht, sodann auf dem Gefriermikrotom geschnitten (Schnittdicke ebenso wie bei den Kontrollschnitten vom gleichen, aber ungekochten Gewebe 20 μ) und die Schnitte sofort vom Mikrotom in frisch angesetztes Nadi-Reagens gebracht.

Ergebnis. Keine Indophenolblau-Körnchen in den Muskelzellen oder den Leukocyten. Frisches, ungekochtes Muskelgewebe gab in den Kontrollschnitten kräftige, positive Reaktion der Muskelzellen und der granulierten weißen Blutzellen. Durch Erhitzen erfolgt demnach Zerstörung des Oxydationskatalysators dieser Zellen.

II. Versuche mit Kaliumcyanid.

Versuchsanordnung. 1. Unfixierter Herzmuskel (Mensch) wurde in üblicher Weise mit unterkühltem Messer auf dem Gefriermikrotom geschnitten, die 20 μ dicken Schnitte sofort in ein Nadi-Reagens übertragen, welchem einige Kristalle Cyankali zugesetzt worden waren. Die Versuche wurden mit Dimethyl-p-Phenylendiaminbase, -sulfat und -chlorhydrat durchgeführt. Kontrollschnitte vom gleichen Gewebe wurden entsprechend in KCN-freiem Nadi-Reagens behandelt.

2. Entsprechende Gefrierschnitte wurden vor der Färbung für die Dauer von 15 min in 1,0%ige Lösung von Cyankali in physiologischer Kochsalzlösung eingelegt und dann in frisch angesetztes Nadi-Reagens übertragen. Die Kontrollschnitte wurden zunächst 15 min in einer reinen physiologischen Kochsalzlösung belassen und nach dieser Zeit in ein Nadi-Reagens übertragen.

3. In einem weiteren Versuchsansatz wurde für 15 min eine 0,5%ige Kaliumcyanidlösung angewandt.

4. Gleiche Gewebsschnitte wurden in ein Nadi-Reagens gebracht, dem Cyankali zugesetzt worden war, so daß eine Endkonzentration desselben im Reaktionsgemisch von $1/1000$ molar erreicht wurde.

5. Weitere Schnittpräparate wurden vor Anstellen der Nadi-Reaktion für die Dauer von 15 min bzw. 1 Std in $1/1000$ mol. KCN-Lösung in physiologischer Kochsalzlösung eingelegt. Kontrollschnitte blieben die gleichen Zeiten in reiner physiologischer Kochsalzlösung.

Ergebnis. Dieses ist bei allen Versuchsansätzen das gleiche. Cyankali hemmt völlig die Gewebs-Nadi-Reaktion. Aber auch die Reaktion der sog. Myelo-Oxydasen geht unter der Behandlung mit dem Cyanradikal vollkommen verloren. Die Kontrollschnitte gaben hinsichtlich der Gewebs- und Myelo-Oxydasen mittlere bis kräftige Reaktion.

III. Versuche mit Ammoniumsulfocyanid ($NH_4 \cdot CNS$).

Versuchsanordnung. 1. 20 μ dicke Gefrierschnitte vom unfixierten menschlichen Leichenherzen wurden in ein Nadi-Reagens gebracht, dem Ammoniumsulfocyanid derart zugesetzt war, daß eine Endkonzentration von 1,0% erreicht wurde.

2. Vom gleichen Gewebe wurden ebenso sofort nach dem Schneiden Gefrierschnitte in Nadi-Reagens mit 0,5% Ammoniumsulfocyanid eingelegt.

3. Gewebsschnitte vom selben Material kamen vor Anstellen der Färbung für die Dauer von 15 bzw. 60 min in eine 1,0%ige wäßrige Lösung von Ammoniumsulfocyanid. Kontrollschnitte blieben dieselben Zeiten in physiologischer Kochsalzlösung und wurden dann in das gleiche Nadi-Reagens übertragen.

4. In einer entsprechenden Versuchsreihe wurden die Schnittpräparate mit einer 0,5%igen Ammoniumsulfocyanidlösung vorbehandelt.

Ergebnis. Die Vorbehandlung mit einer 0,5%igen Ammoniumsulfocyanidlösung beeinflusste die Reaktion nicht. Die Schnitte unterschieden sich von den Kontrollen weder in der Farbtiefe, noch in der Reaktionsart. Bei Vorbehandlung mit einer 1,0%igen Lösung schien bei einer Färbezeit von 20 min makroskopisch eine geringgradig schwächere Farbtiefe in den Versuchsschnitten gegenüber den Kontrollpräparaten vorhanden zu sein, bei mikroskopischer Beobachtung konnte jedoch kein Unterschied festgestellt werden. Nach einer Färbedauer von 40 min. war eine Differenz der Farbtiefe weder makroskopisch noch mikroskopisch zu sehen. Wurde das Ammoniumsulfocyanid dem Nadi-Reagens selbst zugesetzt, so ergab sich bei den beiden angewandten Konzentrationen eine sehr deutliche Abschwächung der Reaktion, jedoch wurde diese nicht vollkommen gehemmt. Die Hemmung in diesen Versuchen betraf in gleicher Weise die Indophenolblau-Synthese der Herzmuskelzellen und der Leukocyten.

IV. Versuche mit Kohlenmonoxyd (CO).

Versuchsanordnung. 1. Unfixiertes Gewebe vom menschlichen Herzmuskel wurde in üblicher Weise auf dem Gefriermikrotom geschnitten und die Schnitt-

präparate sofort in Nadi-Reagens übertragen, in welches unmittelbar vorher für die Dauer von etwa 1 min kohlenoxydhaltiges Leuchtgas eingeleitet worden war. Die Reaktion wurde im Dunklen durchgeführt, um einen photochemischen Zerfall der zu erwartenden Verbindung des CO mit dem Oxydationskatalysator zu verhindern. Kontrollen wurden im Hellen mit ebensolchem Nadi-Reagens durchgeführt, außerdem wurden selbstverständlich für beide Reihen entsprechende Leerversuche ohne CO-Zusatz angesetzt.

2. Vom gleichen Gewebe wurden 20 μ dicke Schnitte in physiologischer Kochsalzlösung 15 min lang mit Leuchtgas behandelt und danach in Nadi-Reagens

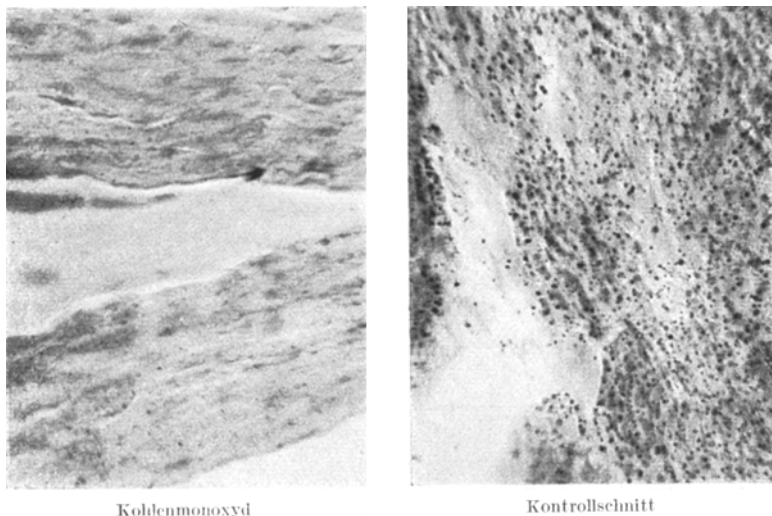


Abb. 5. Mäuseherz, Gewebs-Nadi-Reaktion mit und ohne Zusatz von Kohlenmonoxyd. Leitz-Panphot, Ölimmersion 1,8 mm, Ocular 4 \times .

übertragen. Ebenfalls von dieser Reihe wurden „Hell“- und „Dunkel“-Versuche angesetzt. Die Kontrollpräparate blieben die gleiche Zeit von 15 min vor der Färbung in physiologischer Natriumchloridlösung.

Ergebnis. 1. Ausfall der Reaktion sehr verlangsamt. Mikroskopisch erst nach übermäßig langer Färbezeit vereinzelt Indophenolblau-Körnchen sichtbar, obwohl nach dieser Zeit die Reaktionslösung durch Autoxydation bereits stark blau gefärbt war und in Kontrollschnitten reichlich Farbgranula gefunden wurden. Die diffuse Blaufärbung des Zellplasmas der Herzmuskulatur war fast ebenso kräftig, wie in den Kontrollpräparaten ohne Kohlenmonoxyd. Ein deutlicher Unterschied zwischen belichteten und unbelichteten Proben konnte nicht festgestellt werden. Bei Versuchen mit Mäuseherzen ergab sich ein gleiches Bild (vgl. Abb. 5).

2. In den Versuchen mit CO-Vorbehandlung war die Abschwächung der Reaktion gegenüber den Kontrollpräparaten nicht so deutlich wie in der vorhergehenden Versuchsreihe, jedoch sicher feststellbar. Auch

hier war ein Unterschied zwischen dem Ausfall der im Tageslicht und im Dunklen durchgeführten Reaktionen nicht sicher zu beobachten.

V. Einwirkung von Schwefelwasserstoff (H_2S).

Versuchsanordnung. 20 μ dicke Gefrierschnitte vom unfixierten, frischen Mäuseherzen wurden sofort nach dem Schneiden für 10 min in mit Schwefelwasserstoff gesättigte physiologische Kochsalzlösung eingebracht und sodann in frisch angesetztes Nadi-Reagens übertragen. Die Kontrollschnitte blieben vor der Färbung 10 min in physiologischer Kochsalzlösung.

Ergebnis. In den mit Schwefelwasserstoff vorbehandelten Schnittpräparaten blieb die Indophenolblau-Synthese gänzlich aus, obwohl in den Kontrollen innerhalb der Muskelzellen reichlich Indophenolblau-Körnchen zu sehen und vereinzelt gut gefärbte Leukoeyten zu finden waren.

VI. Der Einfluß von 8-Oxychinolin (NC_9H_6OH) auf die Gewebs-Nadi-Reaktion.

Versuchsanordnung. 1. Gewebsschnitte vom unfixierten menschlichen Leichenherzen wurden in ein Nadi-Reagens gebracht, dem bis zur Sättigung 8-Oxychinolin (Oxin) zugesetzt worden war.

2. Entsprechende Gefrierschnitte wurden für 15 bzw. 60 min in eine gesättigte wäßrige Lösung von Oxin gebracht und nach diesen Zeiten in jeweils frisch angesetztes Nadi-Reagens übertragen. Die Vergleichsschnitte blieben die gleichen Zeiten vor der Färbung in physiologischer Kochsalzlösung.

3. Gleiche Schnittpräparate wurden für 15 bzw. 60 min in $\frac{1}{40}$ mol. Lösung von 8-Oxychinolin (3,6270 g Oxychinolin p. a. „Merk“ mit 250 cm³ $\frac{1}{10}$ n HCl gelöst und mit dest. Wasser zu 1 Liter aufgefüllt. p_H der Lösung 3,4. Dieser Oxin-Lösung wurden zur Herstellung der Isotonie 9,0 g Natriumchlorid zugesetzt.) eingelegt. Ein Teil der Vergleichsschnitte wurde gleiche Zeiten in eine entsprechende Lösung ohne Oxin (250 cm³ $\frac{1}{10}$ n HCl mit dest. Wasser zu 1000 cm³ aufgefüllt, Zusatz von 9,0 g NaCl) eingebracht, ein anderer Teil wurde in reiner physiologischer Kochsalzlösung belassen. Nach dieser Vorbehandlung kamen die einzelnen Schnittpräparate in jeweils frisch angesetztes Nadi-Reagens.

4. Entsprechende Gewebsschnitte wurden in ein Nadi-Reagens gebracht, welches $\frac{1}{1000}$ Mol 8-Oxychinolin enthielt.

5. In einer weiteren Reihe wurden die Gefrierschnitte 15 bzw. 60 min mit einer isotonischen $\frac{1}{1000}$ mol. Oxinlösung vorbehandelt. Die Kontrollschnitte blieben gleiche Zeiten in physiologischer Kochsalzlösung.

Ergebnis. 1. Die mit 8-Oxychinolin behandelten Schnittpräparate zeigten deutliche Hemmung der Myelo- und Gewebs-Oxydase, welche sich in gleicher Stärke in den 20 oder 40 min lang gefärbten Schnitten bemerkbar machte.

2. Eine Vorbehandlung der Gefrierschnitte mit gesättigter, wäßriger Oxinlösung zeigte nach 15 min Dauer keine Beeinflussung der Reaktion, doch wurde nach Istündiger Vorbehandlung in den 20 min lang gefärbten Schnittpräparaten eine geringfügige Abschwächung gefunden, welche aber nach einer Färbedauer von 40 min nicht mehr festgestellt werden konnte.

3. Wurden die Gewebsschnitte mit $\frac{1}{40}$ Mol 8-Oxychinolin in salzsaurer Lösung vorbehandelt, so war gegenüber den mit entsprechend saurer Vergleichslösung behandelten Schnitten keine Abschwächung der Reaktion zu sehen. Allerdings setzten beide sauer reagierenden Flüssigkeiten die Stärke der Indophenolblau-Synthese so erheblich herab, daß erst nach einer Färbezeit von 85 min eine Farbtiefe erreicht wurde, wie sie bereits nach 20 min in den Kontrollen mit Vorbehandlung durch physiologische Kochsalzlösung erreicht wurde.

4. Nach 20 min Färbedauer war der makroskopische Färbefeffekt („Ma-Effekt“) an den mit Oxychinolin behandelten Schnittpräparaten geringfügig schwächer als an den Kontrollen. Bei der mikroskopischen Betrachtung konnte diese Differenz kaum mehr festgestellt werden. In den Versuchsschnitten waren gegenüber den Kontrollen in den Muskelzellen etwas weniger Granula vorhanden, dagegen war die diffuse Blaufärbung der Muskelfasern geringfügig kräftiger. Nach 40 min Färbedauer war die gleiche Differenz in der Farbintensität zwischen Versuchsschnitten und Kontrollpräparaten festzustellen. In gleicher Weise war auch die Leukocytenfärbung unter Einwirkung von Oxin schwächer, jedoch war der Unterschied sehr gering.

5. Vorbehandlung der Schnitte mit $\frac{1}{1000}$ Mol Oxychinolin war ohne Einfluß auf den Ausfall der Gewebs-Nadi-Reaktion.

VII. Versuche mit arseniger Säure ($As_2O_3 + 3 H_2O = 2 H_3AsO_3$).

Versuchsanordnung. 1. 20μ dicke Gefrierschnitte vom unfixierten, menschlichen Leichenherzen wurden mit einem Nadi-Reagens gefärbt, dem bis zur Sättigung Arsenigsäureanhydrid (As_2O_3) zugesetzt worden war.

2. Gewebsschnitte vom gleichen Material kamen vor der Färbung für 15 bzw. 60 min in eine physiologische Kochsalzlösung, welcher As_2O_3 bis zur Sättigung zugesetzt worden war. Infolge der geringen Löslichkeit der arsenigen Säure war deren Konzentration in den Reaktionsansätzen geringer als $\frac{1}{1000}$ mol. Kontrollschnitte blieben entsprechende Versuchszeiten in reiner physiologischer Kochsalzlösung und wurden dann in üblicher Weise gefärbt.

Ergebnisse. 1. Zusatz von As_2O_3 zur Farblösung war nach einer Färbezeit von 20 min in einem Teil der Gewebsschnitte ohne sichtbaren Effekt auf den Ausfall der Reaktion, bei den restlichen Schnitten war eine zwar geringe, aber deutliche Verstärkung des Färbefeffektes gegenüber den Kontrollen festzustellen. Nach einer Färbezeit von 40 min konnte in den mit arseniger Säure behandelten Schnittpräparaten eine geringgradige Abschwächung der Färbung beobachtet werden.

2. 15 min lange Vorbehandlung der Gefrierschnitte mit arseniger Säure änderte den Ausfall der Reaktion gegenüber den Kontrollen nicht, während jedoch einstündige Vorbehandlung die Gewebs-Nadi-Reaktion in den Muskelzellen und den Leukocyten völlig verhinderte.

Schlußfolgerungen.

Da der Katalysator der Gewebs-Nadi-Reaktion durch Erhitzen unwirksam wird, ist allein schon aus diesem Versuch seine fermentative Natur wahrscheinlich. Die Versuche mit Schwefelwasserstoff geben zusammen mit den Cyan- und Kohlenoxydversuchen einen Hinweis dafür, daß die sauerstoffübertragende Substanz als wirksamen Faktor ein Schwermetall und zwar Eisen enthält. Im Gewebe könnten außer derartigen eisenhaltigen Fermenten noch oxydierende Redoxsysteme wie unter anderem Cystein-Cystin in Frage kommen. Diese Systeme sind jedoch in reiner Form nicht autoxydabel und nicht durch Cyan hemmbar, sondern beides erst in Verbindung mit geringen Schwermetallspuren (O. WARBURG¹⁴). Aus mehreren Gründen jedoch ist für die Gewebs-Nadi-Reaktion ein derartiges Oxydationssystem nicht anzunehmen. Erhitzen des Gewebes könnte in diesem Fall keinen Einfluß auf den Reaktionsausfall haben, außerdem müßten dann die zur Oxydation des Cysteins erforderlichen Schwermetallspuren durch geringe Konzentrationen an Oxin *völlig* unwirksam werden, da dieses mit den meisten Metallionen (Mg, Cu, Fe, Mn, Zn) recht beständige Komplexsalze bildet. Die angestellten Versuche zeigten demgegenüber nur teilweise eine geringe Hemmung durch 8-Oxychinolin. Diese geringfügige Hemmung wurde auch nur dann gefunden, wenn das Oxin der Farblösung selbst zugesetzt wurde, oder die Gewebsschnitte längere Zeit (60 min) mit einer konzentrierteren Lösung vorbehandelt worden waren, während vorherige Behandlung der Schnittpräparate mit $1/1000$ Mol Oxychinolin ohne Einfluß auf den Reaktionsausfall blieb. Der erzeugte Hemmungseffekt muß aller Wahrscheinlichkeit nach auf Adsorption des Oxins an den Zelloberflächen zurückgeführt werden. Das 8-Oxychinolin kann in wäßriger Lösung gewissermaßen als amphoterer Adsorbendum wirken, da es einerseits infolge des im Molekül vorhandenen Stickstoffs basischen Charakter besitzt und andererseits auf Grund seiner phenolischen Hydroxylgruppe sauer reagieren kann (VOGT²⁶). Im Häminkomplex gebundenes Eisen wird vom 8-Oxychinolin nicht angegriffen. Dies kann aus Versuchen geschlossen werden, welche von LETTRÉ²⁷ an Gewebekulturen durchgeführt wurden. Die nach Zusatz von $1/1000$ Mol Oxin zu beobachtende Wachstumshemmung von Hühnerherzfibroblasten-Kulturen wurde durch Manganspuren wieder aufgehoben. Die Hemmung beruhte demnach auf Ausfällung freier, nicht organisch gebundener Ionen, während Oxin in diesem Versuch den Fermenteisenkomplex des Häm bzw. Hämin in den Atemfermenten nicht beeinflußt hatte. Die Sulfocyanidversuche besagen ebenfalls, daß es sich bei dem katalytisch wirkenden Eisen um organisch gebundenes Metall handeln muß. Falls freie Eisenionen vorhanden wären und wirksam sein würden, müßten diese bei den angewandten Sulfocyanidkonzentrationen

katalytisch unwirksame Komplexsalze mit dem Sulfocyanid bilden. Die partielle Hemmung der Reaktion bei Zusatz von Sulfocyanid zur Farblösung beruht auch hier wohl auf Oberflächenadsorption. Die Hemmung der Nadi-Reaktion durch Kohlenoxyd beweist, daß der Oxydationskatalysator in der Reihe der Zellhämine zu suchen ist. CO bindet sich dabei nur an zweiwertiges Häm-Eisen (Fe^{++}), während Cyan mit dem dreiwertigen Hämin-Eisen (Fe^{+++}) reagiert. Mit den beobachteten Versuchsergebnissen (Hemmung der Reaktion durch Vorbehandlung der Schnittpräparate mit Cyan, Kohlenoxyd und Schwefelwasserstoff; keine Hemmung durch entsprechende vorherige Anwendung von Sulfocyanid und 8-Oxychinolin, wobei störende Adsorptionseffekte ausgeschlossen werden müssen) ergibt sich ein derartige Parallelität der Eigenschaften des oxydationsbeschleunigenden Agens mit denjenigen des „sauerstoffübertragenden Fermentes“ (O. WARBURG¹⁴), daß kein Zweifel über die Identität beider bestehen kann. Auch die Versuche mit arseniger Säure unterstützen diese Schlußfolgerung, denn obwohl H_3AsO_3 nur schwach adsorbiert wird, hemmt sie ähnlich wie Blausäure, Schwefelwasserstoff und Kohlenoxyd in kleinen Konzentrationen die Zellatmung (DRESEL²⁸). Abweichend vom Cyan, H_2S und CO dringt die arsenige Säure nur sehr langsam in lebende und überlebende Zellen ein, infolgedessen tritt die Atmungshemmung allmählich auf und ist in ihrer Stärke von dem Zustand der Zellgrenzflächen und dem äußeren Milieu abhängig (DRESEL). Der verzögerte Eintritt der Hemmung geht aus den eigenen Versuchen einwandfrei hervor. Die in einzelnen Ansätzen beobachtete anfängliche Reaktionsbeschleunigung entspricht der in der Biochemie bekannten Atmungssteigerung von Zellen durch sehr kleine Gaben von arseniger Säure.

Das als oxydationsbeschleunigendes Agens bei der Gewebs-Nadi-Reaktion wirkende „sauerstoffübertragende Ferment“ gehört zum WARBURG-KEILIN-System der zelleigenen Atemfermente. Von den Enzymen dieses Systems geht den Cytochromen die Fähigkeit ob, unmittelbar mit dem molekularen Sauerstoff (O_2) in Verbindung zu treten, auch reagieren diese nicht mit Kohlenmonoxyd. Diese Funktion kommt allein dem sauerstoffübertragenden Ferment WARBURGS (von KEILIN¹⁶ später „Cytochromoxydase“ genannt) zu. Somit ergibt sich für die Gewebs-Nadi-Reaktion am gesunden Herzmuskel das bekannte Bild des KEILIN-WARBURG-Systems der Atemfermente des Gewebes:

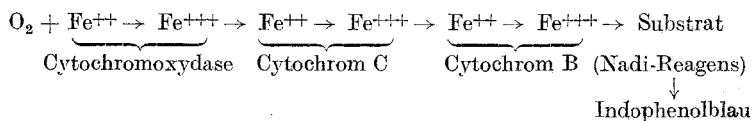


Abb. 6. Reaktionsschema der Gewebs-Nadi-Reaktion.

Die Reihenfolge in diesem Schema wurde entsprechend den biochemischen Untersuchungen von STOTZ und Mitarbeitern¹⁷ und von BALL²⁹ gewählt, nach denen nur Cytochrom B und C bei der fermentativen Indophenolblau-Synthese mitwirken und die Reihenfolge der Oxydation (Elektronenaustausch) wahrscheinlich über C zu B geht und dann erst von letzterem das Substrat oxydiert wird.

E. Der fermentative Wirkungsmechanismus der Gewebs-Nadi-Reaktion am fixierten Gewebe.

Wird die Gewebs-Nadi-Reaktion nicht am frischen, sondern am formolfixierten Material zur Anwendung gebracht, so ergibt sich ein Bild etwa wie der Ausfall der Reaktion nach WINKLER-SCHULTZE. Am Herzmuskelgewebe werden bei der üblichen Färbedauer ausschließlich die in den Capillaren und Blutgefäßen oder auch außerhalb dieser befindlichen granulierten Leukocyten zur Darstellung gebracht, während die Färbung der Muskelzellen gänzlich ausbleibt (vgl. Abb. 3, S. 717). Seit den Untersuchungen von HALLHEIMER²¹ wird allgemein angenommen, es handle sich bei der Oxydase der Leukocyten („Myelo-Oxydase“ nach GRÄFF) um einen Oxydationskatalysator anderer Art als bei der Oxydase der Gewebe („Gewebs-Oxydase“). Nicht nur ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber der Formolfixierung, sondern auch die angebliche Unbeeinflussbarkeit durch Fermentgifte, wie z. B. Cyan, soll die Myelo-Oxydase von der Gewebs-Oxydase unterscheiden.

Bei den im vorigen Abschnitt durchgeführten Untersuchungen am frischen Gewebe war aufgefallen, daß sich die Myelo-Oxydase in den einzelnen Versuchsreihen nicht anders verhielt als die Oxydase der Muskelzellen. Da dieser Befund im Widerspruch steht zu den Untersuchungen von HALLHEIMER, wurden weitere Versuche an fixiertem Gewebe durchgeführt, um die Frage zu klären, ob es sich tatsächlich bei den nach Formolfixierung erhaltenen Oxydasen um grundsätzlich andere, katalytisch wirkende Substanzen handle, wie bei der Gewebs-Nadi-Reaktion an frischem Gewebe.

Versuchsanordnung. Die einzelnen Versuchsreihen wurden hier völlig entsprechend denen des Abschnittes D (S. 719ff.) durchgeführt. An Stelle des frischen Gewebes wurde jedoch Herzmuskelgewebe vom menschlichen Leichenherzen angewandt, welches in 10%igem, wäßrigem, neutralem Formol fixiert worden war. Die Fixierungszeit betrug bei den angewandten, etwa 1 cm³ großen Gewebsstücken 24–48 Std. Das Gewebe wurde auf dem Gefriermikrotom bei einer Schnittdicke von 20 μ geschnitten und diese Schnittpräparate zum Anstellen der verschiedenen Reaktionen verwandt. Infolge der Gleichheit der Versuchsanordnungen dieser Versuche und der des vorigen Abschnittes kann auf eine eingehende Darstellung derselben an dieser Stelle verzichtet werden.

Ergebnisse.

I. Gekochtes Gewebe.

Vollkommenes Fehlen von Indophenolblau-Granula im gekochten Gewebsschnitt, während im gleichen, formolfixierten, jedoch ungekochten Gewebe reichlich gut gefärbte Leukocyten festzustellen waren.

II. Versuche mit Kaliumcyanid (KCN).

Vorbehandlung der Schnitte mit 0,5 und 1,0%iger Cyankalilösung sowie Zusatz von Cyankali zum Nadi-Reagens löschte sofort die oxydative Fähigkeit der Leukocyten gegenüber dem Nadi-Reagens aus. In den eigenen Versuchen konnte gelegentlich nach sehr langen Färbezeiten trotz vorheriger Cyanbehandlung doch noch eine schwache Darstellung der Leukocytengranula erreicht werden. Wie im Schrifttum mehrfach beschrieben, beruht dieser Effekt auf der Verflüchtigung der hemmenden Blausäure aus den Schnittpräparaten. In weiteren Versuchen konnte auch an alkoholfixiertem Gewebe die Gewebs-Nadi-Reaktion der Leukocyten durch Cyan vollkommen gehemmt werden.

III. Versuche mit Ammoniumsulfocyanid ($\text{NH}_4 \cdot \text{CNS}$).

Vorbehandlung der Gewebsschnitte mit 0,5 und 1,0%iger wäßriger Lösung von Ammoniumsulfocyanid für die Dauer von 15 bzw. 60 min war ohne Einfluß auf den Ausfall der Reaktion. Wurde dem Nadi-Reagens das Sulfocyanid unmittelbar zugesetzt, so ergab sich bei 1,0% $\text{NH}_4 \cdot \text{CNS}$ eine erhebliche Hemmung der Reaktion, die auch noch bei Zusatz von 0,1% Ammoniumsulfocyanid deutlich feststellbar war.

IV. Versuche mit Kohlenmonoxyd (CO).

Wurde die Farblösung selbst für 1 min mit CO-haltigem Leuchtgas behandelt, so zeigte sich bei anschließender Färbung von Gefrierschnitten des formolfixierten Gewebes nach 20 min Färbedauer eine deutliche Abschwächung der Farbreaktion, obwohl die Farblösung selbst bereits nach dieser Zeit durch Luftoxydation mittelblau gefärbt war. Nach einer Färbezeit von 40 min war ein abschwächender Effekt nicht mehr feststellbar. Wurden die Schnitte vor Anstellen der Färbung für 15 bzw. 60 min mit CO-haltigem Leuchtgas behandelt, so war nach einer Färbezeit von 20 min in den behandelten Schnittpräparaten die Färbung eben noch merklich abgeschwächt. Nach 40 min Färbezeit war ein Unterschied zu den Kontrollen nicht mehr festzustellen. Da bereits in der Versuchsreihe D zwischen belichteten und unbelichteten Reaktionsansätzen kein deutlicher Unterschied festgestellt wurde, verzichtete ich darauf, in dieser Versuchsserie Untersuchungen mit belichteten Proben anzustellen.

V. *Einwirkung von Schwefelwasserstoff (H_2S).*

Vorbehandlung der Schnitte für die Dauer von 10 min mit Schwefelwasserstoffwasser führte zum völligen Ausbleiben einer Oxydase-Darstellung in den Leukocyten.

VI. *Der Einfluß von 8-Oxychinolin (NC_9H_6OH).*

Gefrierschnitte vom formolfixierten Gewebe zeigten nach Färbung mit Nadi-Reagens, welches mit 8-Oxychinolin gesättigt war, nach 20 min Färbezeit keinen Unterschied zu den Kontrollschnitten. Nach 40 min Färbezeit war vielleicht eine sehr geringe Abschwächung in den mit Oxin behandelten Schnittpräparaten festzustellen. Vorbehandlung der Schnitte für 15 bzw. 60 min mit gesättigter, wäßriger Oxinlösung oder einer $\frac{1}{40}$ molaren Lösung war ohne Einfluß auf den Reaktionsausfall.

VII. *Versuche mit arseniger Säure (H_3AsO_3).*

Zusatz von Arsenigsäureanhydrid zur Farblösung war nach einer Färbezeit von 20 min ohne sichtbaren Einfluß, nach 40 min war dagegen ein sehr geringer, abschwächender Effekt festzustellen. Vorbehandlung der Gefrierschnitte vom fixierten Gewebe für die Dauer von 15 bzw. 60 min mit H_3AsO_3 änderte den Ausfall der Reaktion gegenüber den Kontrollschnitten nicht. Verlängerung der Einwirkungsdauer des H_3AsO_3 führte zu einer deutlichen Verstärkung der Reaktion in den behandelten Schnitten.

Schlußfolgerungen.

Ebenso wie am unfixierten Gewebe wird die Darstellung der Leukocyten-Oxydase durch die Gewebs-Nadi-Reaktion am formolfixierten Gewebe des Herzens durch Kochen der Probestücke, Cyan- oder Schwefelwasserstoff-Vorbehandlung der Schnitte oder Cyanzusatz zur Farblösung vollkommen gehemmt. Auch in den Versuchen mit Kohlenmonoxyd ergab sich in gleicher Weise eine deutliche Hemmung der Myelo-Oxydase am fixierten und unfixierten Präparat. Sulfocyanid und 8-Oxychinolin waren ohne Einfluß, sofern durch die Versuchsanordnung eine Hemmung infolge Adsorption weitgehend ausgeschlossen werden konnte. Unterschiede zu den Untersuchungen am unfixierten Gewebe ergaben sich jedoch in den Versuchen mit arseniger Säure. Zwar konnte bei Zusatz derselben zur Farblösung eine schwache Hemmung festgestellt werden, doch war Vorbehandlung der Schnittpräparate ohne hemmenden Einfluß, sondern es wurde im Gegenteil sogar noch nach 4stündiger Vorbehandlung eine deutliche Aktivierung der Myelo-Oxydase im fixierten Gewebe beobachtet. Da bereits am frischen Gewebe die arsenige Säure nur sehr langsam in die Zellen diffundiert, kann mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden,

daß durch die Fixierung des Gewebes und der damit verbundenen Eiweißausfällung die Diffusion für die arsenige Säure derart erschwert wird, daß eine hemmende Konzentration der H_3AsO_3 am Ort der Reaktion nur schwer erreicht werden kann.

In Übereinstimmung mit den Erörterungen im Anschluß an die Versuche mit unfixiertem Herzmuskel muß auf Grund obiger Versuche auch hier der Oxydationskatalysator der Gewebs-Nadi-Reaktion am fixierten Gewebe mit dem WARBURG-KEILIN-System der Atemfermente der Zelle identifiziert werden. Damit wird die bisher im Schrifttum vertretene Ansicht (HALLHEIMER) hinfällig, es handle sich bei der Gewebs-Oxydase des Herzmuskels und der Myelo-Oxydase der Leukocyten um zwei grundsätzlich verschiedene Fermente oder Oxydationssysteme. Diese Ansicht wurde aus der angeblich verschiedenen Reaktion beider gegenüber Formalin und Cyan abgeleitet. Daß dies für Cyan nicht zutrifft, wurde bereits gezeigt. Worauf HALLHEIMERS vergebliche Hemmungsversuche mit Cyan zurückgeführt werden müssen, ist unklar. Allerdings liegt die Vorstellung nahe, daß HALLHEIMER ein derart unwirksames Cyankalipräparat (Umwandlung desselben durch C_2O der Luft in Kaliumcarbonat unter Blausäureabspaltung!) in seinen Versuchen anwandte, daß nur die im Vergleich zur Leukocyten-Oxydase geringer wirksame Herzmuskel-Oxydase gehemmt wurde. Auch die grundsätzlich verschiedene Reaktion beider Oxydasen gegenüber der Formalinfixierung trifft nicht unbedingt zu. Zwar verhindert bei Anwendung der üblichen Färbezeit die Formolfixierung die Reaktion der Gewebs-Oxydase des Herzmuskels praktisch vollkommen, jedoch wird bei gleicher Färbezeit auch die Reaktion der Myelo-Oxydase gegenüber der Färbung am unfixierten Gewebe erheblich abgeschwächt (vgl. Abb. 1—3, S. 716). Die Abschwächung bzw. Verhinderung der Gewebs-Nadi-Reaktion durch die Fixierung beruht sicher zum Teil wenigstens auf der Erschwerung der Diffusion der Farbstoffe in das Gewebe infolge der durch die Fixierung bedingten Eiweißausfällung. Ob zusätzlich noch unmittelbare Hemmung der Oxydase durch Formalin eine Rolle spielt, kann durch die bisherigen Versuche nicht entschieden werden. Falls jedoch der hauptsächliche Teil der angeblichen Formalinhemmung auf eiweißkoagulierende Wirkung der Fixierung beruht, so müßte sich durch entsprechende Verlängerung der Färbezeiten voraussichtlich auch eine Darstellung der Gewebs-Oxydase am fixierten Herzmuskel erreichen lassen.

F. Versuche zur Darstellung der Gewebs-Oxydase am fixierten Herzmuskel.

1. *Versuchsordnung.* 20 μ dicke Gefrierschnitte vom Herzmuskelgewebe einer menschlichen Leiche, welches 48 Std mit 10%igem, neutralen Formalin fixiert worden war, wurden verschieden lange Zeiten (bis zu 4 Std) mit Nadi-Reagens gefärbt. Als Vergleichsschnitte wurden entsprechende Gefrierschnitte

gleiche Zeiten in ein Nadi-Reagens gebracht, dem einige Kristalle Cyankali zugesetzt worden waren. Weitere Kontrollschnitte wurden vor der Färbung 30 min mit Schwefelwasserstoffwasser behandelt.

Ergebnis. Nach einer Färbezeit von 40 min zeigten die Schnitte in typischer Weise innerhalb der Leukocyten blaue Indophenol-Granula, die Muskelzellen waren noch frei davon. In den Schnitten der Cyan- und Schwefelwasserstoffserie fehlte die blaue Granulierung der Leukocyten. Nach 1 Std war die Anfärbung der oxydasepositiven weißen Blutzellen stärker, auch zeigten die Muskelzellen vereinzelt blauschwarze Farbkörnchen in typischer Lagerung. Die Cyanschnitte waren auch weiterhin frei von jeder Indophenolblau-Körnclung, während die mit Schwefelwasserstoff vorbehandelten Gefrierschnitte jetzt schwache Granulabildung in den Leukocyten aufwiesen. Nach einer Färbedauer von 3 Std war die Anfärbung der Leukocyten derart, daß einzelne Granula nicht mehr unterschieden werden konnten. Die Muskelzellen zeigten auf teils ungefärbtem, teils schwach graublauem Untergrund feinste dunkelblaue Farbkörnchen, die sich in ihrer Lagerung innerhalb der Muskelzelle nicht von den Indophenolblau-Körnchen der Färbung des unfixierten Gewebes unterschieden. Auch nach dieser Färbezeit blieben die Cyanschnitte frei von Farbkörnchen, während die mit Schwefelwasserstoff behandelten Schnittpräparate eine sehr deutliche Abschwächung der Reaktion der Leukocyten und Muskelzellen zeigten. Nach 4stündiger Färbung war, abgesehen von einer Verstärkung der Färbung in den Versuchspräparaten, der Ausfall der Reaktion in den drei verschiedenen Serien nicht weiter verändert.

2. *Versuchsanordnung.* Entsprechendes Herzmuskelgewebe von der Leiche wurde etwa 48 Std in 2½%iger Trichloressigsäure bzw. 96%igem Äthylalkohol fixiert, sodann für 48 Std in fließendem Wasser ausgewaschen und anschließend daran auf dem Gefriermikrotom geschnitten. Die 20 µ dicken Schnitte kamen zum Teil in eine frisch angesetzte Nadi-Lösung ohne Zusatz, zum anderen Teil in ein Nadi-Reagens, dem einige Kristalle Kaliumcyanid zugesetzt worden waren. Sämtliche Gewebsschnitte wurden vor Anstellen der Färbung für 24 Std in dest. Wasser eingelegt, um Reste des Fixierungsmittels zu entfernen und um gleichzeitig durch Quellung des Gewebes eine schnellere Diffusion des Reaktionsgemisches zu erreichen. Vergleichsschnitte formalinfixierten Materials wurden in gleicher Weise behandelt.

Ergebnis. Qualitativ war der Ausfall der Reaktion der Gewebs-Oxydase ebenso wie bei der Formalinfixierung, jedoch war der mit gleichen Färbezeiten erreichte Effekt in formolfixiertem Gewebe am kräftigsten; in 96%igem Alkohol fixiertes Herzmuskelgewebe zeigte die schwächste Reaktion. Die Myelo-Oxydase der Granulocyten wurde in diesen Versuchsschnitten bei Alkoholfixierung überhaupt nicht und nach 2½%iger Trichloressigsäure nur sehr schwach angefärbt, obwohl im gleichen, formolfixierten Gewebe reichlich Leukocyten zur Darstellung gebracht werden konnten. In Schnittpräparaten von anderen,

in 2½%iger Trichloressigsäure fixierten Herzen war dagegen die Leukocytengranula nach der Gewebs-Nadi-Reaktion sehr kräftig gefärbt.

Wurden die Gefrierschnitte nach dem Schneiden nicht mit dest. Wasser behandelt, so ergab sich gegenüber den gewässerten Schnitten

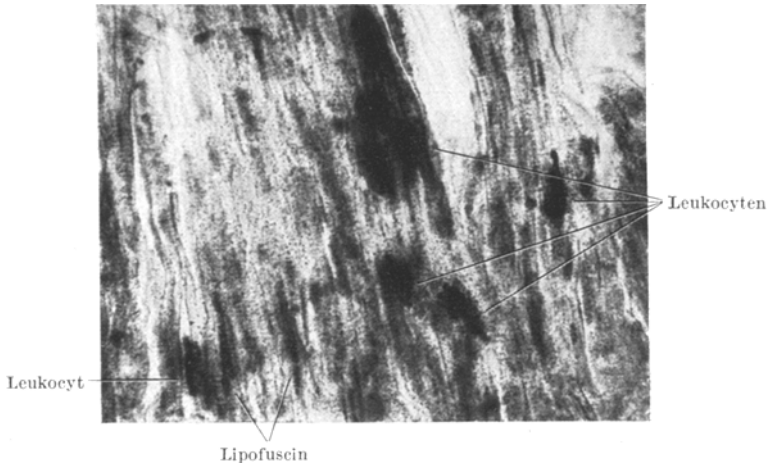


Abb. 7. Gewebs-Nadi-Reaktion am formolfixierten Herzmuskel. Färbedauer 1 Std. Leitz-Panphot, Leitz-Objektiv 40 ×, Periplan-Ocular 4 ×.

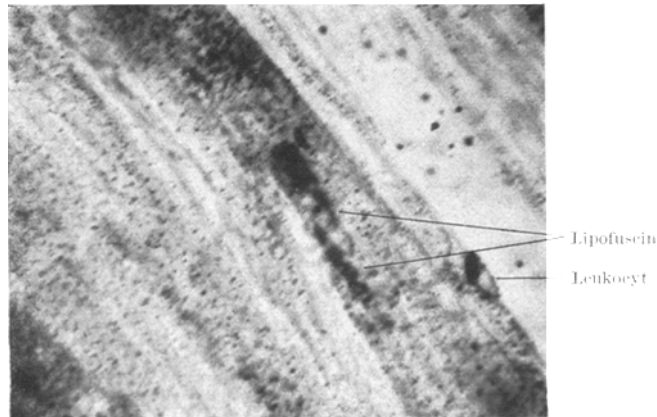


Abb. 8. Gewebs-Nadi-Reaktion am formolfixierten Herzmuskel. Färbezeit 3 Std. Leitz-Panphot, Ölimmersion 1,8 mm, Periplan-Ocular 4 ×.

eine Verzögerung der Nadi-Reaktion. Ebenso wie im formolfixierten Material konnte die Bildung von Indophenolblau-Körnchen im mit Trichloressigsäure oder Alkohol fixierten Gewebe mittels Cyankali gehemmt werden. Auch der Eintritt der diffusen Blaufärbung des Protoplasmas der Herzmuskelzellen wurde durch Cyan so erheblich verzögert, daß erst frühestens nach 2 Std eine Anfärbung festzustellen war.

Schlußfolgerungen.

Wie die Versuchsreihe F zeigt, läßt sich auch am formolfixierten Material ohne große Schwierigkeiten eine Darstellung der Gewebs-Oxydase durch einfache Verlängerungen der Färbezeiten erreichen. Die Tatsache der Hemmbarkeit dieser Reaktion durch Cyan und Schwefelwasserstoff beweist, daß die dargestellten Indophenolblau-Körnchen tatsächlich durch fermentative Wirkung des Cytochromoxydase-Cytochrom-Systems gebildet wurden. Da Trichloressigsäure und in stärkerem

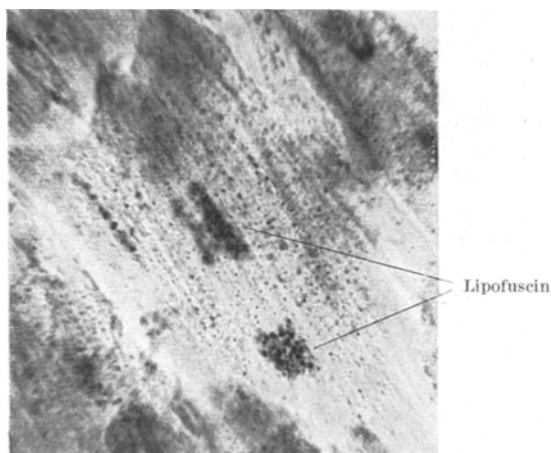


Abb. 9. Gewebs-Nadi-Reaktion am menschlichen Herzmuskel, 24 Std in 2½ %iger Trichloressigsäure fixiert. Färbedauer etwa 4 Std. Leitz-Panphot, Ölimmersion 2,2 mm, Ocular 4 ×.

Ausmaß als Formalin auch Alkohol den Eintritt der Farbkörnchenbildung verzögert, beruht demnach diese Hemmung nicht auf einer spezifischen Formolwirkung, sondern stellt eine generelle Eigenschaft der untersuchten Fixierungsflüssigkeiten dar. Trichloressigsäure gilt als sehr schonendes Eiweißfällungsmittel und greift vom WARBURG-KEILIN-System zumindest Cytochrom C nicht an (sie wird im Gegenteil in der hier angewandten Konzentration von 2½ % sogar bei der Extraktion von Cytochrom C aus Gewebsbrei benutzt (KEILIN und HARTREE¹⁶). Die hemmende Wirkung der Fixierungsflüssigkeiten muß somit in der Hauptsache wenigstens auf die hervorgerufene Eiweißkoagulation zurückgeführt werden. Infolge der Eiweißfällung ergibt sich eine erhebliche Hemmung der Geschwindigkeit, mit welcher das Reaktionsgemisch in das Gewebe diffundiert. Dafür, daß diese Erschwerung der Diffusion als wesentlicher Faktor bei der Fixierung betrachtet werden muß, spricht die Tatsache der geringeren Hemmung der Nadi-Reaktion nach Quellung der Gefrierschnitte vom fixierten Gewebe in dest. Wasser. Auch der Befund einer stärkeren Hemmung nach Alkoholfixierung

kann diese Ansicht stützen, da 96%iger Alkohol gegenüber den beiden anderen Fixierungsflüssigkeiten die stärkste Gewebsschrumpfung und damit Gewebsdichtigkeit hervorruft. Übrigens macht sich die Diffusionshemmung durch Fixierung auch bei anderen Färbemethoden bemerkbar, so z. B. bei der Hämatoxylin-Eosinfärbung, welche am unfixierten, toten Gewebe erheblich rascher eintritt als nach Fixierung (vgl. SCHULTZ-BRAUNS²⁴).

Die Beweiskraft der eigenen Versuche reicht allerdings nicht aus, um eine nicht auf Diffusionserschwerung beruhende Hemmung der Nadi-Reaktion durch die Fixierungsmittel gänzlich auszuschließen. Eine eindeutige Klärung dieser Frage dürfte auch wohl durch histologische und histochemische Untersuchungen allein nicht möglich sein.

Daß am formolfixierten Material die Gewebs-Nadi-Reaktion bei Einhaltung bestimmter Bedingungen positiv ausfällt, hatte bereits GRÄFF¹¹ nachgewiesen. Er fixierte das Gewebe in einer gepufferten Formollösung und führte die Nadi-Reaktion bei 37—50° C und einer Dauer von $\frac{1}{2}$ —1 Std durch. Eigene Vergleichsuntersuchungen zeigten keinen Unterschied zwischen Herzmuskelgewebe, welches nach GRÄFF mit gepuffelter Formalinlösung oder aber mit neutralem Formalin (über CaCO_3 aufbewahrt) fixiert worden war. Um die Reaktionsbedingungen gegenüber der Gewebs-Nadi-Reaktion am frischen Gewebe möglichst wenig zu ändern, wurde in den eigenen Versuchen auf Erwärmung der Ansätze verzichtet. Für die Durchführung der Reaktion bei Reihenuntersuchungen wird man sich schon aus Gründen der Zeitersparnis mit Vorteil die Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit der chemischen Umsetzung durch Wärmezufuhr zunutze machen können.

Ohne auf die Frage der Möglichkeit einer quantitativen Auswertung histochemischer Reaktionen am Gewebsschnitt näher eingehen zu wollen, soll doch darauf hingewiesen werden, daß am fixierten Gewebe ein auch nur grober Vergleich zwischen verschiedenen Gewebsschnitten unmöglich erscheint, da in den eigenen Versuchen der Ausfall der Reaktion am fixierten Material sehr unterschiedlich war, obwohl am entsprechenden Frischgewebe eine augenfällige Differenz nicht festgestellt werden konnte.

G. Die Indophenolblau-Reaktion als Fermentwirkung.

Auf Grund eines angeblich gleich unterschiedlichen Verhaltens der oxydasehaltigen Leukocyten bei der Indophenolblau-Reaktion nach WINKLER-SCHULTZE und der Gewebs-Nadi-Reaktion nach GRÄFF gegenüber Hemmsubstanzen wird im Schrifttum angegeben, es handele sich bei der durch die Indophenolblau-Reaktion darstellbaren Oxydase um ein grundsätzlich von der Gewebs-Oxydase des frischen, unfixierten Gewebes verschiedenes oxydierendes Agens. Diese Oxydase soll mit

der Myelo-Oxydase identisch sein, welche auch im formolfixierten Material mit dem Nadi-Reagens reagiert. Wie im vorigen Abschnitt gezeigt werden konnte, handelt es sich jedoch nach den eigenen Untersuchungen bei letzterer nicht um eine von der Gewebs-Oxydase zu unterscheidende katalytisch wirkende Substanz. Die differenten Färbeergebnisse bei der Gewebs-Nadi-Reaktion im frischen bzw. fixierten Gewebe mußten vielmehr im wesentlichen auf die durch die Fixierung veränderten Reaktionsbedingungen, insbesondere auf die veränderte Diffusionsmöglichkeit zurückgeführt werden. Um zu klären, inwieweit dieser Befund auch für die Indophenolblau-Reaktion zutrifft, wurden entsprechende Versuche mit dieser Färbemethode am formolfixierten, menschlichen Herzmuskelgewebe angeschlossen.

Versuchsordnung. Die verschiedenen Versuchsreihen wurden auch hier vollkommen entsprechend denen des Abschnittes D (S. 719ff.) ausgeführt. An Stelle des frischen, unfixierten Herzmuskelgewebes wurde jedoch Material von menschlichen Leichenherzen verwandt, welches etwa 48 Std in 10%igem, neutralen, wäßrigen Formalin fixiert worden war. Von diesem Gewebe wurden auf dem Gefriermikrotom 20μ dicke Schnitte angefertigt und diese zum Anstellen der verschiedenen Reaktionen benutzt. Auf eine eingehende Darstellung der einzelnen Versuchsanordnungen kann an dieser Stelle verzichtet werden, da dieselben in Abschnitt D ausführlich gebracht wurden. Als Färbemethode wurde in Versuchsserie 1 die Reaktion nach WINKLER-SCHULTZE mit konzentrierten (1,0%igen) Farblösungen, in den übrigen Versuchsreihen deren Modifikation nach KATSUNUMA (vgl. S. 715) mit einer verdünnten Lösung von Dimethyl-p-Phenylendiamin (0,2%) angewandt. Letztere erwies sich für die beabsichtigten Untersuchungen als vorteilhaft, da infolge der durch die Anwendung verdünnter Farblösungen langsamer ablaufenden Reaktion Hemmungseffekte deutlicher sichtbar gemacht werden konnten.

Ergebnisse.

I. Gekochtes Gewebe.

Im gesamten Gewebsschnitt des gekochten Herzmuskels fehlte jede Indophenolblau-Granulabildung, Leukocyten kamen somit nicht zur Darstellung. In Vergleichsschnitten vom gleichen, jedoch ungekochten Muskelgewebe waren in jedem Gesichtsfeld mehrere Leukocyten durch ihre reichlichen Indophenolblau-Körnchen leicht aufzufinden.

II. Versuche mit Kaliumcyanid (KCN).

Zusatz von Cyankali zur Reaktionslösung verhinderte vollkommen die Granulocytendarstellung durch Indophenolblau, gleichgültig, ob die Reaktion nach WINKLER-SCHULTZE mit konzentrierten Farblösungen oder deren Modifikation nach KATSUNUMA angewandt wurde.

Wurden die Schnittpräparate mit 1,0%iger KCN-Lösung für 15 bzw. 60 min vorbehandelt, so zeigte die Indophenolblau-Reaktion nach 5 min Färbedauer ein völlig negatives Resultat. Nach einer Färbezeit

von 40 min waren bei den 15 min vorbehandelten Gewebsschnitten in den Leukocyten Farbkörnchen etwa in dem Ausmaß aufgetreten, wie sie die Vergleichsschnitte bereits nach einer Reaktionszeit von 5 min aufwiesen. Die diffus hellblaue Anfärbung der Muskelzellen war etwas geringer als in den Kontrollen mit 40 min Färbedauer. Die 60 min mit 1,0%iger Cyanlösung vorbehandelten Schnitte gaben nach einer Färbezeit von 40 min ganz schwache Reaktion vereinzelter Leukocyten.

Vorbehandlung der Gefrierschnitte mit 0,5 %iger Cyankalilösung ergab fast den gleichen Befund. Nach einer Färbedauer von 5 min fehlte in jedem Fall eine Darstellung der Leukocyten (Abb. 10 und 11). Wurde die Reaktionslösung 40 min einwirken lassen, so fand sich eine wenig stärkere Färbung als nach Vorbehandlung mit 1,0%iger Cyanlösung.

Bei Einwirkung von $\frac{1}{1000}$ Mol KCN vor der Färbung zeigte sich nach 5 min Färbedauer eine nur schwache Körnelung vereinzelter Leukocyten. Nach 40 min Reaktionsdauer war die Intensität der Färbung in den cyanbehandelten Schnittpräparaten dagegen nur geringfügig gegenüber den Kontrollschnitten abgeschwächt. Für den Ausfall dieser Versuche war es gleichgültig, ob die Vorbehandlung 15 oder 60 min dauerte.

III. Versuche mit Sulfocyanid.

Versuchsordnung. Da Zusatz von Ammoniumsulfocyanid zur Farblösung nach KATSUNUMA das darin vorhandene α -Naphthol zur Ausfällung brachte, wurde an dessen Stelle bei Zusatzversuchen Kaliumsulfocyanid angewandt. Die Versuchsreihen mit Vorbehandlung der Schnittpräparate durch Sulfocyanid wurden wie in den früher beschriebenen Versuchen mit Ammoniumsulfocyanid durchgeführt.

Ergebnis. Vorbehandlung der Schnitte mit einer 0,5- oder 1,0%igen Ammoniumsulfocyanidlösung für die Dauer von 15 oder 60 min beeinflusste den Reaktionsablauf der Indophenolblau-Reaktion nicht. Die Schnitte entsprachen hinsichtlich Farbtiefe und Reaktionsart vollkommen den Kontrollschnitten. Zusatz von 0,5 oder 1,0%igem Kaliumsulfocyanid zur Farblösung selbst schwächte die Reaktion der Leukocyten bei 5 min Färbedauer geringfügig ab, nach 40 min Färbedauer war diese abschwächende Wirkung nicht mehr eindeutig nachweisbar.

IV. Versuche mit Kohlenmonoxyd (CO).

Wurde die Farblösung vor Anstellen der Färbung für 1 min mit CO-haltigem Leuchtgas behandelt, so blieb ein hemmender Effekt auf die Indophenolblau-Reaktion aus. Behandlung der Schnitte selbst für 15 min mit Leuchtgas ließ die Oxydase-Reaktion der Leukocyten fast völlig verschwinden. Nur ganz vereinzelt konnten Farbkörnchen beobachtet werden. Wurde die Färbezeit auf 40 min verlängert, so waren zwar die Muskelfasern wie in den Kontrollen hellblau diffus

gefärbt, jedoch erreichte die Anfärbung der Leukocyten nicht einmal das Ausmaß der 5 min lang gefärbten Kontrollschnitte.

V. Einwirkung von Schwefelwasserstoff (H_2S).

Vorbehandlung der Schnitte für 10 min mit H_2S -Wasser schwächte bei einer Färbezeit von 5 min die Reaktion der Leukocyten erheblich ab. Auch nach 40 min Färbedauer war diese Abschwächung noch



Abb. 10. Formolfixierter Herzmuskel. Indophenolblau-Reaktion nach KATSUNUMA. Färbezeit 5 min, Behandlung des Schnittes vor der Färbung für 15 min mit wäßriger, 0,5 %iger Lösung von Kaliumcyanid. Leitz-Panphot, Leitz-Objektiv 40 \times , Periplan-Ocular 10 \times . (Mikroskop-Kondensor gesenkt.)

deutlich zu bemerken. Verlängerung der Einwirkungszeit von Schwefelwasserstoff führte zu einer weiteren Hemmung der Reaktion, bis nach $4\frac{1}{2}$ Std Einwirkung eine Färbung der Leukocyten nach 5 min Färbezeit vollkommen ausblieb.

VI. Der Einfluß von 8-Oxychinolin (NC_9H_6OH) auf die Indophenolblau-Reaktion (IR).

Die in der verschiedenen Art mit 8-Oxychinolin behandelten Schnittpräparate zeigten übereinstimmend den gleichen Farbausfall wie die Vergleichsschnitte ohne Oxin. Bemerkenswert ist, daß auch die mit $\frac{1}{40}$ Mol 8-Oxychinolin (3,6270 g 8-Oxychinolin mit 250 cm^3 n/10 HCl gelöst und mit dest. Wasser zu 1 Liter aufgefüllt) behandelten Schnitte keine Hemmung der Reaktion aufwiesen, obwohl durch die Lösung von 250 cm^3 n/10 HCl in 1000 cm^3 Wasser die Indophenolblau-Reaktion fast ganz aufgehoben wurde.

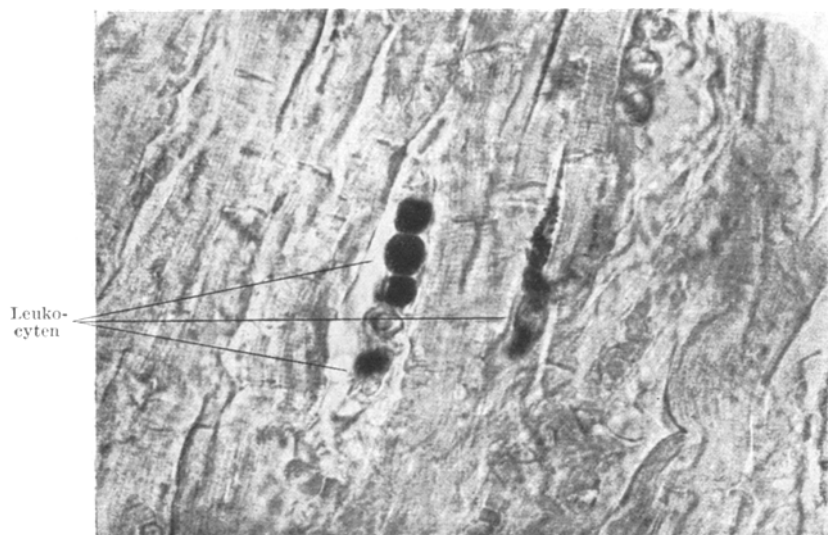


Abb. 11. Vergleichsschnitt vom gleichen Gewebe zu Abb. 10 und 12. An Stelle der Vorbehandlung mit Cyan bzw. H_2AsO_3 wurde der Schnitt 15 min lang vor der Färbung in destilliertem Wasser aufbewahrt, sonst gleiche Behandlung. Leitz-Panphot, Leitz-Objektiv 40 \times , Periplan-Ocular 10 \times .

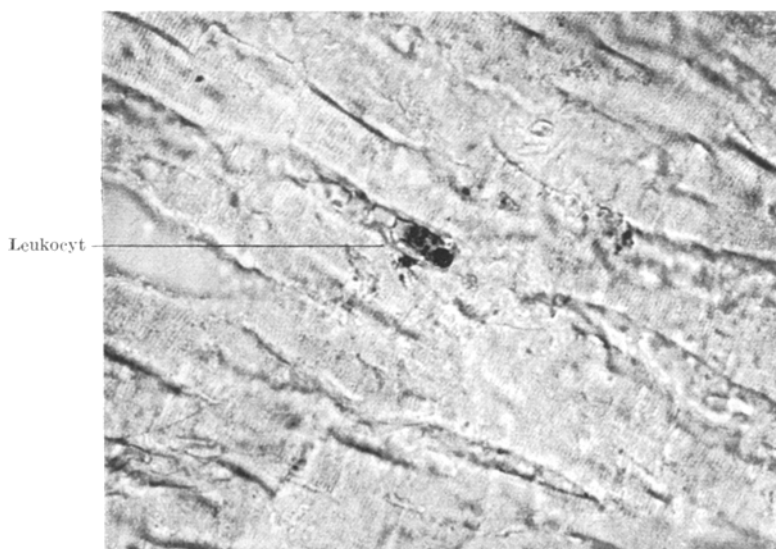


Abb. 12. Formolfixierter Herzmuskel. Indophenolblau-Reaktion nach KATSUNUMA, Färbezeit 5 min, Behandlung des Schnittes vor der Färbung für 60 min mit gesättigter wäßriger Lösung von arseniger Säure. Leitz-Panphot, Leitz-Objektiv 40 \times , Periplan-Ocular 10 \times .

VII. Versuche mit arseniger Säure (H_3AsO_3).

Zusatz von As_2O_3 zur Farblösung löschte bei einer Färbedauer von 5 min die Reaktion der Leukocyten vollkommen aus. Nach einer Färbzeit von 40 min zeigte sich eine derartige Verlangsamung der Indophenolblau-Reaktion, daß in diesen Gewebsschnitten noch nicht die Farbtiefe der Leerkontrollen mit 5 min Färbedauer erreicht wurde. Wurden die Schnittpräparate 15 min lang mit arseniger Säure vorbehandelt, so fand sich eine kaum faßbare Abschwächung der Reaktion nach 5 min Reaktionszeit, während nach 40 min eine geringe Verstärkung zu bestehen schien. Verlängerung der H_3AsO_3 -Einwirkung auf 60 min führte zu einer deutlichen Abschwächung der IR (vgl. Abb. 12).

Beurteilung der Versuche.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe entsprechen vollkommen denen der Reihe E mit Anwendung der Gewebs-Nadi-Reaktion am fixierten Gewebe. Damit besteht nach den eigenen Untersuchungen grundsätzlich weder ein Unterschied zwischen der durch Nadi-Reagens färbbaren oder mit der Indophenolblau-Reaktion darstellbaren Myelo-Oxydase der Leukocyten, noch eine Differenz dieser zur Gewebs-Oxydase des unfixierten Herzmuskels.

Um die Übereinstimmung der verschiedenen Versuchsreihen noch einmal deutlich zu machen, wurden die wesentlichen Ergebnisse vereinfacht in Tabelle 1 zusammengestellt.

Auf Grund des übereinstimmenden Wirkungsmechanismus der Gewebs-Nadi-Reaktion und Indophenolblau-Reaktion könnte erwartet werden, daß die Indophenolblau-Reaktion auch zur Darstellung der

Tabelle 1.

| | WARBURG-KWILIN-System der Atemfermente | Gewebs-Nadi-Reaktion am unfixierten Gewebe | Gewebs-Nadi-Reaktion am fixierten Gewebe | Indophenolblau-Reaktion am fixierten Gewebe |
|---|--|--|--|---|
| Erhitzen auf 100° C. . . | Zerstörung | völlige Hemmung | völlige Hemmung | völlige Hemmung |
| KCN | Hemmung | Hemmung | Hemmung | Hemmung |
| CO | Hemmung | Hemmung | Hemmung | Hemmung |
| H ₂ S | Hemmung | Hemmung | Hemmung | Hemmung |
| H ₃ AsO ₃ | langsam eintretende Hemmung | langsam eintretende Hemmung | langsam eintretende Hemmung | langsam eintretende Hemmung |
| NH ₄ CNS bzw. KCNS . . | keine Hemmung | keine Hemmung | keine Hemmung | keine Hemmung |
| 8-Oxychinolin. | keine Hemmung | keine Hemmung | keine Hemmung | keine Hemmung |

Gewebsoxydase am unfixierten Herzmuskel geeignet sei. Allerdings würde man dann nicht im optimalen p_H -Bereich der Oxydase arbeiten, wie die Untersuchungen von GRÄFF¹¹ zeigten. Bei daraufhin angestellten Versuchen ergab sich jedoch eine Schwierigkeit ganz anderer Art. Der relativ hohe Gehalt der Farblösung an Alkali macerierte das unfixierte Gewebe außerordentlich schnell. Aber trotzdem zeigten Schnittpräparate, welche nur sehr kurze Zeit mit der Reaktionslösung nach WINKLER-SCHULTZE zusammengebracht wurden, vor ihrer völligen Auflösung an der Oberfläche derart kompakte Indophenolblau-Massen, daß nur an nicht gut ausgebreiteten Schnitten, und zwar an den mit der Farblösung nicht unmittelbar in Berührung geratenen Stellen einzelne Herzmuskelfasern beobachtet werden konnten. Hier ergab sich fast das gleiche Bild wie bei der Gewebs-Nadi-Reaktion am frischen, unfixierten Herzmuskel mit feinsten, dunkelblauen Farbkörnchen in der typischen, perlschnurartigen Lagerung. Wurden verdünnte Farblösungen (nach KATSUNUMA¹²) angewandt, so konnte eine Granuladarstellung bis zum Eintritt der völligen Maceration der Schnittpräparate nicht beobachtet werden.

Die bisherigen eigenen Versuche über den Reaktionsmechanismus der Oxydase-Reaktionen unter Verwendung von Dimethyl-p-Phenylen-diamin in Verbindung mit α -Naphthol zeigen, daß in jedem Fall, gleichgültig, ob alkalische oder nach GRÄFF gepufferte Lösungen verwandt werden, oder ob die Ausführung der Reaktion am unfixierten oder fixierten Gewebe erfolgt, die Färbung am gesunden Herzmuskel und den im Gewebe vorhandenen Leukocyten (gleichgültig, ob frei im Gewebe oder in den Blutgefäßen und Capillaren des Gewebes) eine Reaktion des WARBURG-KEILIN-Systems der Atemfermente der Zelle, des Cytochromoxydase-Cytochrom-Komplexes darstellt. Wenn LISON¹⁸ der Ansicht ist, es bestünden bei der Gewebs-Nadi-Reaktion durch Cyan und Hitzeeinwirkung nicht hemmbare Anteile, so trifft dies für den gesunden Herzmuskel und auch für die Leukocyten nicht zu. Allerdings schließen die bisherigen eigenen Untersuchungen nicht aus, daß möglicherweise in anderen Organen oder im pathologisch veränderten Gewebe ein nicht auf Cytochromoxydase-Cytochrom zurückführbarer Reaktionsanteil beobachtet werden könnte. Hierfür spricht sogar eine bisher als Nebenbefund gewertete eigene Beobachtung. Wurde nämlich die Gewebs-Nadi-Reaktion an Herzen durchgeführt, in denen intracellulär Lipofuscin als Abnützungspigment gefunden werden konnte, so trat regelmäßig eine Mitfärbung der Lipofuscingranula ein (vgl. Abb. 2, S. 717). Auch dann, wenn nach Alkoholfixierung des Herzmuskels keine Indophenolblaugranula dargestellt werden konnten, blieb die Färbung des Lipofuscins erhalten und war hier besonders scharf und deutlich ausgebildet. Die Farbtönung der mitgefärbten

Lipofuscingranula war ähnlich wie die der Oxydase-Körnchen dunkelblau, im Gegensatz zur violetten Färbung des Fettgewebes. Nach der üblichen Auffassung, welche auf Untersuchungen von DIETRICH⁷ zurückgeht, müßte es sich bei dieser Mitfärbung der Lipofuscingranula um einen sekundären Effekt handeln, indem das bei der Zellreaktion fermentativ gebildete, lipoidlösliche Indophenolblau sich in einem zweiten Schritt in den Lipoidstoffen der Lipofuscingranula lösen würde. Allerdings soll meinerseits an dieser Stelle nicht behauptet werden, daß die in den Zellen auftretenden Indophenolblau-Körnchen in jedem Fall feinste Fett- oder Lipoidtröpfchen darstellen, welche sich mit dem fermentativ gebildeten Farbstoff imprägnieren würden. Dieser von DIETRICH eingenommene Standpunkt war Anlaß zu einer bis heute noch nicht abgeschlossenen Diskussion über die Natur der Granula. Von anderer Seite wurde nämlich angenommen (SCHULTZE⁸, KATSUNUMA¹², GRÄFF¹¹ u. a.), es handele sich um vorgebildete Fermentgranula. Die von beiden Seiten ins Feld geführten Argumente sind jedoch nicht geeignet, diese Frage endgültig zu entscheiden. Auch die Untersuchungen von MAGRI³⁰ können dieses Problem wenig fördern, denn sie zeigten lediglich, daß verschiedene Bedingungen (Wärme, Formalin), die die Oxydase-Reaktion hemmen oder verhindern, in keiner Weise die Färbung von Fetten und Lipoiden abändern. Auch der Befund, daß unter experimentellen Versuchsbedingungen wie Erstickung und Blutleere eine deutliche Vermehrung der Indophenolblau-Granula in den Granulocyten auftritt (MAGRI), ohne daß gleichzeitig die sudanfärbbaren Körnchen der Leukocyten zunehmen, spricht nicht für das Vorhandensein von vorgebildeter Fermentgranula, sondern ist lediglich als Anhalt für die Annahme einer verschiedenen Genese der beiden Körnchenarten zu werten. Sicher ist nach diesen Versuchen nur, daß die Indophenolblau-Körnchen auch dort auftreten können, wo bei Sudanfärbung keine Lipoidtröpfchen mehr nachweisbar sind. Aber dies zeigten schon die Untersuchungen von DIETRICH. Daraus den Schluß ziehen zu wollen, es handele sich in jedem Fall bei den Indophenolblau-Granula nicht um Fett- oder Lipoidtropfen, geht zu weit, da seit langem bekannt ist, daß sich ein Teil des Zellfettes dem Nachweis durch die üblichen Fettfärbemethoden entzieht (DIETRICH). Wesentlicher scheint mir ein Befund von KATSUNUMA, der anscheinend den Nachweis bringen konnte, daß sich bei der supravitalen Eisenreaktion in den Zellen Eisengranula beobachten lassen, die in ihrer Lokalisation mit den Indophenolblau-Körnchen bei der Gewebs-Nadi-Reaktion übereinstimmen. Weitere Untersuchungen zur Klärung dieser Frage sind erforderlich. Wenn auch DIETRICH die Farbgranula als sekundär gefärbte, feinste Fetttröpfchen anspricht, so hält er die Bildung des Farbstoffs selbst in der Zelle doch für einen fermentativen

Vorgang. Trotz der gegenteiligen Ansichten von HOLLANDE²², REMESOW¹⁹ u. a. muß auf Grund der eigenen Versuche die eigentliche farbbildende Reaktion auf Fermentwirkung, und zwar auf die Tätigkeit der zelleigenen Atemfermente (Cytochromoxydase-Cytochrom) zurückgeführt werden. Die bisherigen eigenen Untersuchungen können jedoch keinen Beitrag zur Lösung der Frage bringen, ob es sich bei den Farbkörnchen um vorgebildete, mit Farbstoff beladene Fermentgranula oder aber feinste Lipoidtröpfchen handelt, welche dann die Grundlage der Farbkörnchenbildung bieten würden.

H. Die Bedeutung von Fetten und Lipoiden bei der Gewebs-Nadi-Reaktion des gesunden und des krankhaften verfetteten Herzmuskels.

Indophenolblau stellt infolge seiner Lipoidlöslichkeit einen sehr guten Fettfarbstoff dar. In einer Kritik an der schon früher (S. 708) genannten Arbeit von DIETRICH und LIEBERMEISTER⁵ wies bereits 1903 MEYER⁶ auf diese Tatsache hin. DIETRICH und LIEBERMEISTER hatten bei Verwendung von frisch angesetzter, schwach alkalischer Lösung von α -Naphthol und Dimethyl-p-Phenylendiaminchlorhydrat bei einer Reihe von Bakterien im Zelleib blaue Körnchen darstellen können. Sie nahmen als oxydationsbeschleunigenden Faktor ein oxydierendes Ferment an, welches vielleicht in den Körnchen selbst lokalisiert sei. Auf Grund der Kritik von MEYER und der inzwischen veröffentlichten Arbeit von WINKLER⁴ stellte DIETRICH⁷ erneut Untersuchungen über die Indophenolblau-Granula an. Im Gegensatz zur stark alkalischen Lösung WINKLERS wurde jedoch von DIETRICH eine nur schwach alkalische Farblösung (in 0,5% Soda) angewandt. Bei Untersuchung von frischem Nierengewebe mit stärkerer parenchymatöser Trübung und auch schon erkennbaren Fetteinlagerungen sah er bereits makroskopisch an den Präparaten eine verschieden intensive Färbung. Mikroskopisch war das Protoplasma der „degenerierten“ Harnkanälchen erfüllt mit feineren oder gröberen blauen Körnchen, während die noch nicht veränderten Kanälchen eine leichte, staubförmige Körnelung darboten. Bei Anwendung der Sudanfärbung nach Fixierung des Präparates entsprach in den meisten Fällen diese Fettfärbung in ihrer Ausdehnung derjenigen der intensiven Blaureaktion nach α -Naphthol + Dimethyl-p-Phenylendiaminchlorhydrat. In einigen Fällen ging die Anhäufung feiner, aber scharf blauer Farbkörnchen über die Sudanfärbung hinaus. Größere Fetttropfen färbten sich im Gegensatz zu den feineren violett.

Da die Farbstoffbildung im Gewebe viel rascher als in reiner Lösung auftrat und die Gewebsreaktion durch längeres Liegen der Organe oder durch Fixierung abgeschwächt wurde, kam DIETRICH zu der Ansicht, die Farbstoffbildung selbst gehe auf Grund fermentativer Wirkung

vor sich, jedoch würde der gebildete Farbstoff vom Zellfett aufgenommen und die mikroskopisch sichtbaren Granula seien dementsprechend nicht als Fermentgranula, sondern als feinste Fetttropfchen aufzufassen. LISON¹⁸ ist, wie bereits früher erwähnt, der Meinung, es handle sich bei der Nadi-Reaktion nur zum Teil um eine Fermentreaktion, ein weiterer Teil der Oxydation zu Indophenolblau würde von an der Luft oxydierten, ungesättigten Fettsäuren des Gewebes bewirkt.

Schließlich soll an dieser Stelle noch erwähnt werden, daß REMESOW¹⁹ auf Grund von in vitro-Versuchen zu einer zumindest sehr einseitigen Ansicht über den Mechanismus der Nadi-Reaktion gelangte. Bei Tierversuchen über den Lipoidstoffwechsel hatte er nach parenteraler Einführung kolloidalen Cholesterins beobachtet, daß neben Cholesterinanhäufungen in den Gefäßlichtungen ständig Leukocytenansammlungen zu finden waren. Bei Anwendung der Gewebs-Nadi-Reaktion gelang es nicht, die Leukocyten sicher von den ebenfalls gefärbten Cholesterinmassen zu differenzieren. Diese Beobachtung veranlaßte REMESOW zur Durchführung von Reagensglasversuchen. Hierbei ergab sich, daß Cholesterin und Cholesterinsol mit Nadi-Reagens eine Blaufärbung zeigte. Bestrahlung des Cholesterins im ultravioletten Licht verstärkte nach seinen Angaben die Blaufärbung. In den von ihm in seiner Arbeit gebrachten Tabellen werden wohl Versuche an verschiedenen Cholesterinlösungen (alkalische und saure Chloroformlösung, alkoholische Lösung) mit der des festen Cholesterins oder des Cholesterinsols verglichen, es fehlen jedoch Kontrollversuche mit Nadi-Reagens ohne Zusatz. Auf Grund seiner Versuche glaubte REMESOW berechtigt zu sein, den Ausfall der Gewebs-Nadi-Reaktion ausschließlich auf eine katalytische Wirkung des Cholesterins der Zellen und Gewebe zurückführen zu können, wobei die Granulabildung in den Zellen einen Ausflockungsvorgang kolloidalen Cholesterins des Gewebes darstellen sollte.

Eigene Versuche.

I. Versuche mit Fett, Ölsäure, Lecithin und Cholesterin in vitro.

1. Versuchsanordnung. Gleichartige Seidenpapierstückchen wurden mit a) alkoholischer, gesättigter Cholesterinlösung (Cholesterin reinst, krist., „Merck“), b) alkoholischer, gesättigter Lecithinlösung (Lecithin ex ovo „Merck“), c) mit in der Wärme verflüssigtem Lecithin ex ovo, d) mit Ölsäure und e) mit ausgelassenem, menschlichem Fett aus subcutanem Fettgewebe imprägniert und an der Luft getrocknet. Als Kontrolle dienten gleiche Seidenpapierstückchen ohne Vorbehandlung. Diese Papiere kamen sodann in das gleiche Nadi-Reagens.

Ergebnis. Nach einer Färbedauer von 25 min hatte sich das unbehandelte Seidenpapier (Kontrolle) schwach diffus blau gefärbt. Die gleiche schwache Färbung zeigten die mit Ölsäure und Cholesterin getränkten Papiere. Auch das mit verflüssigtem Lecithin imprägnierte Seidenpapier wies keinen Unterschied in der Färbung zu den Kontrollen

auf. Eine eben merkbare dunklere, mehr blauviolette Anfärbung konnte an dem mit alkoholischer Lecithinlösung vorbehandelten Papier beobachtet werden, während das menschliche Fett in dem Papier e) deutlich stärker blauviolett gefärbt war. Verlängerung der Färbezeit war ohne Einfluß auf den Ausfall der Färbung in den verschiedenen Versuchsansätzen.

2. *Versuchsanordnung.* Drei Reagensgläser wurden mit je 5,0 cm³ einer frisch angesetzten Nadi-Lösung beschickt. Reagensglas a enthielt eine Messerspitze kolloidalen Cholesterins („Heyden“), Glas b eine Messerspitze Cholesterin reinst, krist. („Merck“), während Reagensglas c als Vergleich ohne Zusatz blieb. Die Gläser standen dann 2 Std bei Zimmertemperatur. Ein Vergleich der Färbungen nach 2 Std unmittelbar in den angesetzten Lösungen war nicht möglich, da durch den Zusatz von kolloidalem Cholesterin die Lichtdurchlässigkeit dieses Röhrchens von derjenigen der anderen unterschiedlich war. Daher wurden nach 2 Std je 5,0 cm³ Toluol zugegeben und die Röhrchen so lange geschüttelt, bis das gesamte Indophenolblau in das Toluol übergegangen war. Diese überstehenden Lösungen wurden sodann verglichen.

Ergebnis. Die stärkste Farbstoffbildung zeigte die Leerkontrolle. Etwas schwächere Färbung war nach Cholesterinzusatz erfolgt und am schwächsten war die Indophenolblau-Bildung im Röhrchen mit Zusatz von kolloidalem Cholesterin.

3. *Versuchsansatz.* 20 g Gelatine (in Schuppen, „Merck“) wurden mit 60 g dest. Wasser versetzt und im Wärmeschrank bei 60° C verflüssigt. Die Gelatine-lösung wurde in 3 Portionen geteilt. Teil a blieb ohne Zusatz, Teil b erhielt einen Zusatz von Cholesterin reinst, krist. („Merck“) und Teil c einen solchen von kolloidalem Cholesterin „Heyden“. Die Proben wurden durch Schütteln gut gemischt und dann jede in Blöcke gegossen. Nach dem Erkalten wurden von den erstarrten Blöcken auf dem Gefriermikrotom 40 μ dicke Schnitte hergestellt und diese dann für die Dauer von 25 min in frisch hergestelltem Nadi-Reagens gefärbt.

Ergebnis. Trotz makroskopisch sichtbarer Kristalle von Cholesterin bzw. Schlieren des leicht gelblichen kolloidalen Cholesterins in den Schnitten war der Färbeversuch in allen Präparaten völlig ergebnislos. Sämtliche Gelatineschnitte (auch in gleicher Stärke die Kontrollen!) zeigten sehr schwache, gleichmäßige, diffuse, hellblaue Färbung.

4. *Versuchsanordnung.* Entsprechend, abgesehen von einem Eisenchloridzusatz (FeCl₃) zur Gelatine, der vorhergehenden.

Ergebnis. Auch hier wiesen Kontrollen und Versuchsschnitte in gleicher Weise und Stärke eine schwache, diffus hellblaue Verfärbung der Gelatine auf. Zusatz von kristallisiertem oder kolloidalem Cholesterin veränderte diesen Befund nicht.

Schlußfolgerungen.

Die eigenen Versuche ergaben keinen Anhalt dafür, daß Cholesterin, kolloidales Cholesterin, Ölsäure, Lecithin oder menschliches Fett im Modellversuch in der Lage sind, Indophenolblau aus α -Naphthol und

Dimethyl-p-Phenylendiamin zu synthetisieren. Zusatz von Ferri-Ionen zum kristallisierten oder kolloidalen Cholesterin war ohne Einfluß. Die dargestellten Ergebnisse stehen im Widerspruch zu denen von REMESOW¹⁹, der aus seinen Untersuchungen schließen zu können glaubte, es handle sich bei der Gewebs-Nadi-Reaktion um einen durch kristallisiertes oder kolloidales Cholesterin katalysierten oxydativen Vorgang. Wie bereits früher betont, fehlen in der Untersuchung von REMESOW Vergleichsuntersuchungen mit Leerkontrollen. Aus diesem Grund ist es unmöglich, Aussagen über die Ursachen der anscheinend unterschiedlichen Versuchsergebnisse zu machen.

Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen an Ölsäure widersprechen auch der Ansicht von LISON¹⁸, es seien ungesättigte Fettsäuren an der Nadi-Reaktion beteiligt. Sodann konnten die Untersuchungen an Lecithin und menschlichem Fett zeigen, daß diese Stoffe als unmittelbare Reaktionsteilnehmer der Indophenolblau-Synthese außer Betracht bleiben können.

Die eben genannten eigenen Befunde stehen in gutem Einklang mit dem Ausfall der früheren Versuchsreihen über die Fermentnatur des Oxydationskatalysators der Indophenolblau-Synthese bei der Gewebs-Nadi-Reaktion und Indophenolblau-Reaktion. An dem untersuchten Herzgewebe fand sich niemals eine Reaktion, welche nicht durch Erhitzen, Cyankali und andere Fermentgifte gehemmt worden wäre. So fiel auch insbesondere die sekundäre Anfärbung von vorhandenem Fettgewebe in Hemmungsversuchen jedesmal wesentlich schwächer aus oder unterblieb ganz.

II. Histochemische Indophenolblau-Synthese und -Speicherung bei Herzmuskelverfettung.

Für die Untersuchung verfetteten Herzmuskelgewebes wurde ein entsprechender Fall aus dem Sektionsgut des Pathologischen Instituts der Universität Münster ausgewählt. Die Untersuchung des Herzens mittels der Gewebs-Nadi-Reaktion erfolgte am Tage der Obduktion, während die Färbungen am fixierten Material später vorgenommen wurden.

Sekt.-Nr. 73/48. Maria W., 27 Jahre; gest. 30. 3. 48; sez. 1. 4. 48. (Obduzent: Dr. WENZEL.)

Pathologisch-anatomische Diagnose (gekürzt). Recurrierende, polypös-ulceröse Endokarditis der Aortenklappen, mit Verwachsungen abgelaufene Endokarditis der Mitralis. Verruköse Endocarditis parietalis des linken Vorhofes. Erhebliche Hypertrophie des Herzmuskels. Dilatation sämtlicher Herzhöhlen unter besonderer Bevorzugung der linken Herzhälfte. Trübe Schwellung und feintropfige Verfettung des Herzmuskels, abgelaufene und frische Myokarditis.

Sektionsbefund des Herzens (gekürzt). Die Ventrikel und Vorhöfe, besonders auch die Herzohren, sind stark erweitert und mit Cruorgerinnsel gefüllt. Die Herzmuskulatur ist in allen Abschnitten verdickt (Muskeldicke: rechter Vorhof

bis 0,6 cm, rechte Kammer bis 0,7 cm, linke Kammer bis 1,2 cm). Auf dem frischen Schnitt zeigt der Herzmuskel gelblich-rotbraunes, fleckiges Aussehen. Die Papillarmuskel weisen deutliche Tiegerung auf. Das Endokard ist im Bereich der Aortenklappen aufgelockert und verdickt, zum Teil mit polypösen Auflagerungen versehen, zum Teil ulcerös zerfallen. Daneben finden sich Klappenverwachungen und Verdickungen der Sehnenfäden an der Mitralklappe sowie weißliche Verdichtungen und nicht abstreifbare, warzenartige Auflagerungen.

Histologische und histochemische Untersuchung des Herzmuskels.

Die *Hämatoxylin-Eosinfärbung* des Papillarmuskels der linken Herzkammer zeigt das mikroskopische Bild eines Herzmuskels mit zahlreichen, disseminierten, vernarbten, kleinen Schwielen. Die Capillaren des Herzmuskels sind erweitert, das Endothel derselben gequollen; die Endothelzellen zeigen Aktivierung, ebenso das subendotheliale, mesenchymale Gewebe. Das Protoplasma der Herzmuskelfasern weist an Stellen einer Verfettung die hierfür typische, wabige Struktur auf. Im ganzen sind die verfetteten Bezirke bei der Hämatoxylin-Eosinfärbung blauviolett gefärbt, gegenüber der mehr rotvioletten Tönung der nicht verfetteten Zellbezirke. Diese relativ geringe Basophilie der veränderten Herzmuskelfasern ist nicht an allen Stellen gleich deutlich ausgeprägt und geht kaum über den Bereich der durch die Fetttropfchen bedingten wabigen Struktur hinaus.

Bei Anwendung der *Sudanfärbung* mit der üblichen Färbezeit von 60 min heben sich bereits bei schwacher Vergrößerung die verfetteten Bezirke durch ihre orangegelbe, massive Färbung von den übrigen, nur schwach gelb gefärbten Gewebspartien ab. Bei stärkerer Vergrößerung wird deutlich, daß alle Muskelfasern mehr oder weniger intensiv den Farbstoff angenommen haben. Die bereits mit der Hämatoxylin-Eosinfärbung durch ihre wabige Protoplasmastruktur als verfettet ansprechbaren Partien zeigen eine grobtropfige Verfettung, welche zum Teil allmählich im Verlauf der Muskelfaser in eine immer feintropfiger und schließlich staubförmig werdende Fettdarstellung übergeht, zum Teil aber an Glanzleisten haltmacht. Jenseits der Glanzleiste sind in diesen Fällen dann nur staubförmige, sudanfärbbare Tröpfchen festzustellen.

Färbung mit *Nilblausulfat* (Differenzierung in 1%iger Essigsäure) zeigte bei einer Färbedauer von 30 min eine rote Färbung der größeren Fetttropfen, während die noch mit Sudan darstellbaren feineren und staubförmigen Granula tiefblau gefärbt waren. Wurde jedoch die Färbezeit verlängert (bis zu 4½ Std), so wurden auch die feineren Tröpfchen in immer stärkerem Ausmaß rotviolett (in einzelnen Schnitten sogar rot) gefärbt.

Als Nebebefund ist zu erwähnen, daß in einzelnen grobtropfig verfetteten Bezirken mit im allgemeinen roter Färbung der Tröpfchen jeweils eine scharf abgegrenzte Muskelfaser gefunden wurde, in welcher die groben Fetttropfen vollkommen hellblau gefärbt waren (Abb. 13). In den beobachteten Fällen war die Grenze dieser hellblau gefärbten, verfetteten Zellbezirke wie in der Abbildung an der einen Seite scharf vom nicht betroffenen Protoplasmagebiet abgegrenzt, während an der anderen Seite ein allmählicher Übergang festzustellen war.

Die Färbung der Schnittpräparate des fixierten Gewebes mit alkoholischer *Indophenolblau-Lösung* brachte bei Färbezeiten bis zu 3 Std nur eine relativ schwache blaue (nicht rotviolette!) Färbung der größeren Fetttropfen.

Die *Gewebs-Nadi-Reaktion* am frischen, unfixierten Gewebe zeigte nach 25 min Färbezeit reichlich vorhandene, stark blau gefärbte Leukozyten. Am Muskelgewebe selbst setzten sich die sicher verfetteten

Bezirke scharf gegenüber den bei Sudan- und Nilblausulfatfärbung nur staubförmig granulierten Zellen durch den unterschiedlichen Farbton der Färbung ab. Die gröberen und auch feineren Tropfen färbten sich violett, während die staubförmigen Granula dunkelblau gefärbt waren. Im Bereich der gröberen Tropfen fehlte im übrigen auch die sonst feststellbare diffuse Blaufärbung des Zellplasmas. Wurde dem Nadi-Reagens Cyankali zugesetzt, so zeigte sich nach einer Färbezeit

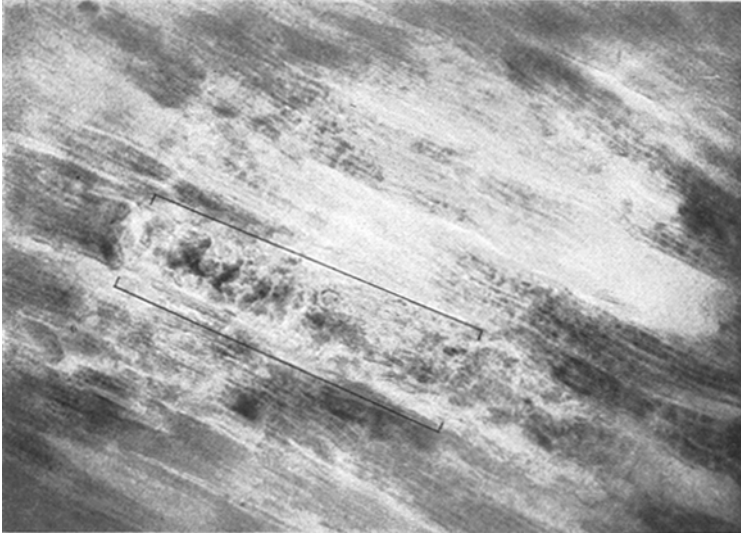


Abb. 13. Herzmuskelverfettung (Papillarmuskel des linken Ventrikels). Nilblausulfat-Färbung (Färbedauer 30 min). Innerhalb eines leuchtend rot gefärbten, verfetteten Gewebsbezirkes eine Muskelzelle mit hellblau gefärbten, verhältnismäßig groben Fetttropfen (durch Linien eingerahmt). Leitz-Panphot, Leitz-Objektiv 40 \times , Periplan-Ocular 10 \times , Grünfilter.

von 25 min eine zwar erheblich schwächere, aber immerhin noch deutlich feststellbare Färbung der gröberen, ohne Cyanzusatz violett gefärbten Fetttropfen in schwach blauvioletter Tönung, jedoch blieben die feinsten Granula wie auch einzelne gröbere vollkommen ungefärbt (Abb. 14 und 15). Bei Verlängerung der Färbedauer bis zu 3 Std ergab sich schließlich, zwar wesentlich abgeschwächt, auch eine Darstellung der feinsten, staubförmigen Tröpfchen, allerdings nun nicht mehr in rein blauer Farbtönung, sondern im Gegensatz zur Nadi-Reaktion ohne Zusatz von KCN mehr in violetter Färbung.

Die mit Sudan, Nilblausulfat und Nadi-Reagens (mit und ohne Cyan) darstellbaren feinsten und auch gröberen Granula wiesen ebenso wie die Indophenolblau-Körnchen am gesunden Herzmuskel eine Lagerung parallel zu den Muskelfibrillen auf. Seltener, fast nur in den grob-

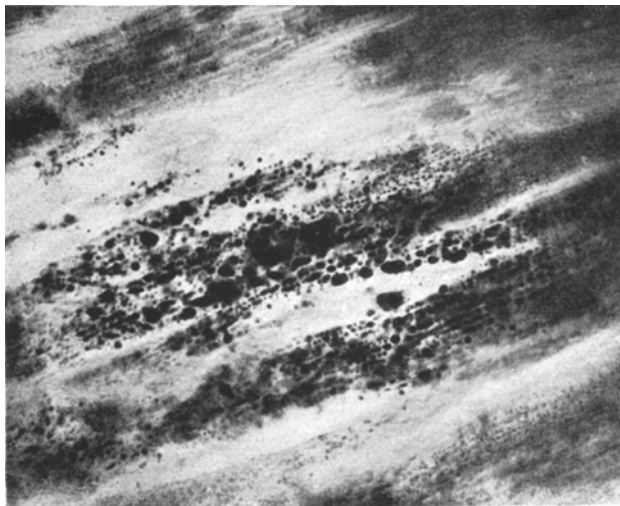


Abb. 14. Herzmuskelverfettung. Gewebs-Nadi-Reaktion (Färbedauer 25 min).
Leitz-Panphot, Leitz-Objektiv 40 ×, Ocular 4 ×.

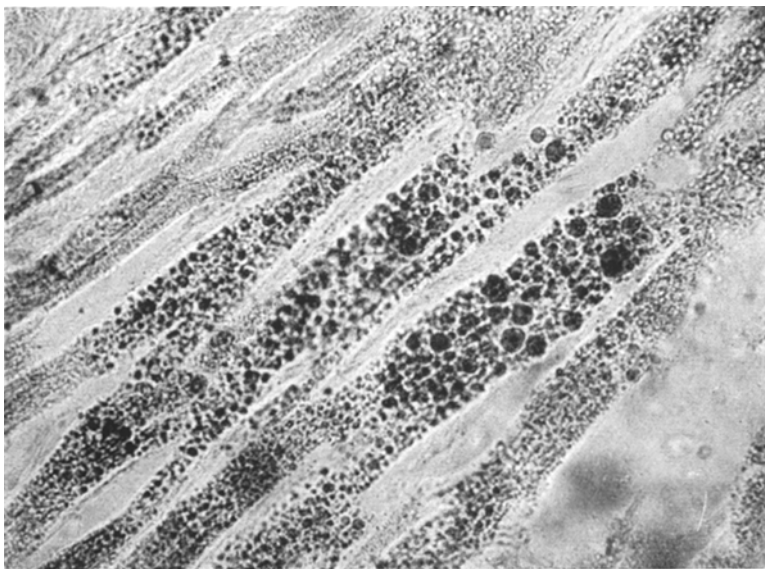


Abb. 15. Herzmuskelverfettung. Gewebs-Nadi-Reaktion unter Zusatz von Cyankali
(Färbedauer 25 min). Der Mikroskopkondensor wurde zur besseren Darstellung der
Zellstruktur herabgeschraubt. Leitz-Panphot, Leitz-Objektiv 40 ×, Ocular 4 ×.

tropfig verfetteten Bezirken, wurde an Stelle dieser perlschnurartigen Anordnung in Reihen eine völlig unregelmäßige Lagerung gesehen.

Wurde die *Indophenolblau-Reaktion* nach WINKLER-SCHULTZE auf dem Objektträger an Schnittpräparaten angestellt, welche vom frischen, unfixierten Gewebe nach SCHULTZ-BRAUNS²⁴ (vgl. auch S. 714) geschnitten worden waren und unmittelbar vom tiefgekühlten Mikrotommesser auf den Objektträger übertragen und dort mit 10%igem Formalin kurz fixiert wurden, so ergab sich neben der üblichen Leukocytdarstellung in diesen Schnitten eine mehr rotviolette Färbung der größeren Fettropfen, während die staubförmigen und feineren

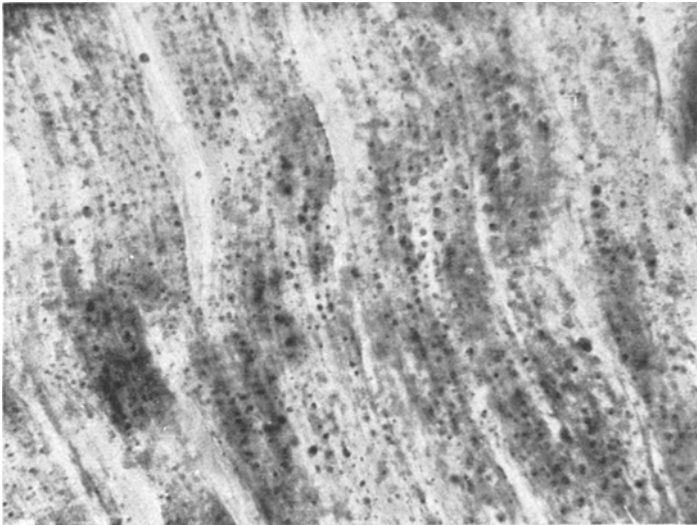


Abb. 16. Herzmuskelfettung. Indophenolblau-Reaktion nach WINKLER-SCHULTZE. Färbezeit 2 Std. Leitz-Panphot, Ölimmersion 1,8 mm, Periplan-Ocular 4 ×.

Granula mehr graublau gefärbt waren. An Schnittpräparaten von nach üblicher Art in 10%igem, neutralem Formol fixiertem Gewebe zeigte sich nach der Indophenolblau-Reaktion (Abb. 16) bei einer Färbedauer von 5 min eine rotviolette Darstellung sämtlicher Tröpfchen, die feineren und feinsten Granula waren dabei etwas blaustichiger als die größeren Tropfen. Verlängerung der Färbezeit bis zu 3 Std bewirkte eine intensivere Anfärbung aller Tröpfchen, wobei gleichzeitig eine Verschiebung des Farbtones von Violett zu Blau bemerkbar war. So zeigte sich nach 40 min noch eine rotviolette Färbung der größeren Tropfen, während die feineren bereits rein blau gefärbt waren. Nach 3 Std fand sich dann auch eine Blaufärbung der größeren Fettropfen.

Die *Gewebs-Nadi-Reaktion am fixierten Gewebe* unterschied sich nicht wesentlich von der Indophenolblau-Reaktion. Allerdings traten infolge der erheblich schwächeren diffusen Anfärbung des Protoplasmas die Farbkörnchen sehr viel deutlicher hervor (Abb. 17).

Um einen Überblick zu gewinnen, inwieweit das Bild der Indophenolblau-Synthese am verfetteten Herzmuskel durch die Fetteinlagerung beeinflusst wird, wurden entsprechende Schnittpräparate vor Anstellen der Reaktionen entfettet. Für die Durchführung der Entfettung war eine vorherige Fixierung des Gewebes unbedingt erforderlich, da sonst die Gewebseiweiße während des Aufenthaltes der Schnitte in den Lösungsmitteln koaguliert und in einem unkontrollierbaren

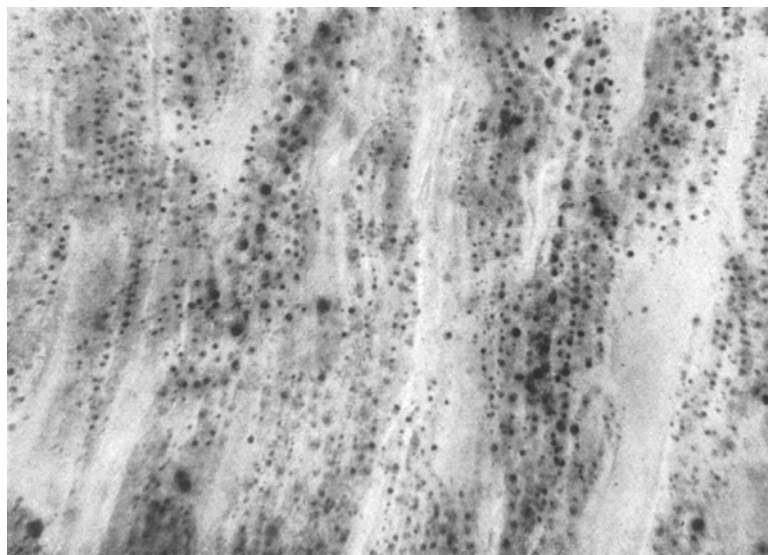


Abb. 17. Herzmuskelverfettung. Gewebs-Nadi-Reaktion am formolfixierten Gewebe. Färbedauer 2 Std. Leitz-Panphot, Ölimmersion 1,8 mm, Periplan-Ocular 4 ×.

Ausmaß geschrumpft wären. Eine Entfettung frischer Schnittpräparate ohne Beeinflussung der Gewebselemente war unter den gegebenen Verhältnissen nicht möglich.

Versuchsordnung. 20 μ dicke Gefrierschnitte von in 10%igem, neutralem Formalin fixiertem Herzmuskelgewebe (Sekt.-Nr. 73/48) wurden über die aufsteigende Alkoholreihe (50, 70 und 96%) in Äther gebracht. Nach einer Einwirkungszeit des Äthers von 30 min kamen die Schnitte über die gleiche, jetzt absteigende Alkoholreihe in Wasser und wurden anschließend mit Nilblausulfat, der Indophenolblau- und der Gewebs-Nadi-Reaktion gefärbt.

Ergebnis. Bei Anwendung der Nilblausulfatfärbung am entfetteten Schnittpräparat fehlten die Fetttropfen, an deren Stelle waren heller blau gefärbte Vacuolen im Zellplasma getreten, wodurch das sonst diffus blau gefärbte Protoplasma eine wabige Struktur erhielt. Am entfetteten Schnitt wurde nun auch das dunkelblau gefärbte Lipofuscin sichtbar, welches vorher durch die Fetttropfen überdeckt worden war.

Wurde an den entfetteten Schnitten die Indophenolblau-Reaktion nach WINKLER-SCHULTZE angestellt, so zeigte sich nach 2stündiger Färbedauer eine diffus hell- bis mittelblaue Anfärbung der Muskelfasern, die ebenso wie nach Nilblausulfat eine wabige Struktur aufwiesen. Oxydase-Granula konnten auch bei längerer Färbedauer in den Muskelzellen nicht dargestellt werden. Die in den Capillaren vorhandenen Leukocyten zeigten dagegen wie am nicht entfetteten Schnittpräparat schwarzblaue Oxydase-Körnchen. Die Granula des Abnützungspigmentes in den Herzmuskelzellen waren wenig heller gefärbt als die Indophenolblau-Körnchen in den Leukocyten.

Die Gewebs-Nadi-Reaktion an den formolfixierten und mit Alkohol und Äther behandelten Schnitten zeigte nach einer Reaktionsdauer von 2 Std ein der Indophenolblau-Reaktion ähnliches Bild, jedoch waren die Muskelfasern weniger stark diffus blau gefärbt, so daß Lipofuscin-Granula in den Muskelzellen und Indophenolblau-Körnchen in den Leukocyten deutlicher sichtbar wurden. Auch nach Verlängerung der Färbezeiten waren Indophenolblau-Körnchen in den Muskelzellen nicht mit Sicherheit festzustellen.

Erörterung der Versuchsergebnisse.

Wie früher bereits betont, bestehen seit langer Zeit über die Entstehung der Indophenolblau-Granula zwei gegensätzliche Anschauungen. Auf der einen Seite sieht DIETRICH⁷ die Farbkörnchenbildung als eine Lösung des im Zellprotoplasma fermentativ gebildeten Farbstoffes in vorgebildeten Fetttropfchen an, während andererseits SCHULTZE⁸, v. GIERKE⁹, GRÄFF^{10,11} u. a. annehmen, daß die Farbkörnchen in ihrer Lokalisation Fermentgranula entsprechen. Für die Anschauung von DIETRICH sprachen seiner Meinung nach Untersuchungen an verfetteten Organen, wobei Fettfärbungen in ihrer Ausdehnung derjenigen der intensiven Blaureaktion der Indophenolblau-Synthese entsprachen, allerdings ging in einigen Fällen die Anhäufung feiner, scharf blauer Granula über die Sudanfärbung hinaus. Der gleiche Befund wurde in den eigenen Untersuchungen am verfetteten Herzen festgestellt. Wurden die Gewebsschnitte vor Anstellen der Indophenolblau- bzw. Gewebs-Nadi-Reaktion (am fixierten Gewebe) entfettet, so konnten an diesen Schnittpräparaten in den Herzmuskelzellen zwar keine Granula festgestellt werden, doch wiesen die Leukocyten eine gleiche Reaktion wie an nicht entfetteten Gefrierschnitten auf. Dieser Befund spricht gegen die Anschauung von DIETRICH, wenn man nicht der Ansicht ist, es könne sich bei den Lipoidtropfchen in den Leukocyten um nicht durch Alkohol-Äther aus der Zelle herauslösbare Lipoid-Eiweißkomplexe handeln. Zur weiteren Klärung dieser Fragen wurden entsprechende Vergleichsuntersuchungen an nicht verfettetem Gewebe durchgeführt.

III. Fettfärbung und Indophenolblau-Synthese am gesunden Herzmuskel.

Wenn man von den Vorstellungen DIETRICH⁷ ausgeht, es handele sich bei der Indophenolblau-Synthese im Gewebe zwar um einen fermentativ katalysierten Vorgang, jedoch würden die dabei auftretenden Granula nicht der Lokalisation des Fermentes entsprechen, sondern feinste Fett- oder Lipoidtröpfchen würden vielmehr auf Grund ihrer Lösungsaffinität den fettlöslichen Farbstoff Indophenolblau sekundär speichern, so müßten sich diese Tröpfchen auch durch andere Färbemethoden nachweisen lassen. Es ist für die mikroskopische Sichtbarkeit gleichgültig, welcher Farbstoff das Substrat anfärbt, wenn nur die Farbstoffkonzentration im angefärbten Substrat zum Nachweis ausreicht und die Ausdehnung des einzelnen Tropfens innerhalb der mikroskopisch sichtbaren Dimensionen liegt. Sind jedoch die vermuteten Granula durch andere Fettfärbungen nicht darzustellen, so kann es sich bei den Indophenolblau-Körnchen der Oxydase-Reaktionen nicht um einfache Lösung des Farbstoffes in Fett- oder Lipoidtröpfchen handeln.

Eigene Versuche.

1. *Versuchsanordnung.* Von einem gesunden, in 10%igem, neutralem Formol fixierten Herzmuskel (Obduktionsmaterial) wurden auf dem Gefriermikrotom 20 μ dicke Schnitte angefertigt und diese nach ROMER²⁰ mit Sudan III und Nilblausulfat gefärbt.

Ergebnis. Wurden die Schnitte mit Sudan III gefärbt, so ergab sich makroskopisch nach einer Färbezeit von 20 min eine schwache, diffuse Gelbfärbung des ganzen Schnittpräparates; mikroskopisch war weder eine Granuladarstellung noch eine besonders starke diffuse Anfärbung der Muskelzellen zu finden. Auch Verlängerung der Färbezeiten auf 70 min und 24 Std brachte, abgesehen von einer Verstärkung der diffusen Färbung des Schnittes, keine Änderung dieser Ergebnisse.

Anwendung der Nilblausulfatfärbung am gleichen Material zeigte nach 20 min Färbedauer eine hellblaue, diffuse Färbung des Plasmas der Muskelzellen ohne Granuladarstellung, welche den Indophenolblau-Körnchen hätte entsprechen können. Die Lipofuscin-Granula waren wie bei den Oxydase-Reaktionen deutlich dunkelblau gefärbt. Zellkerne konnten vom Cytoplasma bei dieser Färbung nicht differenziert werden. Verlängerung der Färbezeiten brachte, abgesehen von einer im ganzen kräftigeren Farbtönung keinen abweichenden Befund.

2. *Versuchsanordnung.* Von einem unfixierten, frischen Mäuserzen wurden 20 μ dicke Gefrierschnitte bei einem p_H von 8,0 (dem p_H -Wert des sonst verwandten Nadi-Gemisches) mit einer Lösung des neutralen Fettfarbstoffes Rhodamin B (1 : 100 in isotonischem Phosphatpuffer) 40 min lang gefärbt, mit entsprechender, farbloser Pufferlösung gewaschen, eingedeckt und im gewöhnlichen Licht sowie unter dem Fluoreszenzmikroskop im durchfallenden Blau- und Ultraviolettlicht betrachtet.

Ergebnis. Bei Hellfelduntersuchung zeigte sich eine diffuse Rosa-färbung des Zellplasmas der Muskelzellen, während Bindegewebs- und Endothelzellen erheblich weniger Farbstoff aufgenommen hatten. Im Fluoreszenzmikroskop konnte eine kräftige, gleichmäßige, goldgelbe Fluoreszenz des Cytoplasmas der Herzmuskelzellen beobachtet werden. Punkt- oder tropfenförmige Anhäufungen des Farbstoffes, welche auf eine Lösung von Rhodamin B in vorgebildeten Fett- oder Lipoidtröpfchen mikroskopisch sichtbarer Größe hindeuten könnten, fehlten vollkommen.

3. *Versuchsanordnung.* An 20μ dicken Gefrierschnitten vom unfixierten, frischen Mäuseherzen wurde in der üblichen Art die Gewebs-Nadi-Reaktion angestellt. Nach einer Färbezeit von 40 min wurden die Gewebsschnitte, die reichlich Indophenolblau-Granula aufwiesen, in eine Lösung von Rhodamin B (1 : 100 in isotonischem Phosphatpuffer vom p_H 8,0) übertragen. Nach einer Färbezeit von 40 min befreite ich die Schnittpräparate in entsprechender, farbloser Pufferlösung von dem Farbstoffüberschuß und betrachtete sie sodann im Fluoreszenzmikroskop im durchfallenden Licht.

Ergebnis. Die Indophenolblau-Körnchen hoben sich von dem kräftig gelb gefärbten Cytoplasma durch ihre erheblich schwächere bzw. fehlende Fluoreszenz deutlich als dunkle Aussparungen ab. Die Indophenolblau-Granula hatten demnach entweder kein Rhodamin B aufgenommen oder die gelbe Fluoreszenzfarbe wurde durch das Indophenolblau optisch gelöscht. Reagensglasversuche brachten hierüber eine Klärung, denn in einer Rhodamin-B-Lösung zeigte sich nach Zusatz wäßriger Indophenolblau-Lösung Löschung der gelben Fluoreszenzfarbe.

4. *Versuchsanordnung.* 20μ dicke Schnittpräparate von frischen, unfixierten Mäuseherzen wurden in einer alkalischen Lösung (p_H 10,4) des Farbstoffes Pyronin (stand. „Bayer“, 1 : 10000 in isotonischem Phosphatpuffer) 10 min lang gefärbt und anschließend die gleiche Zeit in der entsprechenden farblosen Pufferlösung vom Farbstoffüberschuß befreit. Die Schnitte wurden sodann mit dem Fluoreszenzmikroskop bei durchfallendem Ultraviolettlicht betrachtet.

Ergebnis. Die Herzmuskelfasern zeigten eine schöne, etwas wolkige, ultramarinblaue Fluoreszenz. Bindegewebe und Endothel leuchteten weniger stark als die Muskelzellen. Punkt- oder tropfenförmige Anhäufungen des Farbstoffes konnten nicht beobachtet werden.

5. *Versuchsanordnung.* Mit der gleichen Methode wurden Schnitte gefärbt, an denen vorher die Gewebs-Nadi-Reaktion angestellt worden war.

Ergebnis. Obwohl im Hellfeld in jeder Herzmuskelzelle reichlich gut ausgebildete Indophenolblau-Körnchen zu sehen waren, zeigte das Fluoreszenzbild in den Gewebsschnitten keine punkt- oder tropfenförmige Anreicherungen des Farbstoffes, dagegen war das Muskelzellplasma infolge der teilweisen Bedeckung durch die Indophenolblau-Körnchen erheblich schwächer in seiner Leuchtkraft als bei den unbehandelten Schnitten. Reagensglasversuche ließen erkennen, daß im alkalischen Milieu durch Indophenolblau in Lösung keine Löschung der Pyronin-Fluoreszenz eintritt.

6. *Versuchsordnung.* Von einem gesunden, durch Obduktion gewonnenen, in 10%igem, neutralem Formalin fixierten menschlichen Herzmuskel wurden 20 μ dicke Gefrierschnitte über die Alkoholreihe in Äther gebracht, darin für etwa 30 min belassen und nach Durchführung durch die absteigende Alkoholreihe über Wasser in die Reaktionslösungen der Indophenolblau-Reaktion und Gewebs-Nadi-Reaktion übertragen. Gleichzeitig wurden Vergleichsschnitte ohne vorherige Alkohol-Äther-Entfettung gefärbt.

Ergebnis. Wurde die Gewebs-Nadi-Reaktion mit einer Färbezeit von 2 Std am formolfixierten und mit Alkohol-Äther vorbehandelten Gewebsschnitt angewandt, so ergab sich ein gleiches Bild wie im Vergleichsschnitt ohne Vorbehandlung mit Fettlösungsmitteln. In gleicher Weise waren Leukocyten massiv blauschwarz gefärbt. In der Umgebung der Granulocyten fanden sich auch in der Muskelfaser Indophenolblau-Körnchen in typischer Lagerung. Wurde die Färbezeit auf 3 Std verlängert, so waren zusätzlich auch außerhalb der unmittelbaren Umgebung der Leukocyten in den Herzmuskelzellen Indophenolblau-Körnchen zu sehen.

Ebenso wie die Gewebs-Nadi-Reaktion wurde auch der Ausfall der Indophenolblau-Reaktion nach WINKLER-SCHULTZE durch die Alkohol-Äther-Behandlung nicht verändert.

Schlußfolgerungen.

Nach dem ergebnislosen Ausfall der obigen Fettfärbungen ist die Ansicht von DIETRICH, es handele sich bei den durch die Oxydase-Reaktionen darstellbaren Granula um feinste, vorgebildete Fett- oder Lipidtröpfchen, in welchen sich das gebildete Indophenolblau sekundär lösen würde, nicht mehr aufrechtzuhalten. Es kann sich hierbei — wenigstens am gesunden Gewebe — keinesfalls um eine einfache Lösung des Farbstoffes auf Grund seiner Affinität zu Fetten und Lipoiden in vorgebildeten Fetttropfen von der Größe der Indophenolblau-Körnchen handeln, da diese Tröpfchen dann auch mittels anderer Fettfarbstoffe sichtbar gemacht werden könnten. Allerdings ist bei einer Färbung mit Sudan III der Einwand möglich, daß einmal der gelborange Farbton der Substanz zur Differenzierung feinsten Granula nicht ausreiche und daß zum anderen auch durch den Alkoholgehalt der Sudanlösung kleinste Fetttropfen aus dem Zellplasma herausgelöst werden könnten. Beide Einwände treffen aber für das Nilblausulfat sicher nicht zu. Im Gegenteil stellt gerade Nilblausulfat einen ausgezeichneten Fettfarbstoff auf Grund seiner gleichzeitigen Lipoid- und Wasserlöslichkeit dar, außerdem ist die Farbintensität im Vergleich zu einer Fettfärbung mit alkoholischer Lösung von Indophenolblau erheblich kräftiger. Im nicht differenzierten Schnittpräparat stört zwar die Mitfärbung des Protoplasmas, doch kann diese durch Differenzierung der Schnitte in 1%iger Essigsäure auf ein Minimum reduziert werden,

so daß eine sehr klare Färbung vorhandener Fett- und Lipoidtröpfchen erreicht werden kann. Beweisend für das Fehlen vorgebildeter Fett- oder Lipoidgranula mikroskopischer Größenordnung im Gewebsschnitt vom gesunden Herzen sind die Fluoreszenzuntersuchungen mit Rhodamin B und Pyronin. Nach den Untersuchungen von DRAWERT³¹ handelt es sich bei dem Rhodamin B um einen elektroneutralen, undissoziierten Farbstoff, welcher, wie STRUGGER³² an Pflanzenzellen nachweisen konnte, elektiv von Fetten und Lipoiden gespeichert wird. STRUGGER hatte bereits festgestellt, daß sich das Cytoplasma von Pflanzenzellen diffus rosarot mit Rhodamin B anfärbte, unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigte sich dann eine goldgelbe Fluoreszenz des im Baufett der Zelle aufgenommenen Farbstoffes. Die gleichmäßige Farbstoffspeicherung durch das Plasma der Herzmuskelzellen entspricht also vollkommen den Ergebnissen der eben genannten Untersuchungen und ist zu erklären durch das Vorkommen submikroskopischer Lipidkomplexe (vgl. FREY-WYSSLING³³) im Zellprotoplasma, welche infolge ihrer Größenordnung nicht unmittelbar als Träger der Granulabildung bei der Gewebs-Nadi-Reaktion und Indophenolblau-Reaktion in Frage kommen können. Bei dem Pyronin handelt es sich nach den Untersuchungen von STRUGGER um einen Farbstoff, der aus alkalischen Farblösungen als Farbbase ebenfalls elektiv von Fetten und Lipoiden gespeichert wird und dabei ultramarinblau fluoresciert, während das Farbkation in gelber Fluoreszenzfarbe von den Plasmaeiweißkörpern aus entsprechenden Farblösungen gespeichert wird. Die mit diesem Farbstoff gefundene, etwas wolkige, ultramarinblaue Fluoreszenz entspricht im wesentlichen dem mit Rhodamin B gefundenen Ergebnis.

I. Versuche zum Nachweis des Eisenanteils der Atemfermente in der Herzmuskelzelle.

Unter Anwendung der Schwefelammonium-Methode nach QUINCKE¹³ hatte KATSUNUMA¹² an frischem Leber- und Nierengewebe intracellulär Eisen-Granula feststellen können. Da die gefundenen Eisenkörnchen anscheinend die gleiche Lagerung wie Indophenolblau-Granula besaßen, glaubte er zur Annahme berechtigt zu sein, es handele sich um im Oxydase-Fermentkomplex katalytisch wirksames Eisen und gebe damit bei dem Eisennachweis die Örtlichkeit des Fermentes an. Falls dieser Befund den tatsächlichen Verhältnissen entsprechen würde, wäre er von ausschlaggebender Bedeutung für den Reaktionsmechanismus der Granulabildung bei der Gewebs-Nadi-Reaktion und Indophenolblau-Reaktion. Jedoch müssen auf Grund der angewandten Methode schwerwiegende Bedenken erhoben werden. Bei eingehenden Untersuchungen über histochemische Methoden hatte 1930 KOCKEL jr.³⁴ festgestellt, daß nur ein Teil des im Gewebe vorhandenen Eisens mit der Schwefel-

ammonium-Methode nachweisbar ist. So entgeht in den meisten Fällen das organisch gebundene Eisen dem Nachweis. Zwar fand MACALLUM³⁵, daß die verschiedensten Reagentien bei den üblichen histochemischen Eisen-Reaktionen auch das „okkulte“, organisch gebundene Eisen für den Nachweis freisetzen können, doch ist diese Freisetzung sehr unsicher und launisch. Bei dem Fermenteisen des Cytochromoxydase-Cytochrom-Systems handelt es sich um derart organisch gebundenes Eisen. Ein weit schwerer wiegender Einwand gegen die von KATSUNUMA verwandte Methode muß jedoch darin gesehen werden, daß es bei der Verwendung von Schwefelammon für die Eisen-Reaktion immer zu intracellulären körnigen Niederschlägen kommt, auch dann, wenn das Zelleisen nicht in körniger, sondern diffus verteilter Form vorgebildet ist (KOCKEL jr.). Diese artifiziellen körnigen Niederschläge von Schwefeleisen können dann fälschlich präexistente Eisen-Granula vortäuschen.

Auf Grund der obigen Bedenken schien eine Nachprüfung der Befunde von KATSUNUMA dringend erforderlich. Als einzige Methode, welche die genannten Nachteile des Schwefelammons ausschließt, stand für die eigenen Untersuchungen die Rhodanprobe nach KOCKEL jr. zur Verfügung. Bei dieser Methode wird das organisch gebundene Eisen nach Zerstörung der organischen Bindung durch gasförmiges, in Tetrachlorkohlenstoff gelöstes Chlor in Eisenchlorid überführt, das dann mittels Rhodanwasserstoffgas als rotgefärbtes Eisenrhodanid nachgewiesen wird. Die großen Vorteile der Rhodanprobe für den histochemischen Eisennachweis liegen auf der Hand. Der Schnitt kommt nach Überführung des organisch gebundenen Eisens in Ferrichlorid mit keinem eisenlösenden Reagens in Verbindung, es unterbleibt somit während der Behandlung jegliche Lokalisationsänderung dieses Metalls. Außerdem ist die Rhodanprobe etwa 30mal empfindlicher als die Berlinerblau-Reaktion, die der Schwefelammon-Reaktion in ihrer Empfindlichkeit gleichwertig ist (KOCKEL jr.).

Eigene Versuche.

Methodik. Da infolge der Unlöslichkeit von Cytochromoxydase und Cytochrom B ein Auswaschen des Fermenteisens aus dem Gewebe bei der Fixierung nicht zu befürchten war, wurde in 10%igem, neutralen Formalin fixierter menschlicher Herzmuskel zu den Untersuchungen verwandt. Das Gewebe wurde auf dem Gefriermikrotom geschnitten. Die 20 μ dicken Schnitte wurden über die aufsteigende Alkoholreihe (50, 70, 96 und 99%) entwässert. Die wasserfreien Schnittpräparate wurden dann derart in mit gasförmigem Chlor gesättigten Tetrachlorkohlenstoff übertragen, daß sie auf der Oberfläche der Flüssigkeit schwammen. Nachdem das Chlor 20 min eingewirkt hatte, wurden die Schnitte auf Objektträger aufgezogen. Sodann wurde solange gewartet, bis der Tetrachlorkohlenstoff und das Chlor an der Luft vollkommen verdampft waren. Anschließend wurden die Objektträger sofort mit der Schichtseite nach unten über

ein Schälchen gelegt, in dem aus Salzsäure und Kaliumrhodanid gasförmiger Rhodanwasserstoff entwickelt wurde. In kurzer Zeit bildete sich jetzt die rote Rhodaneisenfärbung, die allerdings nur wenige Minuten anhielt. Für die mikroskopische Untersuchung wurden die Präparate rasch in Glycerin eingedeckt.

Ergebnis der Versuche. Bereits makroskopisch war nach Behandlung mit Rhodanwasserstoff eine diffuse Rosafärbung des gesamten Schnittpräparates festzustellen. Bei mikroskopischer Betrachtung zeigte sich, daß diese Anfärbung sich ausschließlich auf die Muskelzellen (und Erythrocyten) beschränkte, während das Bindegewebe frei von einer sichtbaren Anfärbung war. Den Indophenolblau-Körnchen der Gewebs-Nadi-Reaktion entsprechende, rosa oder rot gefärbte Granula konnten in keinem Fall beobachtet werden.

Schlußfolgerungen.

Die eigenen Versuche über den Eisennachweis am Herzmuskel mit der Rhodanprobe schließen die Möglichkeit des Bestehens vorgebildeter Ferment-Granula des Systems der zelleigenen Atemfermente in den Herzmuskelzellen aus. Bereits KOCKEL jr. hatte bei einem Vergleich der Reaktionen mit Schwefelammonium bzw. Ferrocyankali am mit Chlor vorbehandelten Schnitt von Lebergewebe festgestellt, daß es nur nach Schwefelammonium zur Bildung eines intracellulär gelegenen, körnigen Niederschlages kommt, während das als Berlinerblau mit Ferrocyankali nachgewiesene Eisen diffus in der Zelle verteilt war. Eine Erklärung für den Unterschied im Ausfall beider Reaktionen kann durch einen Modellversuch leicht gegeben werden: Versetzt man nämlich eine verdünnte Eisensalzlösung (1 : 10000000 oder 1 : 100000000) mit Schwefelammon, so wird auch in dieser großen Verdünnung Schwefeleisen als Niederschlag ausgefällt, während die Bildung von Berlinerblau sich im entsprechenden Versuch durch eine diffuse Blaufärbung der Reaktionslösung bemerkbar macht. Schon mit den genannten Untersuchungen von KOCKEL jr. war der Befund von KATSUNUMA an Lebergewebe widerlegt worden. Die eigenen Versuche bestätigen nun auch am Herzmuskel, daß sich das Fermenteisen und damit wohl auch das System der zelleigenen Atemfermente diffus im Zellprotoplasma verteilt vorfindet und nicht in Form vorgebildeter Granula. Damit dürfte es zumindest sehr unwahrscheinlich sein, daß die Granulabildung bei der Gewebs-Nadi-Reaktion und Indophenolblau-Reaktion sich an oder in morphologisch nachweisbaren Fermentkomplexen oder im Zusammenhang mit Fermentansammlungen als Ausdruck überstürzter Farbstoffsynthese abspielt.

Nachdem somit ausgeschlossen werden konnte, daß einerseits präexistente Fett- oder Lipoidtröpfchen und andererseits vorgebildete Ferment-Granula als Bildner der Indophenolblau-Körnchen in Frage kommen, muß nach einer weiteren Erklärung gesucht werden. Die

Farbkörnchen als Kristalle anzusprechen, geht nicht an, wie das mikroskopische Bild zeigt. Es bleibt jedoch die Frage zu erörtern, ob es sich dabei um kolloidchemische Flockungserscheinungen oder aber um Entmischungsphänomene handelt. Im ersteren Fall würden die Farbkörnchen durch einfache Koagulation der lyophoben, nur schwach solvatisierten Ultramikronen des Indophenolblaus zu größeren, sekundären Teilchenaggregaten entstehen, während sie im anderen Fall Coacervate im Sinne von BUNGENBERG DE JONG³⁶ darstellen würden.

J. Der physikochemische Mechanismus der Farbkörnchenbildung.

Um zu einer Erklärung des Bildungsmechanismus der Farb-Granula bei der Gewebs-Nadi-Reaktion und Indophenolblau-Reaktion zu kommen, ist es erforderlich, die für die Diskussion dieser Frage benötigten Begriffe klar zu definieren.

Der Bereich zwischen den mikroskopisch sichtbaren Strukturen (den makroskopischen „Diskontinuitäten“ von Wo. OSTWALD³⁷) und den Molekülen, Atomen, Elektronen und Protonen umfaßt das Gebiet der „kolloidalen Diskontinuitäten“, deren ausgezeichneten Dimensionen, als „kolloidale Dimensionen“ und deren Zustand als der „kolloidale Zustand“ der Materie bezeichnet wird. Aus dieser sog. „Dimensionsdefinition“ der Kolloidwissenschaft folgt unter anderem, daß der kolloidale Zustand grundsätzlich von jedem beliebigen Körper eingenommen werden kann, daß er also ein allgemein möglicher Zustand der Materie ist. Um das kolloidale System zu charakterisieren, übernehme ich mit Tabelle 2 eine Zusammenstellung von Wo. OSTWALD.

a) Die Bildung von Farbkörnchen bei Autoxydation der Reaktionslösung.

Die für die Bildung der Indophenolblau-Granula nächstliegende Erklärungsmöglichkeit ergibt sich aus Tabelle 2. Der bei den Oxydase-Reaktionen gebildete Farbstoff Indophenolblau stellt nämlich eine in Wasser nur wenig, dagegen in Lipoiden und Lipoidlösungsmitteln sehr

Tabelle 2. Kurze Charakteristik disperser Systeme.
(Nach Wo. OSTWALD³⁷, gekürzt.)

| Grobe Dispersionen | Kolloide | Molekulardispersoide |
|-------------------------|---|---|
| Teilchen $> 0,5\mu$ | Teilchen $0,5\mu - 1\mu$ | Teilchen $< 1\mu$ |
| Mikroskopisch erkennbar | Können nicht mehr mikroskopisch abgebildet, wohl aber zuweilen ultramikroskopisch erkannt, übermikroskopisch gesehen werden | Können weder mikroskopisch noch ultramikroskopisch erkannt werden |
| Dispersion — | → Entstehung ←— | Kondensation |
| Koagulation ← | Vernichtung | → Dissolution |

gut lösbar Substanz dar. Da sich die Oxydase-Reaktionen in einem wäßrigen Milieu abspielen, ist damit zu rechnen, daß auf Grund der Löslichkeitsverhältnisse bei der Farbstoffsynthese Ausfällungen (Koagulationen) sich bemerkbar machen. Im Reaktionsgemisch der Gewebs-Nadi-Reaktion bildet sich der Farbstoff Indophenolblau bei längerem Stehen der Lösung an der Luft auch durch Autoxydation, es schien daher angebracht, diese ohne Gewebszusatz zwar langsamer ablaufende, aber schon makroskopisch erkennbare Farbstoffbildung genauer zu untersuchen.

1. *Versuchsanordnung.* Aus frisch angesetzten Stammlösungen von α -Naphthol und Dimethyl-p-Phenylendiaminsulfat wurde in typischer Weise ein Reaktionsgemisch der Gewebs-Nadi-Reaktion hergestellt. Diese Lösung wurde offen in einem Erlenmeyerkolben mehrere Tage an einem möglichst staubfreien Ort aufbewahrt. Während dieser Zeit wurde das Verhalten der Lösung beobachtet.

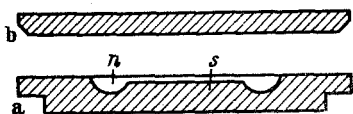


Abb. 18 a u. b. Quarzküvette für die Kardiodbeobachtung. a Objektträger; s Mittelteil, Beobachtungsfläche; n kreisförmige Rinne zur Aufnahme der von der Beobachtungsfläche überschüssig abfließenden Flüssigkeit. b Deckglas. Die Quarzküvette wird in einen besonderen Halter fest eingeschraubt.

Ergebnis. Unmittelbar nach dem Ansetzen ist das Gemisch völlig farblos, ein TYNDALL-Effekt ist nicht erkennbar. Im Verlaufe einer Stunde färbte sich die Lösung zuerst schwach rotviolett, dann hellblau. Bereits bei

violetter Anfärbung war ein leichter TYNDALL-Effekt festzustellen. Bei längerem Stehen färbte sich die Lösung immer dunkler blau. So war sie nach einem Tag tiefdunkelblau gefärbt, aber im gewöhnlichen Licht noch verhältnismäßig klar, wies jedoch ein sehr deutliches TYNDALL-Phänomen auf. Im Verlauf der nächsten Tage trat schließlich eine im gewöhnlichen Licht erkennbare Trübung der Lösung ein, die nach 3 Tagen zu makroskopisch feststellbaren Niederschlägen von blauschwarzer Färbung führte.

2. *Versuchsanordnung.* Mit dem Kardiod-Ultramikroskop (Zeiß, Jena) wurde ultramikroskopisch die Entstehung der in der 1. Versuchsanordnung festgestellten Niederschläge beobachtet. In die Quarzküvette für Kardiodbeobachtung (vgl. Abb. 18) wurde ein Tropfen einer frisch angesetzten Nadi-Lösung gebracht, wobei darauf geachtet wurde, daß die kreisförmige Rinne n fast völlig frei von Flüssigkeit blieb, damit genügend Luft als Sauerstofflieferant für die Selbstoxydation der Lösung vorhanden war. Über einen Zeitraum von 3 Tagen wurde das Verhalten des Nadi-Reagens in dieser Küvette geprüft.

Ergebnis. Die Ausgangslösungen waren, abgesehen von geringfügigen, unvermeidbaren Staubbeimengungen, optisch leer. Wurde jedoch das Reaktionsgemisch der Gewebs-Nadi-Reaktion sofort nach dem Ansetzen ultramikroskopisch untersucht, so war das ganze Gesichtsfeld erfüllt mit leuchtenden Pünktchen, die sich in lebhafter BROWNScher Molekularbewegung befanden. Bei gewöhnlicher, mikroskopischer

Betrachtung blieb auch jetzt das Blickfeld optisch leer. Im Kardioid-Ultramikroskop war während der folgenden 3 Tage das Bild unverändert, dagegen zeigte die mikroskopische Betrachtung nach 3 Tagen deutlich sichtbare, feinste, granulaartige, blauschwarz gefärbte Körnchen, die zum Teil noch geringe BROWNSche Bewegung zeigten.

Schlußfolgerungen.

Überläßt man das Reaktionsgemisch der Gewebs-Nadi-Reaktion an der Luft der Selbstoxydation, so kommt es, wie die Versuche zeigen konnten, fast unmittelbar nach dem Ansetzen der Lösungen zum Zusammentritt von Farbmolekeln (Kondensation) unter Bildung von kolloiddispersen, submikroskopisch erkennbaren Aggregaten. Diese Kondensation zu kolloidalen Teilchen bedingt auch das Auftreten des TYNDALL-Effektes. Zusätzliche Farbstoffbildung führt dann unter Vergrößerung dieser Teilchen zur Niederschlagsbildung größerer, mikroskopisch und teilweise makroskopisch sichtbarer, amorpher Farbkörnchen. Der Vorgang derartiger Koagulation beruht nach PALLMANN²⁸ darauf, daß in Solen die stark unterteilte, disperse Phase immer das Bestreben hat, ihre spezifische Oberfläche zu verkleinern; sie erreicht dies auf dem Wege der Sammelkristallisation (scheidet, wie früher bereits betont, für die Granulabildung bei der Gewebs-Nadi-Reaktion und Indophenolblau-Reaktion aus) oder aber durch Koagulation (Flockung). Unter Koagulation versteht man dabei die Vereinigung der im Dispersionsmittel zunächst frei beweglichen Ultramikronen zu größeren Teilchenaggregaten. Die bei der Flockung entstehenden Sekundärteilchen unterscheiden sich von den Primärteilchen durch größeren Durchmesser, verminderter BROWNScher Bewegung und häufig auch durch veränderte Form. Bei den Hydrosolen, d. h. den wäßrigen Lösungen kolloidaler Stoffe, kann unterschieden werden zwischen den sog. lyokratischen (stark solvatisierten, lyophilen) und den elektrokratischen (schwach solvatisierten, lyophoben) Solen. Elektrokratische Hydrosole, wie es eine Indophenolblau-Lösung bei der Gewebs-Nadi-Reaktion darstellt, flocken unter vergleichbaren Bedingungen leichter als lyokratische Systeme.

b) Der kolloidchemische Vorgang der Farbkörnchenbildung im Gewebe.

Grundsätzlich der gleiche Vorgang wie in der Lösung selbst, spielt sich anscheinend auch in der Zelle bei der Granulabildung des fermentativ synthetisierten Farbstoffes Indophenolblau ab, wie der folgende Versuch zeigt.

Versuchsanordnung. Zur unmittelbaren Beobachtung des Färbeverlaufes am unfixierten Herzmuskelgewebe wurde das übliche Zeiß-Mikroskop mit dem Objektiv 20mal und Okular 10mal benutzt. Von einem unfixierten, durch

Obduktion gewonnenen menschlichen Leichenherzen wurden auf dem Gefrier-mikrotom mit unterkühltem Messer 20μ dicke Schnitte angefertigt, die in 0,9%iger Kochsalzlösung aufgefangen wurden. Das Reaktionsgemisch der Gewebs-Nadi-Reaktion befand sich in dünner Schicht innerhalb einer flachen Glasschale, die auf dem Objektisch des Mikroskopes stand. Die Schnittpräparate wurden in dieses Reaktionsgemisch übertragen und bei durchfallendem Licht während des Verlaufes der Reaktion betrachtet.

Ergebnis. Wenige Sekunden nach dem Einbringen des Gewebs-schnittes in die Reaktionslösung hatten sich bereits die Leukocyten intensiv blau gefärbt. Der Farbstoff schien hierbei die Phase einer diffusen, feindispersen Lösung kaum zu durchlaufen, denn im Mikroskop sah man unmittelbar das Auftreten feinsten Farbkörnchen, die sich dann langsam vergrößerten. Die Farbbildung ging in den Muskelzellen viel langsamer vor sich. Zunächst trat etwa nach 2 min in einzelnen Muskelzellen, die sich in der nächsten Nachbarschaft von kräftig gefärbten Leukocyten befanden, eine schwache, diffuse Blaufärbung auf. Nach 5 min waren alle Muskelzellen mehr oder weniger stark diffus blau gefärbt, gleichzeitig trat eine etwas dunklere Anfärbung der Lipofuscin-Granula auf. Nach weiteren 1—2 min entwickelten sich in den stärker diffus gefärbten Muskelzellen, insbesondere in der Umgebung von Leukocyten, feinste Farbkörnchen, die sich langsam vergrößerten. Nach ungefähr 10—12 min war in allen Muskelzellen die diffuse Anfärbung durch das Auftreten feinsten, staubförmiger Farbkörnchen ersetzt. An diesen ließ sich überall bei längerer Beobachtungszeit eine Vergrößerung des Kornes feststellen.

Handelt es sich in dem vorliegenden Fall um einfache Koagulation, d. h. um eine Vereinigung der im Dispersionsmittel Wasser zunächst frei beweglichen Ultramikronen des Farbstoffes bei Konzentrations-erhöhung zu größeren, mikroskopisch sichtbaren Teilchenaggregaten, so können diese durch Flockung entstandenen Sekundärteilchen bei entsprechender Erhöhung der Konzentration des Dispersionsmittels unter Umständen zur spontanen kolloidalen Auflösung (v. Buzágh³⁹) oder gar Dissolution (Wo. OSTWALD³⁷) gebracht werden. Der im folgenden angeführte Versuch zeigt die Möglichkeit einer derartigen Lösung der grobdispersen Teilchen.

Versuchsordnung. 20μ dicke Gefrierschnitte vom frischen, unfixierten Mäuseherzen wurden in der üblichen Art mit Nadi-Reagens 40 min lang behandelt. Die Schnittpräparate wiesen hiernach in den Muskelzellen reichlich Indophenol-blau-Körnchen auf. Ein Teil der Schnitte wurde in dest. Wasser überführt, während die restlichen in gesättigte Kochsalzlösung eingelegt wurden. Nach einer Einwirkungszeit von 30 min bzw. 36 Std wurden die Schnitte auf Objekt-träger aufgezogen und mikroskopisch untersucht.

Ergebnis. In den mit Kochsalzlösung behandelten Schnittpräparaten war gegenüber den unbehandelten Schnitten eine unschärfere Zeichnung der Konturen der Farb-Granula festzustellen. Ein Unter-

schied zwischen den 30 min und 36 Std behandelten Gefrierschnitten bestand nicht. In den Präparaten, auf welche dest. Wasser eingewirkt hatte, war nach 30 min keine Veränderung festzustellen, während nach 36 Std die Farbkörnchen vollkommen verschwunden waren; gleichzeitig hatten sich in den Schnitten zahlreiche, violett gefärbte Indophenolblau-Kristalle von nadelartigem Aussehen gebildet.

Schlußfolgerungen.

Wenn auch kein strikter Beweis mit den zur Verfügung stehenden Mitteln erbracht werden konnte, so führen doch die angestellten Versuche zum Schluß, daß es sich bei der Bildung der Farb-Granula im wesentlichen um die Ausflockung eines elektrokratischen, lyophoben Hydrosols handeln muß. Bei der Beurteilung dieser Versuche ist aber auch zu beachten, daß sich die Bildung der Farbkörnchen innerhalb der Zelle in dem kolloidalen Milieu des Protoplasmas abspielt, so daß daran zu denken ist, ob nicht auch Komponenten dieses kolloidalen Systems der Zelle an der Granulabildung beteiligt sind. Seit längerer Zeit ist bekannt, daß unter gewissen Umständen in hydrophilen Solen, wie es das Zellprotoplasma darstellt, Entmischungerscheinungen auftreten können, bei denen sich kolloidreiche, flüssige Strukturen bilden. Für diese strukturierten Gebilde führte BUNGENBERG DE JONG³⁶ den Ausdruck „Coacervat“ ein, den Vorgang der Coacervatbildung bezeichnete er als „Coacervation“. An sich sind Koagulation in hydrophilen, kolloidalen Systemen und Coacervation in ihrem Wesen nicht grundsätzlich verschieden. Die Bildung flüssiger, kolloidreicher Tropfen bei der Coacervation ist als Teilerscheinung der Ausflockung lyophiler Kolloide in Form amorpher Flocken aufzufassen. Die durch Koagulation entstandene Flocke darf man sich nach BUNGENBERG DE JONG nicht aus unregelmäßig geordneten, locker zusammenhängenden Micellen geformt vorstellen, sondern sie enthält unzählige, unter der Sichtbarkeitsgrenze des Mikroskops liegende Coacervatröpfchen als charakteristisches, architektonisches Moment. BUNGENBERG DE JONG unterscheidet nun je nach dem Bildungsmechanismus zwischen „einfacher Coacervation“, die auf Grund einer Desolvatation (gegebenenfalls bei gleichzeitiger Beseitigung einer capillarelektischen Ladung) vor sich geht, und einer „Komplexcoacervation“, bei der die Desolvatation durch einen capillarelektischen Gegensatz erst erzwungen wird. Während bei der eigentlichen Komplexcoacervation die Dehydratation durch Ladungsgegensatz zweier gleichzeitig anwesender hydrophiler Kolloide bedingt ist, erfolgt im Sonderfall der „Autokomplexcoacervation“ die Dehydratation durch Ladungsgegensatz an einerlei Art von Kolloidteilchen, hervorgerufen durch adsorbierte, entgegengesetzt geladene Ionen.

Für die Bildung der Indophenolblau-Granula scheidet die Coacervation des Indophenolblaus selbst von vornherein aus, denn es handelt sich bei diesem Farbstoff nicht um einen hydrophilen, sondern um einen elektrokratischen, hydrophoben kolloidalen Stoff. Da jedoch Indophenolblau einen fett- und lipoidlöslichen Farbstoff darstellt, wäre daran zu denken, daß es unter den Bedingungen der Gewebs-Nadi-Reaktion und Indophenolblau-Reaktion zur Coacervation der Baulipoide der Zelle kommt, wobei sich der Farbstoff Indophenolblau sekundär in diesen Lipoiden lösen würde. Für diese Erklärungsmöglichkeit spricht jedoch wenig, im Gegenteil weisen alle experimentellen Tatsachen darauf hin, daß es sich bei der Granulabildung um den zuerst diskutierten Fall einer einfachen Koagulation eines hydrophoben Kolloids handelt. Falls eine Coacervation der Zellipoide vorliegen würde, müßte es sich um einen Zustand handeln, der sich den Vorstellungen von DIETRICH⁷ weitgehend nähern würde, allerdings mit dem Unterschied, daß nicht präexistente, sondern während der Reaktion entstandene Fett- oder Lipoidtröpfchen angenommen würden. Durch die fluoreszenzmikroskopischen Versuche mit Rhodamin B und Pyronin (vgl. S. 752) wurde bereits nachgewiesen, daß Fette und Lipide am Aufbau der Granula nicht wesentlich beteiligt sind. Sodann gelang es nicht, mit der CZAPEKschen Probe⁴⁰, d. h. der Anwendung eines Gemisches von Amylenhydrat und Pyridin, trotz einer Einwirkungszeit bis zu 3 Tagen, ein Zusammenfließen der Zellipoide in der Herzmuskelzelle zu erreichen, obwohl dies nach Untersuchungen von CZAPEK⁴⁰ und STRUGGER³² an der Pflanzenzelle fast immer zum Erfolg führt. Wenn mit dieser Probe eine Coacervation nicht erreicht werden konnte, so ist es wenig wahrscheinlich, daß es unter den weniger eingreifenden und kürzere Zeit dauernden Bedingungen der Gewebs-Nadi-Reaktion zur Coacervation der Baulipoide des Zellplasmas kommen wird. Durch Zusatz von Natriumchlorid wird nach Versuchen von BUNGENBERG DE JONG die Coacervation in den meisten Fällen aufgehoben; daraufhin angestellte Versuche (s. oben) blieben ebenfalls erfolglos.

Die angestellten Erwägungen führen zum Schluß, daß die Coacervation bei der Bildung der Farb-Granula keine bedeutende Rolle spielen kann, sondern *es sich im wesentlichen um einen kolloidchemischen Ausflockungsvorgang* des Indophenolblaus selbst handeln muß. Bei diesem Vorgang bleibt aber weiterhin offen, welche Faktoren für die Lokalisation der Farb-Granula verantwortlich gemacht werden müssen.

Zusammenfassende Erörterung der Ergebnisse von Untersuchungen über die Rolle der Fette und Lipide bei der Farbstoffsynthese und der Bildung von Indophenolblau-Körnchen.

In den eigenen Modellversuchen konnte kein Anhalt dafür gewonnen werden, daß ungesättigte Fettsäuren (im Modellversuch Ölsäure) als

Indophenolblau-Bildner in Frage kommen können. Dieser Befund wurde weiterhin durch Untersuchungen an verfetteten Herzen bestätigt. Nach KAUFMANN und LEHMANN⁴¹ ist als einzige spezifische Fettfärbemethode die Färbung mit Nilblausulfat anzusehen. Hier gestattet eine Rotfärbung in jedem Fall den Schluß, daß an diesen Stellen ungesättigte Fettsäuren vorhanden sind, während Blaufärbung eine vollkommen unspezifische, gleichmäßig alle möglichen, von ungesättigten Fettsäuren freie Fettkombinationen tingierende Färbung darstellt. Die eigenen Färberversuche an verfetteten menschlichen Herzen zeigten eine sofort eintretende, leuchtend rote Färbung der gröberen Fettropfen (in einzelnen Zellen des Herzmuskels fand sich ausnahmsweise eine leuchtend blaue Anfärbung dieser gröberen Tropfen, die demnach hier anscheinend frei von ungesättigten Fettsäuren waren), während kleinere und feinste Tröpfchen keine oder nur geringe Rotkomponente der Färbung besaßen. Entsprechend den Ansichten von LISON¹⁸ müßte man erwarten, daß gerade diese bei Nilblausulfatanwendung rotgefärbten Gewebsbezirke besonders reichlich Indophenolblau-Bildung zeigen würden. Dies war jedoch nicht der Fall (vgl. S. 745), eben die gröberen Tropfen wiesen bei der Gewebs-Nadi-Reaktion nur eine mäßige violette Tönung auf, welche auf einfache, sekundäre Lösung des Farbstoffes zurückgeführt werden muß. Auch konnten die bei der Nilblausulfatfärbung im Gegensatz zur Norm blau gefärbten gröberen Tropfen nach der Gewebs-Nadi-Reaktion nicht von den übrigen Fettropfen unterschieden werden. Dagegen wiesen die infolge geringen Gehaltes an ungesättigten Fettsäuren nur rotviolett oder völlig blau gefärbten feineren und feinsten Tröpfchen nach der Gewebs-Nadi-Reaktion kräftige Blaufärbung auf. Wenn überhaupt eine durch ungesättigte Fettsäuren katalytisch bedingte, oxydative Farbbildung an diesen Schnitten des verfetteten Herzens aufgetreten ist, so kann sie gegenüber der fermentativen Indophenolblau-Synthese innerhalb der angewandten Reaktionszeit nicht von einer ins Gewicht fallenden Bedeutung sein. Für den Herzmuskel trifft demnach die Ansicht von LISON über die katalytische Wirkung ungesättigter Fettsäuren bei der Gewebs-Nadi-Reaktion und Indophenolblau-Reaktion nicht zu.

Ebenso konnte durch Modellversuche die Ansicht von REMESOW¹⁹ über die katalytische Wirkung von kolloidalem oder kristallisiertem Cholesterin bei der Gewebs-Nadi-Reaktion widerlegt werden.

Bei der zusammenfassenden Besprechung der Versuchsergebnisse über den Bildungsmechanismus der Indophenolblau-Granula möchte ich die eigenen Versuche im Zusammenhang mit den bisherigen Ansichten über die Entstehung der „Oxydase-Granula“ bei der Gewebs-Nadi-Reaktion und Indophenolblau-Reaktion besprechen. Hier standen sich bislang zwei Hypothesen gegenüber. DIETRICH⁷ sieht die Granulabildung an als eine sekundäre Lösung des im Zellprotoplasma

fermentativ gebildeten Farbstoffes in Tröpfchen von Fett oder Lipoiden, während SCHULTZE⁸, v. GIERKE⁹, GRÄFF^{10,11}, KATSUNUMA¹² u. a. annehmen, die Farbkörnchen würden in ihrer Lokalisation Ferment-Granula entsprechen. Die Anschauung von DIETRICH wurde seiner Meinung nach gestützt durch Untersuchungen an verfetteten Organen, wobei Fettfärbungen sich in ihrer Ausdehnung mit derjenigen der intensiven Blaureaktion der Indophenolblau-Synthese deckten, allerdings ging in einigen Fällen die Anhäufung feiner, scharf blauer Farbkörnchen über die Sudanfärbung hinaus. Der gleiche Befund wurde in den eigenen Versuchen an verfetteten Herzen festgestellt, doch konnte bei näherer Untersuchung kein Anhalt dafür gefunden werden, daß die Indophenolblau-Granula am *nicht* verfetteten Organ feinsten Fett- oder Lipidtröpfchen entsprechen, im Gegenteil ließ sich weder mit Fettfärbungen im Hellfeld oder im Fluoreszenzlicht eine Granuladarstellung erreichen, noch verhinderte Entfettung der Schnitte vom gesunden Herzen die Bildung von Farbkörnchen bei der Indophenol-Reaktion oder Gewebs-Nadi-Reaktion. Bereits 1915 hatte KATSUNUMA¹² bei Untersuchungen über die Indophenolblau-Synthese der Nerven in vielen Fällen an oxydasepositiven Ganglienzellen negativen Ausfall der Lipoidfärbungen gesehen. Auch wenn man der Ansicht ist, es könne sich bei den von DIETRICH angenommenen Lipidtröpfchen um nicht durch Alkohol-Äther aus der Zelle herauslösbare Lipoideiweiß-Komplexe handeln, so müßte doch in jedem Fall gefordert werden, daß diese hypothetischen Granula gegenüber Fettfärbungsmitteln, zu denen in diesem Fall auch das Indophenolblau rechnen würde, in gleicher Weise reagieren. Es dürften dann nicht wie in den eigenen Versuchen differente Färbegergebnisse zwischen Sudan III, Nilblausulfat sowie den Fluorochromen Rhodamin B und Pyroninbase einerseits und andererseits der Indophenolblau-Synthese bei der Gewebs-Nadi-Reaktion und Indophenolblau-Reaktion zu beobachten sein. Dieser Gegensatz wird besonders deutlich, wenn man die Lipofuscin-Granula zum Vergleich heranzieht. Das Abnutzungspigment zeigt nämlich vor und nach Entfettung (vgl. S. 750) der Schnittpräparate in gleicher Weise positive Reaktion sowohl gegenüber Nilblausulfat wie auch der Indophenolblau-Reaktion und Gewebs-Nadi-Reaktion. Hier könnte man mit Recht der Meinung sein, es handle sich um einen nicht durch Alkohol-Äther herauslösbaren Lipoideiweißkomplex. Aus den eigenen Untersuchungen geht aber doch hervor, daß dann, wenn Zellfett in mikroskopisch sichtbarer Größenordnung innerhalb des Protoplasmas vorhanden ist, in verfetteten Bezirken die Fetttropfen das gebildete Indophenolblau aufnehmen und speichern, gleichzeitig fehlt an diesen Örtlichkeiten die Bildung feinsten Indophenolblau-Granula.

Wenn auch nach den eigenen Versuchen sich für nicht verfettetes Gewebe die Hypothese von DIETRICH nicht mehr halten läßt, so darf in

dieser Tatsache aber andererseits kein Beweis dafür gesehen werden, daß die Lagerung der Indophenolblau-Körnchen unbedingt präexistenten Ferment-Granula oder Fermentansammlungen anderer Art entsprechen würde. Zwar glaubte KATSUNUMA mit einer allerdings ungeeigneten Methode nachgewiesen zu haben, daß entsprechend der Lokalisation der Indophenolblau-Granula sich in den Zellen eine Ansammlung von in organischer Bindung befindlichem Eisen (wie er meint Fermenteisen) finden würde und damit wenigstens sehr wahrscheinlich die Farbkörnchen selbst die Lokalisationsstellen der Oxydase darböten, doch beweisen die eigenen Untersuchungen, daß es sich bei den Eisenkörnchen von KATSUNUMA um Kunstprodukte handelt. Unverständlich bliebe es auch, daß in den Fällen, wo es bei der Gewebs-Nadi-Reaktion am fixierten oder unfixierten Gewebe zu einer sehr kräftigen Färbung der Leukocyten kam, regelmäßig in der Umgebung dieser eine stärkere und vermehrte Bildung von Indophenolblau-Granula auch in den benachbarten Muskelzellen zu sehen war. Diese vermehrte Bildung von Farbkörnchen in der Umgebung der Blutleukocyten kann doch wohl kaum darauf zurückgeführt werden, daß gerade hier auch in den Muskelzellen eine Ansammlung der Gewebs-Oxydase vorhanden sei. Vielmehr führt allem Anschein nach die oxydative Bildung des Farbstoffes durch die Leukocyten-Oxydase zu einer Konzentrationserhöhung des gebildeten Indophenolblaus auch in der Umgebung der Granulocyten und dadurch zur Ausfällung des Farbstoffes.

Die eben genannten Beobachtungen veranlaßten mich zu einer näheren Untersuchung der physikochemischen Bedingungen des Vorganges der Farbkörnchenbildung. Der in der Zelle gebildete Farbstoff Indophenolblau stellt eine in Wasser nur wenig, dagegen in Lipoiden und Lipoidlösungsmitteln sehr gut lösbare Substanz dar. Überläßt man das Reaktionsgemisch der Gewebs-Nadi-Reaktion oder Indophenolblau-Reaktion an der Luft der Selbstoxydation, so kommt es bei der Farbbildung zum Zusammentritt von Farbmolekeln unter Bildung kolloid-disperser Aggregate, wie der nun leicht nachweisbare TYNDALL-Effekt und die ultramikroskopischen Untersuchungen der Farblösung zeigen konnten. Zusätzliche Farbstoffproduktion führt dann unter Vergrößerung dieser zunächst nur ultramikroskopischen Teilchen zur Niederschlagsbildung größerer, amorpher Farbkörnchen. Der gleiche Vorgang spielt sich anscheinend auch in der Zelle bei der fermentativen Indophenolblau-Synthese ab. Wenn es auch wenigstens sehr wahrscheinlich ist, daß in der Zelle die Granulabildung auf Grund eines physikochemischen, kolloidalen Geschehens vor sich geht, so ist damit aber noch nichts über die Lokalisation der Farbkörnchen gesagt. Unter Berücksichtigung der vorwiegend regelmäßigen Lagerung der Indophenolblau-Granula in den Herzmuskelzellen ist anzunehmen, daß bestimmte Faktoren für diese Lokalisation verantwortlich gemacht

werden müssen. Die einfachste Erklärungsmöglichkeit ergibt sich aus der Struktur der Herzmuskelzelle selbst. Wie bereits früher betont, finden sich in der Herzmuskelzelle die Farbkörnchen vorwiegend perlschnurartig angeordnet in den interfibrillären Räumen. In diesen Zellbezirken ist aber die Dichte des Protoplasmas geringer als in den Fibrillen, so daß sich der Farbstoff infolge von besseren Lösungs- und Diffusionsbedingungen an erster Stelle in diesen Räumen anreichern und zu kolloidalen Ausfällungen Anlaß geben wird. Andererseits kann die Ausbildung von granulaartigen Niederschlägen in der Zelle am frühesten dort erfolgen, wo „Flockungskeime“ vorhanden sind. Als derartige Kondensationskerne der intracellulären Niederschlagsbildung könnten an sich alle in der Zelle vorgebildeten Strukturen je nach den Reaktionsbedingungen wirksam sein, jedoch scheiden als Bildner der Indophenolblau-Granula bei den Bedingungen der Gewebs-Nadi-Reaktion und Indophendblau-Reaktion in der Herzmuskelzelle die bisher bekannten Strukturelemente der Zelle von mikroskopisch sichtbarer Größenordnung aus, wie empirisch die eigenen Untersuchungen zeigen konnten. Nicht als typische Indophenolblau-Körnchen anzusprechende Gebilde von mikroskopisch sichtbarer Dimension, welche den Farbstoff Indophenolblau aufnehmen können, wurden in den Lipofuscin-Granula und den Fetttröpfchen gefunden.

Vergegenwärtigt man sich die heute bekannten Tatsachen über den Aufbau des Protoplasmas, so können hier meines Erachtens nach Anhaltspunkte gefunden werden, welche Zellbestandteile gegebenenfalls als derartige Kondensationskeime in Frage kommen können. Bekanntlich stellt das Zellprotoplasma kolloidchemisch keine homogene Eiweißphase dar, sondern ist ein mosaikartig aus Lipoiden und Eiweißen aufgebautes Gebilde. Diese mosaikartige Struktur ist zwar lichtoptisch nicht nachzuweisen, doch konnte JUNG⁴² sie elektronenoptisch an Erythrocyten sehr schön zur Darstellung bringen. Diese Lipotide sind zum Teil an Eiweiße gebunden, wie auch aus Untersuchungen von DIETRICH⁷ hervorgeht, nach denen der in jeder Zelle normalerweise vorhandene Bestand an Zellfett in den meisten Fällen nicht färberisch zu erfassen ist und andererseits nach Eiweißverdauung über das Maß der sonst extrahierbaren Fettmenge ein weiterer Teil freigesetzt wird. Kommt es nun in der Zelle bei der Gewebs-Nadi-Reaktion oder Indophenolblau-Reaktion zur Synthese von Indophenolblau, so können sich diese Lipoidkomplexe submikroskopischer Größenordnung mit Farbstoff beladen und dann nach Farbsättigung als Kondensationskerne für die Ausbildung mikroskopisch sichtbarer Granula wirken, indem sie als Attraktionszentren weitere Farbmolekel anlagern. Als drittes ist daran zu denken, daß der Farbstoff elektroadsorptiv oder auf Grund VAN DER WAALSscher Kräfte an Plasmaeiweißkörper gebunden werden könnte und daß diese adsorbierten Farbmolekel als Kondensationskerne wirken würden.

Eine Entscheidung zugunsten der einen oder anderen Erklärungsmöglichkeit läßt sich zur Zeit mit den mir zur Verfügung stehenden Mitteln nicht fällen. Möglicherweise sind alle drei genannten Faktoren für die Granulabildung von Bedeutung. Daß jedoch im Protoplasma der Zelle Bedingungen vorhanden sind, welche sich auf die Lokalisation der Farbkörnchen auswirken können, geht nicht nur aus der meist regelmäßig angeordneten Lagerung der Körnchen hervor, sondern läßt auch ein Untersuchungsbefund von HOLLANDE²² vermuten. Dieser fand bei einer Färbung von Gewebsschnitten mit einer Lösung des fertigen Oxydationsproduktes (eine alkoholische Lösung des Farbstoffes Indophenolblau wurde zu diesem Zweck mit Wasser verdünnt, worauf der gleiche Ausflockungsvorgang eintrat wie im Reaktionsgemisch der Oxydase-Reaktionen), also kolloidalem Indophenolblau, genau dieselben „Strukturen“ angefärbt, wie bei den Oxydase-Reaktionen selbst.

HOLLANDE ging allerdings bei der Beurteilung seines Versuches weiter und bestritt die Möglichkeit einer Fermentnatur der Oxydase-Reaktionen mit α -Naphthol + Dimethyl-p-Phenylendiamin überhaupt. Wie aus den mitgeteilten eigenen Versuchen sofort geschlossen werden kann und wie unter anderen auch bereits RIES⁴³ betont, schießt HOLLANDE jedoch mit dieser Schlußfolgerung über das Ziel hinaus. Es muß schärfstens unterschieden werden zwischen der eigentlichen, fermentativ katalysierten Farbstoffsynthese und der nach physikalisch-chemischen Bedingungen ablaufenden Bildung von Farbkörnchen. Der Mangel einer derart scharfen Trennung dieser beiden Abschnitte der Oxydase-Reaktionen (Gewebs-Nadi-Reaktion und Indophenolblau-Reaktion) nicht nur bei HOLLANDE, sondern auch bei den meisten früheren Untersuchungen war Ursache eines Teiles der Kontroversen in der bis zu den eigenen Versuchen nicht abgeschlossenen Diskussion über die Indophenolblau-Synthese im histologischen Schnittpräparat und die dabei auftretende Farb-Granulabildung.

Zusammenfassung.

1. In der Reaktionsmischung nach GRÄFF zur Gewebs-Nadi-Reaktion können, ohne Änderungen des Reaktionsablaufes und -ausfalles befürchten zu müssen, Dimethyl-p-Phenylendiamin-chlorhydrat, -sulfat und -base gegenseitig ausgetauscht werden.
2. Die Gewebs-Nadi-Reaktion des unfixierten, gesunden Herzmuskels und der Leukocyten ist eine Reaktion des WARBURG-KEILIN-Systems der intracellulären Atemfermente. Ein nicht fermentativ katalysierter Reaktionsanteil wird an den Granulocyten und der gesunden Herzmuskelzelle nicht beobachtet.
3. Auch die Gewebs-Nadi-Reaktion am fixierten Herzmuskel wird durch das gleiche System der Atemfermente der Zellen hervorgerufen.
4. Fixierung des Gewebes verzögert allein schon durch Diffusionshemmung den Eintritt und die Geschwindigkeit der Indophenolblau-

Synthese. Eine unmittelbare Hemmwirkung von Formol auf die Fermentaktivität anzunehmen, ist daher nicht unbedingt erforderlich.

5. Ebenso wie die Gewebs-Nadi-Reaktion muß die Indophenolblau-Reaktion nach WINKLER-SCHULTZE auf Wirkung der sauerstoffübertragenden Zellfermente (Cytochromoxydase-Cytochrom-Komplex) zurückgeführt werden.

6. In Modellversuchen konnte kein Anhalt dafür gefunden werden, daß kristallisiertes oder kolloidales Cholesterin im Sinne von REMESOW als Indophenolblau-Bildner wirken könnten.

7. Ebenso schied Ölsäure (als Beispiel der ungesättigten Fettsäuren) als katalytisch wirkende Substanz aus. Gleiche negative Ergebnisse ergaben Versuche mit Lecithin und menschlichem Fett.

8. Die Indophenolblau-Granula stellen in keinem Fall in der gesunden Zelle feinste Fett- oder Lipoidtröpfchen dar. Andererseits können aber in verfetteten Organen derartige Tröpfchen den Farbstoff Indophenolblau aufnehmen und speichern, so daß in diesen Fällen Täuschungsmöglichkeiten gegeben sind.

9. Nach fluoreszenzmikroskopischen Färbeversuchen mit Rhodamin B und der Pyroninbase liegt das Baufett der Zelle mikroskopisch in diffus verteilter Form vor.

10. Das organisch gebundene Zelleisen ist gleichmäßig, diffus in der Zelle verteilt. Die gegenteilige Beobachtung von KATSUNUMA beruht auf der Verwendung einer ungünstigen Methode, bei der es in jedem Fall zu Niederschlägen kommen muß, die jedoch als Kunstprodukte anzusprechen sind. Auf Grund der eigenen Versuche ist eine granulartige Verteilung der eisenhaltigen Atemfermente der Zelle nicht anzunehmen, damit entfällt auch die Möglichkeit zur Ansicht, die Indophenolblau-Körnchen bei der Gewebs-Nadi-Reaktion und Indophenolblau-Reaktion könnten in oder an eisenhaltigen Ferment-Granula gebildet werden.

11. Überläßt man das Reaktionsgemisch der Gewebs-Nadi-Reaktion an der Luft der Selbstoxydation, so kommt es zum Zusammentritt von Farbmolekeln unter Bildung zunächst kolloiddisperser und später auch mikroskopisch sichtbarer Teilchenaggregate.

12. Mit großer Wahrscheinlichkeit läuft auch im Gewebsschnitt die Granulabildung als physikochemische Niederschlagsbildung ab.

13. Die Lokalisation der Farbkörnchen kann möglicherweise bedingt sein durch Konzentrationserhöhung in einem bestimmten Areal auf Grund besserer Lösungs- und Diffusionsbedingungen, Wirkung submikroskopischer Lipoidkomplexe als Attraktionszentren oder aber Adsorption des Farbstoffes an Eiweißkomponenten des Zellprotoplasmas.

14. Koazervation im strengen Sinne von BUNGENBERG DE JONG kann nach den angestellten Erwägungen und Versuchen keine bedeutende Rolle bei der Granulabildung spielen.

Literatur.

- ¹ EHRLICH, P.: Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus, eine farbenanalytische Studie. Berlin 1885. — ² WURSTER: Ber. dtsh. chem. Ges. **19**, 3196 (1886). — ³ RÖHMANN, F., u. W. SPITZER: Ber. dtsh. chem. Ges. **28**, 569 (1895). — ⁴ WINKLER, F.: Fol. haemat. (Lpz.) **4**, H. 3 (1907). — ⁵ DIETRICH, A., u. LIEBERMEISTER: Zbl. Bakter. **32**, 858 (1902). — ⁶ MEYER, A.: Zbl. Bakter. **34**, 578 (1903). — ⁷ DIETRICH, A.: Zbl. Path. **19**, 3 (1908). — Erg. Path. **13**, 283 (1910). — ⁸ SCHULTZE, W. H.: Beitr. path. Anat. **45**, 127 (1909). — Münch. med. Wschr. **1909**; **1910 II**, 2171. — Zbl. Path. **28**, 8, 257 (1917). — ⁹ GIERKE, E. v.: Münch. med. Wschr. **1911**. — Zbl. Path. **27**, 318 (1916). — ¹⁰ GRÄFF, S.: Frankf. Z. Path. **11**, 358 (1912). — ¹¹ GRÄFF, S.: Zbl. Path. **27**, 313 (1916); **32**, 337 (1922); **35**, 481 (1924/25). — Beitr. path. Anat. **70**, 1 (1922). — ¹² KATSUNUMA, S.: Beitr. path. Anat. **60**, 150 (1915). — Intracelluläre Oxydation und Indophenolblausynthese. Histochemische Studie über die „Oxydasereaktion“ im tierischen Gewebe. Jena: Gustav Fischer 1924. — ¹³ QUINCKE, H.: Arch. f. Anat. **1868**, 757. — ¹⁴ WARBURG, O.: Über den Stoffwechsel der Tumoren. Berlin: Springer 1926. — Über die katalytischen Wirkungen der lebendigen Substanz. Berlin: Springer 1928. — Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten. Berlin: Saenger 1948. — ¹⁵ SEHRT, E.: Virchows Arch. **273**, 701 (1929). — ¹⁶ KEILIN, D., and E. F. HARTREE: Proc. roy. Soc. Lond. B. **122**, 298 (1937); **125**, 171 (1938). — ¹⁷ STOTZ, E., A. E. SIDWELL jr. and T. R. HOGNESS: J. of biol. Chem. **124**, 733 (1938). — STOTZ, E., A. M. ALTSCHUL and T. R. HOGNESS: J. of biol. Chem. **124**, 745 (1938). — STOTZ, E.: J. of biol. Chem. **131**, 555 (1939). — ¹⁸ LISON, L.: Bull. Soc. Chim. biol. Paris **18**, 185 (1936). — Histochemie animale. Paris: Gauthier-Villars 1936. — ¹⁹ REMESOW, I.: Virchows Arch. **285**, 591 (1932). — ²⁰ ROMELS, B.: Mikroskopische Technik. München: Leibniz 1948. — ²¹ HALLHEIMER, S.: Beitr. path. Anat. **73**, 80 (1925). — ²² HOLLANDE, A. CH.: C. r. Acad. Sci. Paris **178**, 1924. — Bull. Soc. Chim. biol. Paris **18**, 185 (1936). — ²³ KORDATZKI, W.: Taschenbuch der praktischen pH-Messung. München: Müller & Steinicke 1938. — ²⁴ SCHULTZ-BRAUNS, O.: Zbl. Path. **50**, 273 (1931); **54**, 225 (1932). — Klin. Wschr. **1931 I**, 113. — ²⁵ SCHMORL, G.: Die pathologisch-histologischen Untersuchungsmethoden. Berlin: F. C. W. Vogel 1934. — ²⁶ VOGT, H.: Pharmaz. Z. Halle **87**, 38 (1948). — ²⁷ LETTRÉ, H., u. R. LETTRÉ: Naturwiss. **34**, 127 (1947). — ²⁸ DRESEL, K.: Biochem. Z. **178**, 70 (1926). — ²⁹ BALL, E. G.: Biochem. Z. **295**, 262 (1938). — ³⁰ MAGRI, V.: Arch. Sci. med. **58**, 685 (1934). — ³¹ DRAWERT, H.: Planta (Berl.) **29**, 376 (1939). — ³² STRUGGER, S.: Flora (Jena) **131**, 113 (1936); **135**, 101 (1941). — Arch. exper. Zellforsch. **29**, 199 (1937). — Protoplasma (Berl.) **30**, 85 (1938). — ³³ FREY-WYSSLING, A.: Submikroskopische Morphologie des Protoplasmas und seiner Derivate. Berlin: Borntraeger 1938. — ³⁴ KOCKEL, H., jr.: Virchows Arch. **277**, 856 (1930). — ³⁵ MACALLUM, A. B.: Erg. Physiol. **7**, 567 (1908). — ABDERHALDENS Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Bd. V/2, S. 1099—1147. Berlin u. Wien: Urban & Schwarzenberg 1925. — ³⁶ BUNGENBERG DE JONG, H. G.: Protoplasma (Berl.) **15**, 110 (1932). — ³⁷ OSTWALD, Wo.: Begriff und Systematik der Kolloidwissenschaft. Kolloidchemisches Taschenbuch, herausgeg. von Dr. A. KUHN. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft 1944. — ³⁸ PALLMANN, H.: Koagulation. Kolloidchemisches Taschenbuch. Leipzig 1944. — ³⁹ BUZÁGH, A. v.: Dissolution und Peptisation. Kolloidchemisches Taschenbuch. Leipzig 1944. — ⁴⁰ CZAPEK, F.: Ber. dtsh. bot. Ges. **37**, 212 (1919). — ⁴¹ KAUFMANN, C., u. F. LEHMANN: Virchows Arch. **261**, 623 (1926); **270**, 360 (1928). — Zbl. Path. **37**, 145 (1926). — ⁴² JUNG, F.: Klin. Wschr. **1947 I**, 459. — ⁴³ RIES, E.: Grundriß der Histophysiologie. Allgemeine Methoden und Probleme. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft 1938.