

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

**Die Fluorochromierung des lebenden, überlebenden und toten  
Protoplasmas mit dem basischen Farbstoff Acridinorange  
und ihre Beziehung zur Stoffwechselaktivität der Zelle\*.**

Von  
**NORBERT SCHÜMMELFEDER.**

Mit 7 Textabbildungen.

(*Eingegangen am 27. Juni 1949.*)

Einleitung. — Die bisherige Verwendung des basischen Fluorochroms Acridinorange in der experimentellen Zellforschung. A. Eigene Methoden. B. Untersuchungen über Speicherung von Acridinorange im Herzmuskel. C. Einfluß von Cyan auf die Acridinorangespeicherung. D. Die Beziehungen zwischen Acridinorangespeicherung und Glykolyse in Zellen. — Zusammenfassende Erörterung der Versuchsergebnisse. — Zusammenfassung. — Literatur.

**Einleitung.**

Zellen oder Zellorte hoher „Oxydaseaktivität“ oder besser gesagt hoher Konzentration und Aktivität des Cytochromoxydase-Cytochromsystems (vgl. SCHÜMMELFEDER<sup>1</sup>) müssen ein entsprechend hohes Oxydationspotential aufweisen. Bei Untersuchungen über den Sekretionsmechanismus des Kammerwassers konnten FRIEDENWALD und STIEHLER<sup>2</sup> diese Parallelität am Ciliarkörper des Auges nachweisen. Die epithelialen Zellen zeigten im Gegensatz zum Stroma sowohl eine starke Oxydasereaktion wie auch (bei Anwendung von Redoxindikatoren) ein hohes Redoxpotential. Diese normalerweise vorhandenen Potentialdifferenzen zwischen Epithel und Stroma fehlten, wenn das Fermentsystem inaktiviert wurde.

Derartige Potentialdifferenzen zwischen Zellen verschieden hoher Oxydaseaktivität könnten sich, sofern keine weiteren Faktoren mit- oder entgegenwirken, auf das Maß der Permeation und Speicherung von Ionen in das Protoplasma der Zelle auswirken, indem Anionen (z. B. saure Farbstoffe) in oxydasenegative Zellen mit geringerem Redoxpotential stärker eindringen oder gespeichert werden als in oxydasepositiven Zellen mit höherem Oxydationspotential, während in umgekehrter Richtung Kationen (z. B. basische Farbstoffe) in Zellen mit hohem Redoxpotential verstärkt permeieren bzw. gespeichert werden. FRIEDENWALD und STIEHLER betrachteten den Transport von Ionen

\* Die Arbeit hat als Habilitationschrift (Teil II) der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Landesuniversität Münster vorgelegen.

(z. B. Farbionen) und auch von Wasser im Ciliarkörper unter diesen Gesichtspunkten, auch machte bereits 1930 NASSONOV<sup>3</sup> die Hemmung oxydativer Prozesse im Zellprotoplasma für das Auftreten vitaler Kärfarbungen (d. h. des Farbstofftransports vom Plasma zum Kern) mit basischen Farbstoffen im Sauerstoffmangel verantwortlich.

Die Verhältnisse sind allerdings zumindest in manchen Zellen dadurch unübersichtlicher, daß dort die Sauerstoffatmung für die Erhaltung der Struktur der Plasmakolloide wesentlich zu sein scheint. So stellte z. B. RUNNSTRÖM<sup>4</sup> an Eizellen nach der Befruchtung gleichlaufend mit dem Anstieg der Zellatmung eine „Verfeinerung der Struktur des Cytoplasmas“ fest, welche durch Cyanvergiftung ( $m/5000$  oder  $m/10000$  KCN) sowie Sauerstoffmangel rückgängig gemacht werden konnte. Dieser optisch feststellbaren Strukturverfeinerung des Cytoplasmas nach der Befruchtung entsprach eine größere Stabilität der Plasmakolloide gegenüber dem unbefruchteten Ei, die sich unter anderem in der Empfindlichkeit gegenüber Wärme, Narkotica, Coffein,  $p_H$ -Änderungen und hypotonischen Lösungen zeigte. GERSH und RIES<sup>5</sup> wiesen dann in ihren Vitalfärbungsversuchen nach, daß gleichzeitig mit der Verfeinerung der Struktur der Plasmakolloide und dem Anstieg der Zellatmung (deutlich auch an dem Auftreten einer positiven Gewebs-Nadireaktion nach der Befruchtung) basische Farbstoffe von der befruchteten Eizelle im Gegensatz zur unbefruchteten in verstärktem Maß aufgenommen wurden. Allerdings führt RIES<sup>6</sup> selbst die Steigerung der vitalen Färbbarkeit mit basischen Farbstoffen nicht auf die Atmungssteigerung sondern auf die Änderung der kolloidalen Struktur des Cytoplasmas zurück; ebenso werden von ihm die Versuchsergebnisse von NASSONOV gedeutet als Auswirkungen von Änderungen der submikroskopischen Feinstruktur der Kerneweißkörper. RUNNSTRÖM<sup>4</sup> untersuchte unter Verwendung des basischen Farbstoffes Brillantkresylblau und des sauren Lichtgrüns die Unterschiede in der Vitalfärbung unbefruchteter (gering atmender) und befruchteter (stark atmender) Eier von *Holothuria* genauer. Er fand unter anderem bei Färbungen mit Brillantkresylblau bei einem  $p_H$  von 6,6—6,7 nur eine Anfärbung der befruchteten oder zur Entwicklung angeregten Eier, während die unerregten oder unbefruchteten Eizellen keine Farbstoffspeicherung zeigten.

Zwar ist somit mehrfach beobachtet, daß Zellen höherer Oxydaseaktivität basische Farbstoffe in stärkerem Ausmaß speichern können, doch fehlen Untersuchungen, ob entsprechend einer Senkung des Oxydationspotentials durch Fermentgifte auch eine Hemmung der Farbstoffspeicherung erreicht werden kann. Falls dieser Befund erhoben werden könnte, wären wirklich Ausmaß der Farbstoffadsorption (soweit diese nicht bedingt ist durch elektrostatische Bindung an Plasma-

eiweißkörper) und Oxydationspotential unmittelbar gekoppelt, während sie andererseits zwei unabhängig voneinander vorhandene Zelleigenschaften darstellen würden.

Im Zusammenhang mit den obigen Betrachtungen scheint mir eine bisher kaum beachtete Untersuchung von MUNEO YABUSOE<sup>7</sup> wesentlich zu sein. Dieser veröffentlichte bereits 1926 auf Veranlassung von W. SCHOELLER und O. WARBURG aus dem Kaiser-Wilhelm-Institut für Biologie eine Arbeit „Über Hemmung der Tumorglykolyse durch Anilinfarbstoffe“. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß eine Reihe von Anilinfarbstoffen die Tumorglykolyse elektiv hemmte. Am wirksamsten zeigten sich Triphenylmethan- und Chinolinfarbstoffe, aber auch Acridinderivate wie Trypaflavin, Acridinorange u. a. waren wirksam.

MINAMI<sup>8</sup> konnte unter der Leitung von O. WARBURG durch Hemmungsversuche den Nachweis erbringen, daß die fermentative Glykolyse in der Zelle an der Oberfläche von Strukturelementen vor sich gehen muß, da z. B. Heptylalkohol in der lebenden Hefe und im Carcinomgewebe den anaeroben Kohlenhydratabbau um 100% hemmte, während in der strukturfreien Fermentlösung des Hefepreßsaftes durch Heptylalkohol die Glykolyse nur zu 12% hemmbar war. Zwar erreichten in den Versuchen von YABUSOE die Werte der Hemmung durch Anilinfarbstoffe nicht diejenigen des Heptylalkohols, aber immerhin zeigte z. B. Malachitgrün eine 70%ige, Trypaflavin 26%ige und Acridinorange 17%ige Hemmung der Glykolyse im FLEXNER-JOBLINGSchen Rattenkarzinom. Obwohl bislang hierfür der strenge Nachweis nicht erbracht ist, kann man in Analogie zum Verhalten des Heptylalkohols annehmen, daß es sich bei der Wirkung der Anilinfarbstoffe ebenfalls um Blockade wirksamer Oberflächen handelt.

Seit den Arbeiten von PASTEUR, MEYERHOF, WARBURG<sup>9</sup> u. a. ist bekannt, daß nicht nur die Carcinomzelle, sondern grundsätzlich jede Zelle in ihrem Kohlenhydratstoffwechsel eine anaerob ablaufende Phase des Stoffumsatzes aufweist, die in den meisten Fällen nur deshalb nicht nach außen hin in Erscheinung tritt, da deren Spaltprodukte (Milchsäure bzw. Triosephosphorsäure) durch Resynthese oder aeroben Abbau verschwinden. Atmung und Glykolyse bedingen demnach im wesentlichen die Stoffwechselleistung der Zelle soweit es sich um energieliefernde Prozesse handelt. Beide, Atmung und Glykolyse, sind zwar gekoppelt, stellen aber keine voneinander abhängige Größen dar, wie auf der einen Seite Tumorgewebe mit überwiegender Glykolyse und auf der anderen Seite ausgewachsenes epitheliales Gewebe mit überwiegendem oxydativen Stoffwechsel zeigt.

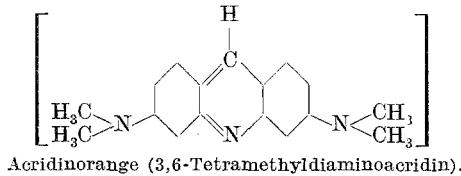
Da in jeder Zelle ein gewisses Maß an Glykolyse abläuft, müßte es theoretisch wenigstens möglich sein, bei genügend empfindlichen

Nachweismethoden an glykolytisch wirksame Oberflächen adsorbierte Farbstoffe nachzuweisen.

In dem oben dargestellten Zusammenhang interessierte mich die Frage, ob am Herzmuskelgewebe die Speicherung bestimmter basischer Farbstoffe von der Intensität des Zellstoffwechsels abhängig ist und durch Hemmung der Atemfermente oder der glykolytischen Tätigkeit der Zelle eine Änderung in der Farbstoffspeicherung erreicht werden kann.

Bei der Lösung der Frage, ob die Stoffwechselaktivität des Protoplasmas die Färbbarkeit beeinflusse, war die Verwendung organischer Farbstoffe im Helllicht (Diachrome) wenig aussichtsreich, da infolge der hier zur Färbung erforderlichen hohen intracellulären Farbstoffkonzentration (1:100 bis 1:1000) im Gewebe Mengenunterschiede geringerer Art nur wenig oder überhaupt nicht im Protoplasma unterscheidbar sein konnten. Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorochrome) anzuwenden, war hier die einzige erfolgversprechende Möglichkeit. Im Fluoreszenzmikroskop können Zellstrukturen bereits als fluorochromiert erkannt werden, wenn sie den Farbstoff im Verhältnis 1:5000 bis 1:50000 gespeichert haben (STRUGGER<sup>10</sup>). Unter den in der Literatur angegebenen Fluorochromen schien mir der bereits oben erwähnte Farbstoff Acridinorange (3,6-Tetramethyldiaminoacridin) sehr geeignet zu sein, da er in seinen physikochemischen Eigenschaften gut durchuntersucht (vgl. STRUGGER<sup>10</sup>) worden ist. Neben seiner glykolysehemmenden Wirkung war das wesentlichste Moment für die Wahl dieses Farbstoffes die Tatsache, daß Acridinorange im Ultraviolett- und Blaulicht eine konzentrationsabhängige Farbänderung von grün über gelb und orange zu kupferrot zeigt (STRUGGER), wodurch erst Aussagen über das Ausmaß der Farbstoffadsorption ermöglicht werden. Durch die Untersuchungen von STRUGGER und Mitarbeitern an Pflanzenzellen, Bakterien und Hefe war bereits gezeigt worden, daß die Plasmakolloide bei Schädigungen sehr empfindlich mit einer Steigerung der Adsorption von Acridinorange reagieren. Der genannte Effekt war es, der es STRUGGER ermöglichte, mit Hilfe von Acridinorange lebende und tote Zellen voneinander zu unterscheiden. Diese Eigenschaft des Protoplasmas mußte bei den eigenen Untersuchungen eingehend berücksichtigt werden, da sie die von mir erwarteten Konzentrationsunterschiede des Farbstoffes in Zellen verschieden hoher Stoffwechselaktivität verdecken oder überlagern konnte. Da sich außer einigen wenigen Angaben (STRUGGER<sup>1</sup>, KREBS<sup>11</sup>) im Schrifttum keine Anhaltspunkte für die Vitalfluorochromierung tierischer oder menschlicher Zellen oder die Anfärbung toten Gewebes mit Acridinorange finden ließen, war zum Zwecke der eigenen Versuche die Methodik vorwiegend neu auszuarbeiten.

*Die bisherige Verwendung des basischen Fluorochroms Acridinorange in der experimentellen Zellforschung.*



Acridinorange (3,6-Tetramethyldiaminoacridin).

Acridinorange (3,6-Tetramethyldiaminoacridin) wurde erst 1940 von STRUGGER<sup>10</sup> und von BUKATSCH und HAITINGER<sup>12</sup> unabhängig voneinander zur Fluorochromierung von Zellen angewandt. Eine Zusammenfassung der bisher erreichten Ergebnisse brachte der erstere kürzlich in den „Naturwissenschaften“. In meinem Überblick kann ich im wesentlichen auf diese Darstellung zurückgreifen. STRUGGER und Mitarbeiter benutzten das Acridinorange zu planmäßigen zellphysiologischen Arbeiten an lebenden und toten Pflanzenzellen. Quantitative Untersuchungen über das Verhalten des Acridinorange stellte KÖLBEL<sup>13</sup> unter der Leitung von STRUGGER mit Hefezellen an.

Acridinorange ist ein basischer, kathodischer Farbstoff. Seine Dissoziationskurve wurde von KÖLBEL colorimetrisch bestimmt (vgl. Abb. I). Nachdem JENSEN<sup>14</sup> zeigen konnte, daß Acridinorange in verdünnter Lösung im dissozierten Zustand schwach grün und im undissozierten stark grün fluorescierte, stellt STRUGGER als hervorstechendes Merkmal dissoziierter Acridinorangelösungen den „Konzentrationseffekt“, d. h. eine Abhängigkeit der Fluoreszenzfarbe von der Konzentration einer wässrigen Lösung fest. Sehr konzentrierte Lösungen (1:100) fluorescieren kupferrot bis blutrot, weniger starke Lösungen (1:1000) leuchten kräftig gelbgrün und schwache Lösungen von Acridinorange (1:10 000) zeigen eine grüne Fluoreszenzfarbe. Molekulare Lösungen der Farbbase weisen diesen Konzentrationseffekt nicht auf. Weiterhin stellten STRUGGER<sup>10</sup> und KÖLBEL<sup>13</sup> eine besonders hohe Einlagerungsfähigkeit dieses Farbstoffes in lebendes Protoplasma fest, welche die anderer basischer Fluoreszenzfarbstoffe (z. B. Auramin) weit übertrifft. Am Beispiel der oberen Epidermis der Zwiebelschuppe von *Allium cepa* konnte die p<sub>H</sub>-Abhängigkeit der Fluorochromierung lebender und toter Zellen gezeigt werden. Tabelle 1 bringt die dabei gefundenen Ergebnisse.

STRUGGER schreibt hierzu: „Das Verhalten der Zellmembranen fügt sich in das gewohnte Bild, wie wir es vom Neutralrot kennen, ein. Um p<sub>H</sub> 3 ist die Zellulose elektrisch weitgehend entladen und läßt nur eine Imbibition durch das Acridinorange in grüner Fluoreszenzfarbe erkennen, während bei höheren p<sub>H</sub>-Werten, solange der Farbstoff dissoziert ist, eine kräftige Kationenadsorption an den kupferroten Fluoreszenzfarbe der Zellmembranen beobachtbar ist. Sowohl das lebende als auch das tote Protoplasma vermag das Acridinorange zu speichern. Während das tote Protoplasma unterhalb des maßgeblichen IEP<sub>M</sub> der Eiweißkörper in grüner Fluoreszenzfarbe leuchtet, wird oberhalb des IEP<sub>M</sub> eine starke Elektroadsorption

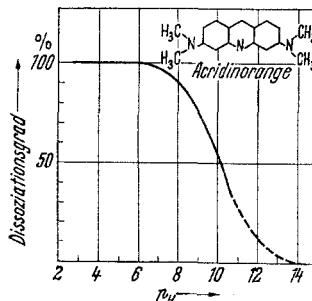


Abb. 1. Die Dissoziationskurve des Acridinorange, bestimmt durch colorimetrische Messung der Farbtiefe. Der ausgezogene Teil der Kurve ist ausgemessen, während der gestrichelte Teil theoretisch ergänzt ist  
(nach KÖLBEL<sup>13</sup>).

Tabelle 1. Die  $p_H$ -Abhängigkeit der Fluorochromierung lebender und toter Zellen  
(nach STRUGGER<sup>10</sup>).

pH	Lebend					Tot				
	Membran	Cyto-plasma	Kern	Vacuole	Bemerkungen	Mem-bran	Cyto-plasma	Kern	Bemerkungen	
2,68	++ gelb-grün	—	—	—	—	++ gelblich	+++ gelb-grün	+++ kupfer-rot	Cytoplasma Stich ins Rötliche häufig	—
4,74	++++ kupfer-rot	—	+ grün	—	keine Vacuolenkontraktion	+++ kupfer-rot	+++ kupfer-rot	++++ kupfer-rot	—	—
6,50	++++ kupfer-rot	+	grün ++ grün	+ schwach rötlich grün	Vacuolenkontraktion	++ kupfer-rot	+++ kupfer-rot	++++ kupfer-rot	—	—
8,02	+	+++ grün	++++ gelb-grün	++++ kupfer-rot	Vacuolenkontraktion	—	++ kupfer-rot, fahl	+++ gelb-grün	Kern zur Rot-färbung befähigt, aber erst an der Peripherie rot. Stark gequollen	—

+= Leuchtintensität.

erzielt, deren Folge das Auftreten einer kupferroten Fluoreszenzfarbe ist. Das lebende Protoplasma speichert dagegen im extrem sauren Bereich nicht, wohl aber ist zwischen  $p_H$  4 und 5 im Plasma und im Kern das rasche Auftreten einer grünen Vitalfluorochromierung zu beobachten. Diese Vitalfluorochromierung bleibt grün und verstärkt sich mit abnehmender Acidität der Farblösung noch beträchtlich. Eine kupferrote Fluoreszenz ist am lebenden Protoplasma selbst nach stunden- und tagelanger Überfärbung in konzentrierten Farbbädern nicht zu erzielen.

Das lebende Protoplasma vermag sonach nur eine beschränkte Menge an Acridinorangekationen zu binden, während das tote Protoplasma den Farbstoff in großer Menge elektroadsorptiv speichert und daher in kupferroter Fluoreszenzfarbe erstrahlt. Auf Grund dieses Konzentrationseffektes ist mit Hilfe der Acridinorange-Fluorochromierung eine sichere Methode gegeben, um lebendes von totem Protoplasma unter Einhaltung bestimmter Bedingungen ( $p_H$ -Bereich zwischen 5 und 7,5, Färbung im Farbstoffüberschuß, keine extreme Aufquellung des Protoplasmas durch Laugen, konzentrierte Säuren oder andere Einflüsse, welche zur vollständigen Peptisierung des Protoplasmas führen) auf experimentellem Wege zu unterscheiden. Nicht nur die Extreme Lebend und Tot lassen sich mit dieser Methode analysieren, sondern unsere Erfahrungen haben eindeutig gezeigt, daß das Auftreten gelber, orangegelber oder orangeroter Farbtöne dazwischenliegende Schädigungsstadien des Protoplasmas nekrotischer Natur anzeigen. Die Empfindlichkeit der Acridinorange-Methode geht soweit, daß an Metaphytenprotoplasmata mechanische, streng lokalisiert angesetzte Insulte (Quetschen mit der Mikronadel des Mikromanipulators) durch eine ins Rötliche veränderte, streng lokalisiert auftretende sekundäre Fluoreszenz nach Acridinorangefärbung sichtbar werden. Schon eine mechanische Deformation des Eiweißmicellargrütes im Protoplasma

wird durch diese Vitalfärbungsmethode eindeutig beobachtbar. Das Verhalten der Zellsafräume schließt sich eng an die Erfahrungen mit Neutralrot an.“

Diese von STRUGGER auf Grund der Ergebnisse seiner qualitativen Untersuchungen an höheren Pflanzenzellen geäußerten Ansichten konnten durch die bereits oben erwähnten quantitativen Bestimmungen von KÖLBEL an Hefezellen bestätigt werden. Bei sonst gleichen Bedingungen nahm eine lebende Hefezelle  $2 \cdot 10^{-10}$  mg und eine tote Hefezelle  $27 \cdot 10^{-10}$  mg Acridinorange auf. Die quantitative Farbaufnahme durch Hefezellen in Beziehung zum  $p_H$  der Farblösung und zum isoelektrischen Punkt (IEP) der Zelleiweißkörper zeigt Abb. 2, welche ich der Arbeit von KÖLBEL entnommen habe. Mikrokataphoretische Untersuchungen sowie Vergleichsversuche mit dem gleichfalls basischen Fluoreszenzfarbstoff Auramin zeigten, daß zwar die Bindung des Farbstoffes an das Zelleiweiß elektrostatischer Natur sein muß, aber bei der Vitalfärbung nur ein Teil der vorhandenen Ladungsqualitäten der Plasmaeiweißkörper neutralisiert wird. Dabei ist das Ausmaß der Speicherung der verschiedenen Farbstoffe unter sonst gleichen Versuchsbedingungen unterschiedlich; Acridinorange erreichte bei den genannten Untersuchungen das höchste Maß an Adsorption und doch muß nach den kataphoretischen Untersuchungen ein Rest an Ladungsqualitäten verfügbar geblieben sein. Die Unterschiede in der Adsorption beider Farbstoffe sowie die Tatsache der in jedem Fall unvollständigen Neutralisation wird von STRUGGER und Mitarbeitern auf sterische oder andere spezifische Verhältnisse zurückgeführt.

Auf Grund der bisher besprochenen Befunde kommt STRUGGER zu der Ansicht, das lebende Protoplasma besitzt nur eine beschränkte Einlagerungsfähigkeit für Acridinorangekationen. Es sei das lebende Protoplasma ein hochgeordnetes, aber stark geschlossenes System. Mit dem Absterben trete gleichzeitig eine Denaturierung der Eiweißkörper ein. Das wohlgeordnete Eiweiß-micellargerüst werde irreversibel zerstört und das daraus resultierende Koagel sei im Hinblick auf sein Adsorptionsvermögen für Kationen ein offenes System. Somit zeige die Acridinorange-Fluorochromierung gerade diejenigen strukturellen Veränderungen des Protoplasmas an, welche für das Absterben des Systems „Protoplasma“ charakteristisch seien.

Die genannten Untersuchungen von STRUGGER regten zu einer ganzen Reihe von Arbeiten an, die vorwiegend an Pflanzenzellen und Bakterien durchgeführt wurden (vgl. STRUGGER und Mitarbeiter<sup>10</sup>, sowie JOHANNES<sup>15</sup>, KREBS<sup>11</sup>, GÄRTNER und Mitarbeiter<sup>16</sup> u. a.). Am tierischen Material fehlen bisher meines Wissens eingehende Untersuchungen. Wohl konnte STRUGGER an den Speicheldrüsenchromosomen von Drosophilalarven eine verstärkte Fluorochromierung der thymonucleinsäurehaltigen Querscheiben gegenüber den Zwischenscheiben feststellen, auch gelang es ihm, Trypanosomen mit Acridinorange anzufärben, schließlich glückte es ihm zusammen mit ROSENBERGER<sup>10</sup> nachzuweisen, daß vital gefärbte Spermatozoen des Ziegenbocks voll befruchtungsfähig blieben, somit die Vitalfluorochromierung des Kernes und Cytoplasmas mit Acridinorange keine tiefgreifenden Störungen des Lebenszustandes hervorruft, doch zu systematischen Versuchen an tierischen Zellen zeigten sich bisher nur geringe Ansätze. ASHER<sup>17</sup> berichtete 1947 auf der Physiologentagung in Bonn über erfolgreiche Vitalfluorochromierungen ganzer höherer Tiere (Mäuse und Frösche) mittels Acridinorange. Bei parenteraler Verabreichung des Farbstoffes gelangte das Acridinorange über

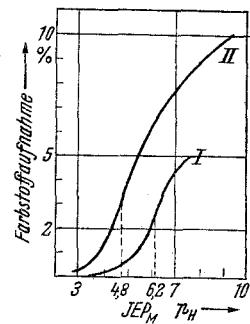


Abb. 2. Farbstoffspeicherung von Acridinorange ( $c = 0,5 \cdot 10^{-3}$  Mol/Liter) in lebenden (I) und toten (II) Hefezellen (nach KÖLBEL<sup>13</sup>).

den Blutweg an die Körperzellen und färbte diese in Kern und Cytoplasma so kräftig, daß die gefärbten Zellen unter dem Fluorescenzmikroskop betrachtet werden konnten.

Hinzuweisen ist in diesem Zusammenhang noch auf eine kurze Mitteilung von KREBS<sup>11</sup>, wonach für pflanzliche und tierische Zellen arteigene Gesetzmäßigkeiten des Färbungseffektes bestehen sollen und insbesondere die Einhaltung bestimmter, für jede Zellart charakteristischer Beobachtungstermine erforderlich sei.

### A. Eigene Methoden.

#### I. Fluorescenzmikroskopie.

Bei der Fluorescenzmikroskopie hat die Lichtquelle nur den Zweck, im mikroskopisch beobachteten Präparat Gewebsanteile selbst oder gespeicherte Farbstoffe, die ihrer chemischen Konstitution nach dazu befähigt sind, zur Fluorescenz, d. h. zum Selbstleuchten anzuregen. Dazu wird üblicherweise das langwellige Ultraviolett (UV) oder aber neuerdings Blaulicht angewandt. Die Lichtstrahlen anderer Wellenlängen der Beleuchtungsquelle müssen aus dem Strahlengang herausgefiltert werden, da sie sonst infolge ihrer größeren Intensität die verhältnismäßig schwache Fluorescenz des Präparates überstrahlen würden. Dieses filtrierte UV- oder Blaulicht wird auf das mikroskopische Präparat geleitet und erregt dort die Fluorescenz in den dazu befähigten Anteilen. Die Reststrahlung des UV- oder Blaulichtes, die durch das Präparat hindurchgeht und mit dem Fluorescenzlicht durch das Mikroskop das Auge erreichen würde, muß vor dem Auge aus dem Strahlengang ausgeschaltet werden, da die UV-Strahlung Linse und Netzhaut des Auges zur Fluorescenz anregen, während das sichtbare Blaulicht daneben auch die Fluorescenz des Präparates überstrahlen würde. Die Ausschaltung derartiger schädlicher Strahlung wird durch Okularsperrfilter (Euphos- bzw. Gelbfilter) oder entsprechende Deckgläser erreicht.

Aus dem oben Gesagten ergibt sich, daß nur bei der Fluorescenzmikroskopie im ultravioletten Licht alle Fluorescenzfarben des sichtbaren Spektralbereiches festzustellen sind, während im Blaulicht die violetten und blauen Fluorescenzfarben infolge Ausschaltung durch das Okularsperrfilter nicht beobachtet werden können. Bei Verwendung von Blaulicht ist weiterhin zu beachten, daß die benützten gelben Okularsperrfilter die zu beobachteten Fluorescenzfärbungen in ihrer Farbtönung nach Gelb herüber verschieben, es tritt somit eine wenn auch geringgradige Verfälschung des Farbeindruckes auf. Auf der anderen Seite wird bei Verwendung der üblichen Kohlenbogenlampe infolge der wesentlich höheren Strahlungsintensität im Blauanteil bei Fluorescerzerregung durch Blaulicht eine sehr erheblich stärkere Fluorescenz des Präparates beobachtet als im UV-Licht der gleichen Lichtquelle.

Aus diesen einleitenden Worten ergibt sich die Anordnung des Fluorescenzmikroskopes von selbst. Bei den eigenen Untersuchungen wurden Fluorescenzbeobachtungen im durchfallenden und auffallenden Licht angestellt. Die hierfür erforderlichen Geräte wurden aus vorhandenen Mitteln zusammengestellt und sollen im folgenden kurz beschrieben werden.

a) *Beobachtung im durchfallenden Licht.* Die hierfür zusammengestellte Apparatur zeigt Abb. 3 schematisch. Mit ihr wurde im wesentlichen die Anordnung der von ELLINGER und HIRT<sup>12</sup> für UV benutzten Apparatur kopiert.

Die benützte große Luminescenzbogenlampe (14) von Leitz besteht aus einer lichtstarken Bogenlampe, die mit gewöhnlichen Kohlen (13) beschickt ist. Vor dem leuchtenden Krater sitzt in der Lampe eine asphärische Beleuchtungslinse aus Hartglas (12) von 50 mm Durchmesser und 50 mm Brennweite. Der Abstand der Beleuchtungslinse vom Krater kann durch den Schneckentreib (11) variiert werden.

Die Hartglaslinse ist für die UV-Strahlung ( $350-400 \text{ m}\mu$ ) durchlässig. Auf diese Beleuchtungslinse folgt eine Küvette von 10 cm Schichtdicke, die zur Aufnahme einer 1—2%igen Kupfersulfatlösung bestimmt ist. Diese Kupfersulfatlösung hat den Zweck, die Wärmestrahlung der Lampe und das äußerste rote Ende des Spektrums zu absorbieren. Auf dieses Flüssigkeitsfilter folgt ein UG-Filter (9) von 2 mm Schichtdicke, es absorbiert bis auf einen schwachen Lichtanteil im äußersten Rot das sichtbare Licht und läßt ultraviolette Strahlen zwischen den Wellenlängen 350 und  $400 \text{ m}\mu$  durch. Die Rotkomponente des sichtbaren Lichtes muß daher von der vorher erwähnten Kupfersulfatlösung absorbiert werden.

Als Mikroskop (4) wurde ein gewöhnliches Zeißmikroskop EOA 116 verwandt. Das durch die Beleuchtungslinse (12) konvergent gemacht UV-Licht wird über den Planspiegel (5) durch den Kondensor (7) zum Präparat geleitet. Zur Ausschaltung der noch durch das Okular gelangenden UV-Strahlung wurde ein Sperrfilter aus Euphosglas (8) verwandt.

In dieser Zusammenstellung gelangte das Gerät bei UV-Licht zur Anwendung. Sollte Blaulicht verwendet werden, so wurde das UV-Filter (9) entfernt und in den Filterhalter (6) wurden 2 Blaufilter (durchlässig für Wellenlängen bis  $500 \text{ m}\mu$ ) eingesetzt. Gleichzeitig kam an die Stelle des UV-Sperrfilters aus Euphosglas (8) ein für Blau undurchlässiges Gelbfilter vom Typus OG 1 (Schott & Gen.).

Bei Objektivvergrößerungen bis zur 30fachen war ohne weiteres ein klares Fluoreszenzbild sichtbar. Wurden jedoch stärkere Vergrößerungen angewandt, so machten sich, insbesondere bei der intensiveren durch Blaulicht erregten Fluoreszenz, Überstrahlungen störend bemerkbar. Einzelne Partikel leuchteten so stark, daß andere, schwächer fluoreszierende Nachbar teilchen überstrahlt und somit unscharf abgebildet wurden. Hier mußte das Licht gedämpft werden, doch bezog sich dies nur auf das sichtbare Licht, das von den selbstleuchtenden Teilchen des Objektes ausgestrahlt wurde und nicht auf jenes der Bogenlampe. Hierzu wurden in die stärkeren Objektive entsprechende Kreisblenden eingelegt, wodurch zwar lichtschwächere, aber schärfer begrenzte Bilder mit größerer Tiefenschärfe erreicht werden konnten.

*b) Beobachtung im auffallenden Licht.* Für Untersuchungen am ganzen Tier oder am überlebenden, isolierten Herzen wurde in Verbindung mit einer großen Lumineszenzbogenlampe der Leitz-Ultropak zur Auflichtbeobachtung verwandt. Eine Ansicht der Gesamtapparatur zeigt Abb. 4. Eine schematische Zeichnung bringt Abb. 5, in welchem die Anordnung des Ultropaks besonders angegeben ist. Die als Lichtquelle verwandte große Lumineszenzbogenlampe von Leitz wurde bei einer Stromstärke von 14 Amp. mit Wechselstrom von 60 Volt betrieben. Bei Untersuchungen im UV-Licht wurde die von der Bogenlampe entwickelte Lichtstrahlung mittels UG-Filter (3) gefiltert, während beim Arbeiten mit Blaulicht dieses entfernt wurde und statt dessen in den Filterhalter (6) 2 Blaufilter eingesetzt waren. Unmittelbar vor der Bogenlampe war der Beleuchtungsansatz (2) des Leitz-Ultropak angebracht. Das Ultropakmikroskop selbst war an einem

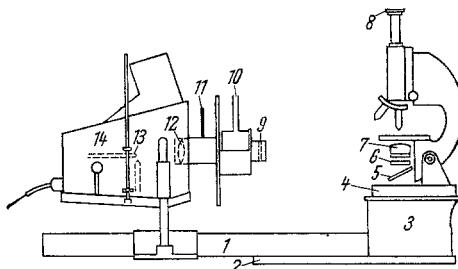


Abb. 3. Schematische Skizze der Fluoreszenzeinrichtung für durchfallendes Licht. 1 optische Bank; 2 Grundplatte; 3 Mikroskopsockel; 4 Mikroskop; 5 Planspiegel; 6 Filterhalter; 7 Kondensor; 8 Okularsperrfilter; 9 UV-Filter UG; 10 Filterküvette mit Kupfersulfatlösung; 11 Schneckenführung für Beleuchtungslinse; 12 asphärische Beleuchtungslinse aus Hartglas; 13 Kohlenelektroden; 14 Leitz-Lumineszenzbogenlampe.

verstellbaren Säulenstativ montiert. Die zu untersuchenden Objekte befanden sich auf einem vom Ultropakmikroskop unabhängig verstellbaren Tisch.

### *II. Färbemethoden.*

In dieser Arbeit wurde systematisch die Fluorochromierung tierischen Gewebes mit Acridinorange in verschiedenen Modifikationen und unter Abwandlung

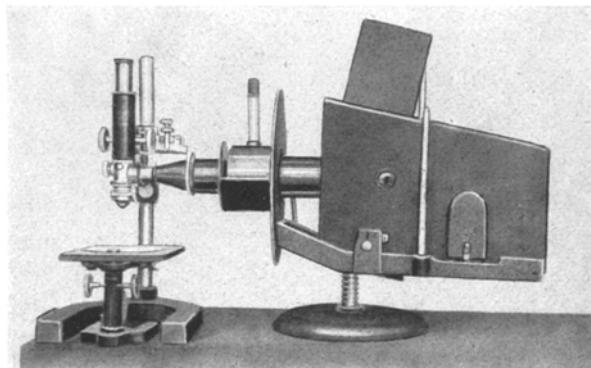


Abb. 4. Gesamtansicht des Gerätes zur Beobachtung im Auflicht.

der Bedingungen untersucht. Die Einzelheiten dieser Färbemethoden werden ausführlich bei den entsprechenden Versuchsreihen besprochen.

Um isolierte Herzen und Gefrierschnitte des unfixierten Gewebes mit möglichster Schonung der kolloidalen Struktur der Zelleweißkörper färben zu können,

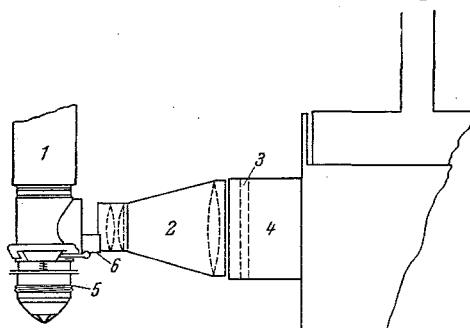


Abb. 5. Schematische Zeichnung der Ultropakeinrichtung zur Beobachtung im auffallenden Licht. 1 Mikroskopitubus; 2 Beleuchtungsansatz zum Ultropak; 3 UG-Filter für UV-Licht; 4 Leitz-Lumineszenzbogenlampe; 5 Ultropakobjektiv; 6 Filterhalter für Blaufilter.

war es erforderlich, isotonische Farblösungen zu benutzen, bei denen die Einhaltung einer definierten Wasserstoffionenkonzentration möglich war. Die gebräuchlichen Na-K-Phosphatpuffer sind für derartige Zwecke nicht gut zu gebrauchen, da der Kaliumgehalt stört. Nach v. MURALT<sup>20</sup> sind jedoch zur beliebigen pH-Einstellung sehr gut isotonische Phosphatpuffer von 0,164 m  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  und 0,630 m NaOH (für Warmblüter) bzw. 0,119 m  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  und 0,429 m NaOH (für Kaltblüter) geeignet.

Zur Herstellung dieser Gemische wurden Stammlösungen von 0,5 m  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  und m NaOH vorrätig gehalten, aus diesen wurden entsprechend den Angaben von v. MURALT die Ausgangslösungen angesetzt (für Säugetiergegewebe ( $\Delta = 0,56^\circ \text{C}$ ):  $164 \text{ cm}^3$  0,5 m  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + 336 \text{ cm}^3 \text{ H}_2\text{O} = 0,164 \text{ m NaH}_2\text{PO}_4$  ( $\Delta = 0,56^\circ \text{C}$ )). Diese Lösung wurde als „Phosphat“ bezeichnet. Die als „Lauge“ bezeichnete Ausgangslösung bestand aus  $63,0 \text{ cm}^3$  m NaOH +  $37,0 \text{ cm}^3 \text{ H}_2\text{O} = 0,630 \text{ m NaOH}$ . Für Froschgewebe ( $\Delta = 0,40^\circ \text{C}$ ) wurden folgende Lösungen hergestellt: „Phosphat“:  $119 \text{ cm}^3$  0,5 m  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + 381 \text{ cm}^3 \text{ H}_2\text{O} = 0,119 \text{ m NaH}_2\text{PO}_4$  ( $\Delta = 0,40^\circ \text{C}$ ) und „Lauge“:  $42,9 \text{ cm}^3$  m NaOH +  $57,1 \text{ cm}^3 \text{ H}_2\text{O} = 0,429 \text{ m NaOH}$ .

Die benützten isotonischen Puffergemische wurden durch Mischen entsprechender Mengen „Lauge“ mit „Phosphat“ gewonnen. Diesen Pufferlösungen wurde dann der Farbstoff in Substanz zugesetzt. Zur Herstellung von Lösungen unterhalb  $p_{\text{H}} 3,5$  wurde „Phosphat“ mit 0,1 m HCl versetzt. Zwar war unterhalb  $p_{\text{H}} 5,4$  die Pufferkapazität der Gemische nicht mehr groß, reichte jedoch bei der angewandten kleinen Gewebsmenge (meist Schnittpräparate) und dem erheblichen Überschuß an Lösung aus, um die Wasserstoffionenkonzentration innerhalb der gewünschten Grenzen konstant zu halten.

Die Kontrolle der Puffergemische und gepufferten Farblösungen erfolgte mittels elektrometrischer  $p_{\text{H}}$ -Bestimmung an der Chinhydronelektrode (benutzbar bis  $p_{\text{H}} 8$ ; bei gut gepufferten Lösungen, einem erheblichen Überschuß an Chinhydron und bei schneller Ablesung mit ausreichender Genauigkeit bis  $p_{\text{H}} 9$ ; vgl. KORDATZKI<sup>21)</sup> bzw. bei stärker alkalischen Lösungen colorimetrisch mit Hilfe von Farbindicatoren. Bei der elektrometrischen Bestimmung diente die gesättigte Kaliumchlorid-Calomelelektrode als Vergleichselektrode. Die Messungen wurden nach dem Kompensationsverfahren am Potentiometer nach Dr. TIRUN (Ströhlein & Co.) durchgeführt.

## B. Untersuchungen über Speicherung von Acridinorange im Herzmuskel.

### I. Versuche am Froschherzen.

a) *Vitalfärbung.* *Versuchsanordnung:* Vier Frösche (*Rana esculenta* bzw. *temporaria*) wurde eine Acridinorangelösung (1:100 in 0,6%iger Kochsalzlösung) in den Rückenlymphsack injiziert. Die Injektionsmenge wurde so gewählt, daß der einzelne Frosch je Gramm Körpergewicht 1 mg Acridinorange erhielt. Nach 15—17 Std wurden die Frösche in der üblichen Weise dekapiert. Das Herz wurde nach Ausbohrung des Rückenmarks freigelegt. Mit dem Ultropak beobachtete ich sodann die *in situ* befindlichen, schlagenden Herzen in der Aufsicht bei UV- und Blaulicht. Anschließend wurden die Herzen herausgenommen und nochmals im Auflicht betrachtet. Während der Beobachtungszeit mußten die Herzen durch Aufbringen von physiologischer Kochsalzlösung vor dem Austrocknen bewahrt werden. Zwei Herzen (Reihe I) wurden sodann auf dem Gefriermikrotom mit unterkühltem Messer bei einer Schnittdicke von  $20 \mu$  geschnitten. Die Schnitte wurden in physiologischer Natriumchloridlösung (0,6%) aufgefangen, auf einen Objektträger aufgezogen, in 0,6%iger NaCl-Lösung eingedeckt und bei durchfallendem Blau- und UV-Licht auf ihre Fluorescenz geprüft. Die beiden anderen isolierten, schlagenden Herzen (Reihe II) wurden in Acridinorangelösung (1:100 in physiologischer Kochsalzlösung) 10 min lang eingelegt, sodann 30 min lang in entsprechender, aber farbfreier Lösung vom überschüssigen Farbstoff befreit und anschließend im Auflicht betrachtet. Auch diese, nach der Behandlung immer noch schlagenden Froschherzen wurden dann auf dem Gefriermikrotom in Schnitte zerlegt und im durchfallenden Licht geprüft.

*Ergebnis.* Die vital im lebenden Tierkörper gefärbten Herzen zeigten in jedem Fall den gleichen Befund, gleichgültig, ob sie *in situ*, isoliert oder in Gewebsschnitten betrachtet wurden. Die Herzmuskelfasern leuchteten in ihrem Plasmaanteil mittelgrün, die Kerne der Herzmuskelzellen waren nur wenig in ihrer Färbung vom Zellplasma verschieden, während die Kerne des Capillarendothels und des subendothelialen Bindegewebes hell gelblich-grün leuchteten (vgl. Abb. 6). Das Plasma der Endothel- und Bindegewebszellen hatte praktisch keinen Farbstoff aufgenommen und war daher im Fluorescenzbild nicht wahrzunehmen.



Abb. 6. Schematische Farbskizze des vital mit Acridinorange gefärbten Herzmuskels\*. 1 Muskelzellplasma; 2 Muskelzellekerne; 3 Kerne des Endothels bzw. Bindegewebes.

Wurden die herausgekommenen, überlebenden (d. h. noch in Aktion befindlichen) Herzen mit Acridinorange nachgefärbt, so trat eine zusätzliche Farbstoffaufnahme in den Herzmuskelzellen und den Zellen des Zwischengewebes ein. Hier war die grüne Färbung des Muskelzellplasmas intensiver und leuchtender geworden. Muskelzellerne zeigten keine Farbänderung, dagegen war

die Färbung der Kerne des Endothels und Bindegewebes jetzt in orangerot umgeschlagen. Die Farbänderung infolge zusätzlicher Speicherung von Acridinorange betraf jedoch nicht den gesamten Herzmuskel, sondern machte sich nur in einer etwa  $1/2$  mm breiten Außenschicht des Herzens bemerkbar. Im Innern des Muskelgewebes war das Fluorescenzbild unverändert.

b) *Supravitalfärbung. Versuchsanordnung:* Je zwei in üblicher Weise isolierte schlagende Froschherzen wurden bei einer Wasserstoffionenkonzentration vom  $p_H$  3,5, 6,0, 8,0 mit Acridinorange (1 : 2000, gelöst in isotonischem Phosphatpuffer) für 10 min eingelegt. Anschließend wurde der Farbstoffüberschuß in reinem, isotonischem Phosphatpuffer vom jeweils gleichen  $p_H$  für die Dauer von 30 min ausgewaschen. Diese Herzen wurden zunächst *in toto* mit dem Ultropak im Auflicht betrachtet, anschließend fertigte ich von ihnen auf dem Gefriermikrotom mit unterkühltem Messer 20  $\mu$  dicke Schnittpräparate an. Diese wurden in isotonischem Phosphatpuffer vom entsprechenden  $p_H$  aufgefangen, auf einen Objektträger aufgezogen, mit gleicher Pufferlösung eingedeckt und danach im durchfallenden Licht auf ihre Fluorescenz geprüft.

\* Schematische Farbskizzen können nur einen annähernd richtigen Farbeindruck geben, sie sind jedoch nicht in der Lage, den Glanz der Fluorescenz der Präparate, den man bei visueller Betrachtung wahrnimmt, auch nur annähernd wiederzugeben.

*Ergebnis.* Bei makroskopischer Betrachtung zeigten die bei  $p_H$  3,5 und 6,0 gefärbten Herzen eine erheblich schwächere Gelbfärbung als die bei  $p_H$  8,0 behandelten Froschherzen (der Farbstoff Acridinorange hat im gewöhnlichen, weißen Licht eine gelbe bis orange Farbe). Im Auflichtmikroskop konnte bei ultraviolettem oder blauem Licht in den mit Farblösungen vom  $p_H$  3,5 bzw. 6,0 behandelten Präparaten praktisch ein übereinstimmender Farbeffekt beobachtet werden. Die Kerne des Endothels und Bindegewebes fluorescierten hellgrün, während das Muskelzellplasma schwach grün leuchtete. Ein gleiches Bild boten die mikroskopischen Schnittpräparate des unfixierten Gewebes im durchfallenden UV- oder Blaulicht. Die Fluorescenz entsprach also völlig der von Abb. 6. Im Gegensatz hierzu zeigte das bei  $p_H$  8,0 gefärbte Herz im Auflicht eine hellgrüne Fluorescenz des Muskelzellplasmas und eine gelborange Färbung der Zellkerne. Auf dem Durchschnitt durch das



Abb. 7. Schematische Farbskizze des supravital mit Acridinorange bei  $p_H$  8,0 gefärbten Herzmuskels (Randzone).

Herz war bereits makroskopisch zu erkennen, daß die stärkere Anfärbung mit Acridinorange nur eine oberflächliche Schicht des Gewebes von etwa  $\frac{1}{2}$  mm Dicke betraf. Im Innern des Herzmuskels dagegen war makroskopisch kein Unterschied gegenüber den bei  $p_H$  3,5 und 6,0 gefärbten Herzen zu sehen. Dieser Befund konnte gleichfalls bei mikroskopischer Betrachtung der Gefrierschnitte im durchfallenden Licht erhoben werden. Im Innern des Herzmuskels fand sich eine Färbung, welche Abb. 6 entsprach, während dagegen in der äußeren Randzone des Muskels die Kerne des Endothels und Bindegewebes gelb bis gelborange gefärbt waren und das Cytoplasma eine gelblich-grüne Farbtönung zeigte. In dieser Zone fanden sich auch zwischen den Muskelfasern feinste, rötlich leuchtende Farbniederschläge, wobei bislang allerdings nicht mit eindeutiger Sicherheit entschieden werden konnte, ob es sich hierbei um gefärbtes Plasma von Bindegewebs- oder Endothelzellen, um retikuläre Bindegewebsfasern oder aber um geronnenes Fibrin innerhalb der Capillaren handelte. Ich selbst möchte letzteres annehmen, da in anderen Schnittpräparaten sich innerhalb größerer Blutgefäße Fibrinfäden ebenfalls derart mit Farbstoff beladen hatten, daß sie im durchfallenden Licht kupferrot fluorescierten. Im ganzen ergab sich demnach in der stärker gefärbten Randzone ein Bild, wie es annähernd farbrichtig in Abb. 7 dargestellt wurde.

Tabelle 2. *Toter Herzmuskel vom Frosch.*

pH	Herzmuskelzelle		Endothelzellen und subendothiales Bindegewebe	
	Cytoplasma	Kern	Cytoplasma	Kern
3,5	+	++	(+)	+++
	grün gelb	gelb grün	grünlich	grün gelb
4,2	+	++	(+)	+++
	gelb grün	gelb grün	grünlich	gelb grün
5,4	+++	++	+	+++
	gelb orange bis rotorange	kupfer rot	grün gelb	kupfer rot
6,0	+++	+++	+	+++
	rot orange	kupfer rot	grün gelb	kupfer rot

+= Leuchtintensität.

c) Die Färbung toten Herzgewebes vom Frosch. Erste Versuchsanordnung: Es wurde eine Reihe von Farblösungen (1:2000) in isotonischen Phosphatpuffern mit steigendem pH-Wert hergestellt. In diesen gepufferten Farblösungen wurden 20 μ dicke Gefrierschnitte (hergestellt unter Verwendung eines tiefgekühlten Mikrotommessers) von unfixierten, aber einwandfrei toten Froschherzen 10 min lang gefärbt. Anschließend wurden die Schnittpräparate für 10 bzw. 30 min in der entsprechenden farbfreien Pufferlösung von dem überschüssigen Farbstoff befreit. Die Gefrierschnitte wurden sodann auf einen Objektträger aufgezogen, mit entsprechender Pufferlösung eingedeckt und im durchfallenden Licht betrachtet.

Um einwandfrei totes Herzmuskelgewebe vom Frosch ohne wesentliche Eingriffe zu erlangen, wurden 2 Frösche dekapitiert und nach Ausbohrung des Rückenmarks 2 Tage lang bei  $-10^{\circ}\text{C}$  im Kühlschrank aufbewahrt. Nach dieser Zeit wurden die Herzen in typischer Weise freipräpariert und herausgenommen.

Ergebnis. Die Ergebnisse der Färbungsversuche am toten Herzmuskelgewebe vom Frosch bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration zeigt Tabelle 2.

Ob die Präparate 10 oder 30 min mit der jeweiligen Pufferlösung ausgewaschen wurden, war für den Färbeerfolg ohne Belang.

Zweite Versuchsanordnung. Von den gleichen Herzen wurden 20 μ dicke Gefrierschnitte unfixierten Gewebes zunächst in der vorerwähnten Weise bei pH 6,0 für 10 min gefärbt und 30 min bei gleichem pH ausgewaschen. Es ergab sich in

Ta-

	Vitalfärbung		Supra-	
			pH 3,5–6,0	
	Cytoplasma	Kern	Cytoplasma	Kern
Muskelzelle	+	(+) +	+	+(+)
	mittelgrün	mittelgrün	mittelgrün	mittelgrün
Bindegewebs- bzw. Endothelzelle	ohne Fluorescenz	+++ gelblich-grün	ohne Fluorescenz	+++ hellgrün

Übereinstimmung mit der ersten Versuchsanordnung auch hier eine Färbung, die vollkommen derjenigen in Tabelle 2 (bei  $p_H$  6,0) entsprach. Die Schnittpräparate wurden sodann im isotonischen Phosphatpuffer vom  $p_H$  3,5 ausgewaschen.

*Ergebnis.* Es zeigte sich nach dieser Behandlung ein Bild, als seien die Schnittpräparate von vornherein bei einem  $p_H$ -Wert von 3,5 gefärbt und ausgewaschen worden (vgl. Tabelle 2), der Mehrbetrag des bei  $p_H$  6,0 gespeicherten Farbstoffes wurde also bei  $p_H$  3,5 wieder ausgewaschen.

*Dritte Versuchsanordnung.* Weitere Gefrierschnitte vom gleichen, unfixierten Froschherzen wurden je 10 min bei  $p_H$  3,5 gefärbt und ausgewaschen: Färbeergebnis wie in Tabelle 2. Anschließend wurden diese Schnittpräparate 10 min lang bei  $p_H$  6,0 nachgefärbt und weitere 10 min in isotonischer Pufferlösung vom  $p_H$  6,0 ausgewaschen. Zum Vergleich wurde eine weitere Serie von Gewebsschnitten zum zweitenmal bei  $p_H$  3,5 gefärbt und ausgewaschen.

*Ergebnis.* Die bei  $p_H$  3,5 zum zweitenmal gefärbten Vergleichsschnitte unterschieden sich in ihrer Fluorescenz nicht merkbar von den einmalig gefärbten. Im Gegensatz hierzu hatten die bei einem  $p_H$ -Wert von 6,0 nachgefärbten Schnittpräparate weiterhin Farbstoff aufgenommen und unterschieden sich nun nicht von den ursprünglich bei  $p_H$  6,0 behandelten Gewebsschnitten.

#### Erörterung der Versuchsergebnisse.

In der Tabelle 3 sind die Ergebnisse der Versuchsreihe I nochmals zusammengefaßt und gegenübergestellt.

Es war möglich, Frösche intra vitam durch Injektion des Farbstoffes in den Rückenlymphsack völlig mit Acridinorange zu färben. Das gleiche Ergebnis brachten im übrigen auch nicht angeführte Versuche mit intrakardialer Applikation des Farbstoffes. In dieser Arbeit interessieren nur die Beobachtungen am Herzen, während die an anderen Organen erhobenen Feststellungen außer Betracht bleiben können. Die Beobachtungen von ASHER<sup>17</sup> konnten somit am Frosch bestätigt werden. Zu der Supravitalfärbung ist zu bemerken, daß der Farbstoff auf 2 Wegen an die einzelnen Zellen herangebracht wird. Da die Herzen noch schlagen, gelangt ein Teil des Farbstoffes infolge der vorhandenen

belle 3.

vitalfärbung		Färbung toten Herzmuskelgewebes					
$p_H$ 8,0		unterhalb des IEP <sub>M</sub> der Zelleiweißkörper		oberhalb des IEP <sub>M</sub> der Zelleiweißkörper			
Cytoplasma	Kern	Cytoplasma	Kern	Cytoplasma	Kern		
++ hellgrün	++ (+) hellgrün	+	++ grünlich	+++ gelbgrün	+++ rotorange	+++ grünlich	+++ kupferrot
ohne Fluorescenz	+++ gelborange	(+)	+++ grünlich	gelbgrün	+	+++ grünlich	+++ kupferrot

Pumpbewegungen in das Herzinnere und in die Blutgefäße des Herzens. Zu dieser hierdurch erfolgenden Anfärbung des Gewebes von innen heraus kommt hinzu die unmittelbare Diffusion des Farbstoffes von der Organoberfläche in die Herzmuskulatur. Die Diffusion des Acridinorange ging in den eigenen Versuchen relativ langsam vor sich. Bei Verwendung einer gepufferten Farblösung vom  $p_{\text{H}}$  8,0 (hier liegt der Farbstoff zum Teil bereits undissoziiert vor (vgl. KÖLBEL<sup>13</sup>) war dieser Befund besonders auffällig und bereits makroskopisch beim Schnitt durch das Herz festzustellen. An Gefrierschnitten vom unfixierten Herzmuskelgewebe war eine Anfärbung mit Acridinorange unter den angewandten Bedingungen ebenfalls ohne Schwierigkeiten zu erreichen.

Vital und supravital bei  $p_{\text{H}}$  3,5—6,0 gefärbtes Herzmuskelgewebe verhielt sich in seiner Farbstoffspeicherung praktisch völlig gleich. Wurde dagegen das überlebende Gewebe im alkalischen Milieu ( $p_{\text{H}}$  8,0) gefärbt, so trat eine stärkere Aufnahme und Speicherung von Acridinorange ein als im sauren Bereich, jedoch wurde abgesehen von der hier intensiveren Leuchtkraft der Fluorescenz nur die Färbnuance in Bindegewebs- und Endothelzellkernen stärker verschoben. Im Gegensatz zu dieser Färbung des lebenden oder überlebenden Herzmuskels vom Frosch zeigte totes Gewebe des Froschherzens ein völlig abweichendes Verhalten. Unterhalb des  $\text{IEP}_M$  gefärbte Zellen glichen in ihrer Fluorescenzfarbe den supravital gefärbten Zellen, während dagegen nach einer oberhalb des  $\text{IEP}_M$  des Gewebes vorgenommenen Acridinorangebehandlung Cytoplasma und Kern der Muskelzelle sowie die Kerne des Bindegewebes und Endothels rotorange bzw. kupferrot aufleuchteten und damit anzeigen, daß sie den Farbstoff in wesentlich verstärktem Maße gespeichert hatten. Vergleicht man die eigenen Ergebnisse am Frosch herzen mit denen von STRUGGER<sup>10</sup> an der Pflanzenzelle (vgl. Tabelle 1 und 2), so ergibt sich eine überraschende Übereinstimmung der Fluorescenzphänomene. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen isoelektrischen Punkte der Plasmaeiweißkörper reagieren Cytoplasma und Kern von Herzmuskel- und Pflanzenzelle vollkommen übereinstimmend. Die Bindegewebs- und Endothelzellen zeigen am Kern entsprechendes Verhalten, während das Cytoplasma dieser Zellen sich in der Farbstoffadsorption abweichend verhält. Im vitalen und supravitalen Zustand nahmen die Eiweiße des Zellplasmas der Bindegewebs- und Endothelzellen in den eigenen Versuchen keine durch Fluorescenz nachweisbaren Mengen an Acridinorange auf, während die entsprechenden toten Zellen zwar eine nachweisbare Farbstoffmenge adsorbierten, doch war die Konzentration desselben nicht derart, daß rote Fluorescenzfarben bei Überschreitung des  $\text{IEP}_M$  der Plasmaeiweißkörper erreicht worden wären.

Wird der Farbstoff den Körperzellen vital über den Blutweg wie in der Versuchsreihe a angeboten, so kann unter Berücksichtigung

des normalen Blut- $p_H$  von etwa 7,2 angenommen werden, daß die Färbung oberhalb des IEP der Eiweißkörper des Zellprotoplasmas vorgenommen wird. Es wird dabei entsprechend den Untersuchungen von STRUGGER<sup>10</sup> und KÖLBEL<sup>13</sup> das Höchstmaß der überhaupt vital erreichbaren Farbstoffspeicherung festzustellen sein, sofern nur ein Farbstoffüberschuß angewandt wird. Allerdings läßt sich hierfür in diesem Fall kein experimenteller Beweis erbringen, da eine beliebige Änderung des Blut- $p_H$  nicht möglich ist. Dagegen konnte in Versuchen am überlebenden Gewebe und am toten Herzmuskel die Abhängigkeit der Speicherung des Farbstoffs Acridinorange von der Wasserstoffionenkonzentration des Milieus gezeigt werden. Die sichtbaren Differenzen des Farbeffektes sind jedoch im überlebenden Herzmuskel vom Frosch nicht derart, daß damit eine Bestimmung des isoelektrischen Punktes der Zelleiweißkörper möglich wäre. Wird aber hier eine Farblösung ( $p_H$  8,0) angewandt, die sicher weit oberhalb des  $IEP_M$  der Eiweißphase liegt, so ist auch im Auflicht am Totalpräparat und im durchfallenden Licht im histologischen Schnitt eine verstärkte Farbstoffspeicherung festzustellen. Die Verhältnisse liegen am toten Gewebe wesentlich günstiger. Hier sind die Farbdifferenzen auf Grund der unterschiedlichen Speicherung von Acridinorange zwischen Färbungen unterhalb bzw. oberhalb des  $IEP_M$  derart auffällig, daß damit eine unmittelbare Bestimmung des  $IEP_M$  der Gewebeelemente im unfixierten Material möglich wird. Daß die unterschiedliche Speicherfähigkeit tatsächlich abhängig ist einerseits von dem  $IEP_M$  der Gewebseiweiße und andererseits vom  $p_H$  der Farblösung, konnte KÖLBEL<sup>13</sup> an Gelatine als Modellsubstanz sowie an Hefezellen einwandfrei nachweisen. So ließ sich bei quantitativen Messungen der Acridinorangespeicherung im Vergleich zu kataphoretischen Messungen des  $IEP_M$  der Hefezellen eine fast völlige Übereinstimmung erzielen. Auch die eigenen Versuche, in denen bei Änderung der Wasserstoffionenkonzentration nach erfolgter Färbung eine Änderung in der Größe des Speicherungsvermögens für Acridinorange am Herzmuskel beobachtet wurde, entsprechen qualitativ ganz den quantitativen Versuchen von KÖLBEL an Hefezellen (vgl. Tabelle 4 und 5) und beweisen damit auch für die Herzmuskelzelle einmal die elektrostatische Bindung des Farbkations an das negativ geladene Plasmeiweiß und zum anderen die Umladbarkeit der

Tabelle 4.

	$p_H$	0,05 g Hefe haben
1. Färbebad . . . . .	6,8	aufgenommen 0,0039 g
1. Auswaschbad . . . . .	2,4	abgegeben 0,0034 g
2. Färbebad . . . . .	6,8	aufgenommen 0,0042 g
2. Auswaschbad . . . . .	6,2	abgegeben 0,0004 g

Tabelle 5.

	pH	Fluoreszenzfarbe des Cytoplasmas der Herzmuskelzelle
1. Färbebad (10 min). . . . .	6,0	rotorange
1. Auswaschbad (30 min) . . . . .	6,0	rotorange
2. Auswaschbad (10 min) . . . . .	3,5	grün gelb
1. Färbebad (10 min) . . . . .	3,5	grün gelb
1. Auswaschbad (10 min) . . . . .	3,5	grün gelb
2. Färbebad (10 min) . . . . .	6,0	rotorange

Eiweißkörper durch entsprechend in ihrer Wasserstoffionenkonzentration definierte Auswaschlösungen.

Wenn auch der größte Teil des Farbstoffes in den Versuchen der Tabellen 4 und 5 unterhalb des IEP ausgewaschen wird, so bleibt doch ein Restbestand an Acridinorange übrig, der weiterhin festgehalten wird. Diese Restmenge des Farbstoffes kann nicht an Ampholyte gebunden sein, sondern muß festgehalten werden durch Zellbestandteile, deren Ladungsverhältnisse weitgehend pH-unabhängig sind. Zu diesen Zellbestandteilen könnten unter anderem die in dieser Arbeit mit interessierenden oxydationsbeschleunigenden Fermente mit ihrem Oxydationspotential gehören, welches durch die eisenhaltige Häminkomponente des Fermentkomplexes bedingt wird. Zwar ist dieses Oxydationspotential und damit die Ladungsquantität des Häminkomplexes nicht vollkommen pH-unabhängig, doch kann durch Änderung der Wasserstoffionenkonzentration keine Umkehr der Ladungsqualität erreicht werden, da dem Atmungsferment in seinem das Oxydationspotential bedingenden Anteil der hierzu erforderliche amphotere Charakter fehlt. Für die Beantwortung der Frage, ob unter Umständen das Oxydationspotential der oxydasepositiven Herzmuskelzellen einen Einfluß auf die Speicherfähigkeit für Acridinorange ausübt, sind daher in der Hauptsache Versuche heranzuziehen, in denen unterhalb des  $IEP_M$  der Plasmaeiweißkörper gefärbt wird, eine elektrostatische Bindung des Farbstoffes an Eiweißkörper also höchstens in geringem Umfang eintritt. Bereits in den oben beschriebenen Versuchen zeigten sich entsprechend der unterschiedlichen Stoffwechselaktivität von Herzmuskel- bzw. Bindegewebs- und Endothelzellen Differenzen in der Acridinorangespeicherung. In jedem Fall wiesen die Herzmuskelzellen, welche sich bekanntlich durch einen intensiven Stoffwechsel auszeichnen, eine höhere Farbstoffadsorption auf als die Zellen des Interstitiums mit ihrem nur geringen Stoffumsatz. Dieser Befund wurde nicht nur bei Färbungen unterhalb des  $IEP_M$  der Plasmaeiweißkörper festgestellt, sondern machte sich auch noch bei Angebot von Acridinorange oberhalb des  $IEP_M$  deutlich bemerkbar (vgl. Tabelle 2). Die Farbnuancen der

Zellkerne können zur Beurteilung dieser Frage im übrigen nicht herangezogen werden, da diese infolge ihres hohen Gehaltes an Nucleinsäuren in jedem Fall eine kräftige Adsorption des basischen Farbstoffes Acridinorange zeigen müssen.

Wie gesagt, könnten diese Unterschiede im Ausmaß der Farbstoffaufnahme und -speicherung bedingt sein durch die verschieden hohen Oxydationspotentiale der Zellen, sie müssen es aber nicht, wie bereits die kräftige Kernfärbung zeigt. Falls das Oxydationspotential für die unterschiedliche Acridinorangespeicherung verantwortlich gemacht werden soll, muß es möglich sein, durch Hemmung der Atemfermente (z. B. mittels Cyan) eine Verringerung der Farbstoffaufnahme in den Herzmuskelzellen zu erreichen.

Da in den Muskelzellen des Herzens neben den Oxydationsvorgängen auch die Glykolyse intensiver abläuft als in den interstitiellen Zellen, würde entsprechend den in der Einleitung ausgeführten Gedankengängen weiterhin die Möglichkeit bestehen, daß Acridinorange an den glykolytisch wirksamen submikroskopischen Strukturoberflächen der Herzmuskelzelle verstärkt gespeichert würde. Hierfür ließe sich durch Versuche mittels glykolysehemmender Agentien (z. B. Urethan und Heptylalkohol) ein Nachweis erbringen.

Schließlich bleibt noch die Möglichkeit, daß die vorhandene verstärkte Adsorption von Acridinorange in den Muskelzellen des Herzens auf unterschiedlichen Gehalt der verschiedenen Zellen an sauren und basischen Gruppen beruht. Diese Differenz brauchte dann mit Zellatmung und Glykolyse nicht unmittelbar im Zusammenhang zu stehen.

Zur weiteren Klärung der angeschnittenen Fragen werden im folgenden den Froschversuchen entsprechende Untersuchungen am Herzen der Maus und am menschlichen Leichenmaterial angeschlossen. Versuche mit Hemmung der Atemfermente der Zelle und der Glykolyse sollen weiteres Material zur Lösung der Fragen bringen.

## *II. Versuche am Mäuseherzen über die Speicherung von Acridinorange.*

a) *Vitalfärbung. Versuchsanordnung:* Zwei weißen Mäusen im Gewicht von 17 bzw. 20 g wurde je 1,0 cm<sup>3</sup> Acridinorangelösung (1:100 in physiologischer Kochsalzlösung) intraperitoneal injiziert. Nach etwa 2 Std wurde die leichtere (17 g) Maus getötet. Das Herz wurde nach Herausnahme mit physiologischer Kochsalzlösung abgespült und unmittelbar im Auflicht beobachtet. Sodann wurde das Herz auf dem Gefriermikrotom mit unterkühltem Messer bei einer Schnittdicke von 20  $\mu$  geschnitten. Die Schnitte wurden in 0,9%iger NaCl-Lösung aufgefangen, auf einen Objektträger aufgezogen, mit physiologischer Kochsalzlösung eingedeckt und im durchfallenden Licht auf ihre Fluoreszenz geprüft.

Die zweite Maus (20 g) wurde nach 42 Std getötet und wie die erste weiterverarbeitet.

*Ergebnis.* Die Fluorescenzerscheinungen waren an beiden Herzen farbmäßig die gleichen, jedoch war die Leuchtkraft des zweiten Herzpräparates wesentlich schwächer.

Die Muskelfasern beider Herzen fluorescierten im auffallenden und durchfallenden Licht schwach grün, dabei waren Muskelkerne nicht mit Sicherheit zu differenzieren. Das Plasma der Bindegewebs- und Endothelzellen ließ eine Fluorescenz völlig vermissen, während die Kerne dieser Zellen eine kräftigere Grünfärbung zeigten.

b) *Supravitalfärbung. Versuchsanordnung:* Zwei Mäusen im Gewicht von 17 g wurden sofort nach dem Töten die Herzen herausgenommen. Das eine Herz wurde in isotonische Farblösung vom  $p_H$  3,5 (Acridinorange 1 : 2000 in isotonischem Phosphatpuffer) eingelegt, das zweite in entsprechende Farblösung vom  $p_H$  8,0. Nach einer Färbezeit von 10 min wurden die Herzen in die gleichen, doch farbfreien Pufferlösungen übertragen und sodann im Auflicht untersucht. Anschließend wurden die Herzen auf dem Gefriermikrotom mit unterkühltem Messer geschnitten (Schnittdicke 20  $\mu$ ). Die Schnitte wurden in den entsprechenden Phosphatpuffern aufgefangen, auf einen Objekträger aufgezogen, in Phosphatpuffer eingeschlossen und im durchfallenden Licht betrachtet.

*Ergebnis.* Makroskopisch war das bei  $p_H$  8,0 gefärbte und ausgewaschene Herz wesentlich stärker gelb gefärbt als das vom  $p_H$  3,5. Auf dem Durchschnitt durch das Herz beschränkte sich diese stärker gefärbte Zone auf eine etwa  $\frac{2}{3}$  mm breite Randschicht.

In seiner Fluorescenzfärbung entsprach das bei  $p_H$  3,5 gefärbte Herz im auffallenden Licht bzw. der davon angefertigte Gewebsschnitt im durchfallenden Licht völlig dem in gleicher Weise behandelten Froschherzen. Die Muskelzellen fluorescierten in ihrem Plasmaanteil schwach grün, während die Muskelzellkerne heller grün aufleuchteten. Das Plasma der Bindegewebs- und Endothelzellen war infolge mangelnder Fluorescenz nicht festzustellen, dagegen zeigten die Kerne dieser Zellen gegenüber den Muskelzellkernen größere Leuchtkraft bei gleicher, hellgrüner Fluorescenzfärbung. Im histologischen Schnitt des unfixierten Herzens machte sich auch nach der bei  $p_H$  3,5 erfolgten Färbung eine intensiver leuchtende Randzone von etwa  $\frac{2}{3}$  mm Breite bemerkbar.

Das bei  $p_H$  8,0 gefärbte Mäuseherz zeigte im Auflicht und im Mikrotomschnitt bei durchfallendem Licht wohl eine größere Leuchtkraft als das bei  $p_H$  3,5 gefärbte Herz, jedoch war im Gegensatz zu den Versuchen am Froschherzen außer an den Endothel- und Bindegewebzellkernen mit einer etwas mehr in das Gelbliche verschobene Farbtönung keine Änderung der Nuancen der Fluorescenzfarben gegenüber dem ersten Herzen festzustellen.

c) *Färbung des toten Herzgewebes der Maus. Versuchsanordnung:* Es wurde eine Reihe von Farblösungen (Acridinorange 1:2000 in isotonischen Phosphatpuffern) mit steigenden  $p_H$ -Werten hergestellt. In diesen gepufferten Farbansätzen wurden 20  $\mu$  dicke Gefrierschnitte vom unfixierten Mäuseherzen gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte für 10 min in den gleichen farbfreien Pufferlösungen

Tabelle 6. *Toter Herzmuskel der Maus. Acridinorange 1 : 2000, Färbezeit 10 min.*

pH	Herzmuskelzelle		Endothel- und Bindegewebzellen	
	Cytoplasma	Kern	Cytoplasma	Kern
3,5	++ grün	+++ grün gelb	(+) schwach grünlich	+++ grün gelb
3,8	++ grün gelb	+++ gelb	(+) schwach grünlich	+++ gelborange
4,2	++ grün gelb	+++ rot orange	(+) schwach grünlich	++++ rot
5,4	++ gelblich	+++ rot orange	(+) schwach grünlich	++++ rot
5,6	++ gelborange	+++ rot orange	(+) schwach grün gelb	++++ rot
5,8	++ gelborange	+++ rot	(+) schwach grün gelb	+++ rot
6,0	++ (+) rot orange	+++ rot	(+) schwach grün gelb	++ + rot

+= Leuchttintensität.

von dem überschüssigen Farbstoff befreit. Die gefärbten Gefrierschnitte wurden sodann auf einen Objekträger aufgezogen, mit entsprechenden Pufferlösungen eingedeckt und mit dem Fluoreszenzmikroskop im durchfallenden Licht betrachtet.

Um totes Herzmuskelgewebe von der Maus ohne wesentliche Eingriffe zu erlangen, wurden die herausgenommenen Herzen 3 Std bei Zimmertemperatur in der feuchten Kammer aufbewahrt und dann erst geschnitten. Die Schnitte wurden vor der Färbung weitere 60 min bei gleicher Temperatur in physiologischer Kochsalzlösung belassen. Mit n/10 HCl vorbehandelte Vergleichsschnitte, deren Zellen nach dieser Behandlung mit Sicherheit abgetötet waren, zeigten gleiche Farbreaktionen wie die Versuchsschnitte selbst.

*Ergebnis.* Den Ausfall der Färbeversuche an Schnitten vom toten Mäuseherzen zeigt Tabelle 6.

#### *Diskussion der Versuchsergebnisse.*

In Tabelle 7 sind die Versuchsergebnisse der Reihe II gegenübergestellt. Ähnlich wie bei Fröschen, gelang auch an Mäusen die Vitalfärbung des ganzen Tieres durch parenterale (intraperitoneale) Injektion des Farbstoffes. Die eingetretenen Fluorescenzerscheinungen glichen fast vollkommen denen der Froschversuche (vgl. Tabelle 3 und 7). Ebenso zeigte gleiches Verhalten die Supravitalfluorochromierung und die Färbung toten Gewebes, so daß hier auf die im Anschluß an Versuchsreihe I durchgeföhrten Erörterungen verwiesen werden kann.

Tabelle 7. Herz-

	Vitalfärbung		Supra-	
	Cytoplasma	Kern	pH 3,5	
			Cytoplasma	Kern
Muskelzelle	++ schwach grün	+	schwach grün	++ grün
Bindegewebs- bzw. Endothelzelle	ohne Fluorescenz	+++ grün	ohne Fluorescenz	+++ grün

*III. Versuche am Gewebe menschlicher Leichenherzen.*

*Versuchsanordnung.* Sofort nach Obduktion der Leiche wurde der unfixierte Herzmuskel auf dem Gefriermikrotom mit unterkühltem Messer geschnitten. Die Schnitte wurden für die Dauer von 10 min in isotonischen, gepufferten Farblösungen unterschiedlicher Wasserstoffionenkonzentration gefärbt und danach 10 min in entsprechenden farbfreien Phosphatpuffergemischen gewaschen. Weiterbehandlung der Schnitte wie in den vorhergehenden Versuchsreihen.

*Ergebnis* s. Tabelle 8.

*Schlüssefolgerungen.*

Die in Tabelle 8 zusammengestellten Ergebnisse zeigen, daß auch am menschlichen Leichenherzen die Fluorescenzerscheinungen nach Acridinorangelärbung die gleichen sind, wie am ebenso behandelten Herzen vom Frosch und der Maus. Abweichend in der Farbtönung verhielt sich nur das bei  $p_H$  7,0 und 8,0 gefärbte Gewebe. In den letzteren Versuchsansätzen machte sich während der Färbung unangenehm bemerkbar, daß die Gewebsschnitte in den Farb- und Pufferlösungen weich und klebrig wurden. Diese Veränderungen der Gewebeweiße muß auf Peptisation zurückgeführt werden, welche auch wohl für die abweichenden Farbeffekte verantwortlich zu machen ist. KREBS<sup>11</sup> wies bereits darauf hin, daß nach stärkerer Peptisation tierischen Gewebes nur noch grüne Fluorescenzfärbungen mit Acridinorange erreicht werden können.

*C. Einfluß von Cyan auf die Acridinorangespeicherung.*

*Versuchsanordnung.* Verschiedenen Farblösungen von Acridinorange (1:2000 in isotonischem Phosphatpuffer vom  $p_H$  3,5) wurden steigende Mengen von Kaliumcyanid zugesetzt. Mit diesen cyanhaltigen Farblösungen wurden 20  $\mu$  dicke Gefrierschnitte vom unfixierten Mäuseherzen 10 min lang gefärbt. Die Mäuse waren tags zuvor getötet und dann bei Zimmertemperatur aufbewahrt worden. Nach der Färbung wurden die Schnitte in entsprechenden cyanhaltigen, farbfreien Puffergemischen 10 min lang vom Farbstoffüberschuß durch Auswaschen befreit, dann auf einen Objektträger aufgezogen und im Fluorescenzmikroskop bei durchfallendem Licht betrachtet.

*Ergebnis.* Bei Anwendung von Cyankonzentrationen von 1:500 bis 1:5000 konnten gegenüber den ohne Cyanzusatz gefärbten Kontroll-

*muskel der Maus.*

vitalfärbung		Färbung des toten Gewebes					
pH 8,0		unterhalb des IEP <sub>M</sub>		oberhalb des IEP <sub>M</sub>			
Cytoplasma	Kern	Cytoplasma	Kern	Cytoplasma	Kern		
++ grün	++(+) grün	++ grün bis grün gelb	+++ grün gelb bis gelb	++ rotorange bis rot	+++ rotorange bis rot		
ohne Fluorescenz	+++ grün gelb	(+) schwach grünlich	++ grün gelb	(+) schwach grün bis grün gelb	+++ rot		

Tabelle 8. *Totes Herzmuskelgewebe vom Menschen.*  
Acridinorange 1:2000, Färbezeit 10 min.

pH	Muskelzelle		Endothel- bzw. Bindegewebzelle	
	Cytoplasma	Kern	Cytoplasma	Kern
3,5	+(+) dunkelgrün	++ grün	ohne Fluorescenz	+++ grün
3,8	++ grün	+++ grün	ohne Fluorescenz	+++ gelb
4,2	++ grün	+++ grün	(+) schwach grünlich	+++ gelborange
4,6	+++ gelbgrün	+++ gelbgrün	(+) schwach grünlich	+++ rotorange
5,2	+++ rotorange	+++(+) rotorange	(+) schwach grünlich	+++ rotorange
5,4	+++ rotorange	+++(+) rotorange	(+) schwach grünlich	+++ rotorange
5,6	+++ rotorange	+++ kupferrot	(+) schwach grünlich	+++ kupferrot
5,8	+++ rot mit grün- lichem Schimmer	+++ kupferrot	(+) schwach grünlich	+++ kupferrot
6,0	+++ rot mit grünlichem Schimmer	+++ kupferrot	(+) schwach grünlich	+++ kupferrot
7,0	+++ kupferrot	++ überwiegend rot, zum Teil grünlich	(+) schwach grünlich	+++ überwiegend rot, zum Teil grünlich
8,0	+++ gelborange bis rot	++ grün gelb	(+) schwach grünlich	+++ grün

schnitten keine Änderung der Acridinorangespeicherung in den toten Herzmuskelzellen (weder in Kern noch im Cytoplasma) beobachtet werden, obwohl diese Cyanmengen mit Sicherheit die Zellatmung hemmen. Dagegen zeigte sich unter der Einwirkung von Lösungen, denen Kaliumcyanid in einer Konzentration von 1:100 zugesetzt worden war, eine Verstärkung der Farbstoffadsorption im Cytoplasma und in den Kernen der Zellen.

Bei einem  $p_H$  von 5,4 angesetzte Versuche unter sonst gleichen Bedingungen ergaben genau den gleichen Befund. Auch konnte in einer weiteren Versuchsserie, bei der Schnitte vom Herzmuskel 15 min lang mit Farblösungen 1:10000 vom  $p_H$  3,5 und 5,4, denen KCN in einer Konzentration von 1:500 zugesetzt war, behandelt wurden, keine merkbare Hemmung der Farbstoffaufnahme und -speicherung der Zellen durch Cyan erzielt werden.

#### *Folgerungen.*

Aus den obigen Versuchen geht einwandfrei hervor, daß mit der angewandten Methode keine nachweisbare Verminderung der Adsorption von Acridinorange unterhalb und im Bereich des  $IEP_M$  der Zelleiweiße nach Hemmung der Atemfermente durch Cyan erreicht werden konnte. Wie die anscheinend erhöhte Speicherung von Acridinorange bei der Cyankonzentration von 1:100 zu erklären ist, muß vorläufig offenbleiben. Möglicherweise wird die Struktur der Plasmaeiweißkörper durch  $K^+$  oder  $CN^-$  derart verändert, daß eine erhöhte Aufnahme und Speicherung des Farbstoffes ermöglicht wird. Für diese Ansicht könnten die Versuche von KÖLBEL<sup>13</sup> sprechen, in denen an Hefezellen eine unterschiedliche Steigerung der Farbaufnahme und -speicherung nach verschiedenartigen Fixierungsmitteln festgestellt werden konnte. Die höchste Acridinorangespeicherung wurde in diesen Versuchen nach Einwirkung von Osmiumsäure ( $OsO_4$ ), welche als starkes Zellgift bekannt ist, beobachtet. Jedoch halte ich selbst es für wahrscheinlicher, daß die erhöhte Speicherung vorgetäuscht wird durch die Bildung der Cyanverbindung des Acridinorange innerhalb der Zellen bei diesen Versuchen. Wie in hierzu angestellten Versuchen festgestellt werden konnte, bildet sich bei dem Zusammensetzen von Acridinorange- und Cyanidlösungen das im Hell- und UV-Licht leuchtend rot gefärbte bzw. fluoreszierende Cyanid des Acridinorange als Niederschlag. Dieses Farbsalz ist in Wasser erheblich schwerer löslich als das üblicherweise zur Färbung angewandte Chlorzinkdoppelsalz.

Wenn auch die Ergebnisse der ersten Versuchsreihen zeigten, daß die verschiedenen Zellen entsprechend ihrer unterschiedlichen Stoffwechselaktivität Differenzen in der Acridinorangespeicherung aufweisen, so können diese Unterschiede doch wohl kaum auf das unter-

schiedliche Oxydationspotential zurückgeführt werden, wie die Cyanversuche zeigten. Somit kann die Hypothese von FRIEDENWALD und STIEHLER<sup>2</sup> über die Beeinflussung der Wanderung von Ionen nicht ohne weiteres auf alle Zellen übertragen werden und bedarf außerdem weiterer Nachprüfung. Das gleiche gilt für die von NASSONOV<sup>3</sup> auf Grund seiner Versuche geäußerten Ansichten. Die eigenen Versuche sprechen dafür, daß die von NASSONOV<sup>3</sup> und auch von RUNNSTRÖM<sup>4</sup> beobachteten Änderungen in der Speicherung von Vitalfarbstoffen nicht durch das veränderte Oxydationspotential, sondern im Sinne von RIES<sup>6</sup> durch die gleichzeitig ablaufende Strukturänderung der Plasmakolloide bedingt sind.

Da mit den bisherigen eigenen Versuchen keine Klärung über die Ursachen der unterschiedlichen Speicherung des Farbstoffes Acridinorange in Zellen verschieden hoher Stoffwechselaktivität gebracht werden konnte, sollen im folgenden Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Glykolyse und Acridinorangespeicherung angeschlossen werden.

#### D. Die Beziehungen zwischen Acridinorangespeicherung und Glykolyse in Zellen.

##### I. Acridinorangespeicherung durch Carcinomgewebe.

Um die Bedeutung der Glykolyse für die Acridinorangespeicherung und die Einwirkung glykolysehemmender Substanzen auf diese untersuchen zu können, schien es mir vorteilhaft, Zellen zu diesen Versuchen heranzuziehen, welche ihren Energiebedarf vorwiegend durch die Glykolyse decken. Bekanntlich nehmen Carcinomzellen in dieser Beziehung eine gewisse Sonderstellung ein, indem sie nämlich im extremen Ausmaß die anaerob ablaufenden glykolytischen Stoffwechselvorgänge als energieliefernde Prozesse heranziehen. Derartige Zellen wurden daher zuerst für die eigenen Untersuchungen verwandt.

*Erste Versuchsanordnung.* Eine durch Operation (Chirurgische Universitätsklinik Münster) gewonnene Lymphknotenmetastase eines Magencarcinoms wurde frisch auf dem Gefriermikrotom mit unterkühltem Messer geschnitten. Die 20  $\mu$  dicken Schnitte wurden sofort anschließend bei unterschiedlichem  $p_H$ -Wert mit gepufferten, isotonischen Farblösungen (Acridinorange 1:2000 in Phosphatpuffergemischen) 10 min lang gefärbt und anschließend 10 min in den entsprechenden farblosen Pufferlösungen ausgewaschen. Aufziehen und Eindecken der Präparate sowie Betrachtung unter dem Fluorescenzmikroskop erfolgte in üblicher Weise.

*Ergebnis* s. Tabelle 9.

*Zweite Versuchsanordnung.* Bei  $p_H$  3,5 wurden 20  $\mu$  dicke Gefrierschnitte von unfixierten Lebermetastasen eines Carcinoms der VATERschen Papille mit einer isotonischen Acridinorangelösung (1:2000 in Phosphatpuffer) 10 min lang gefärbt. Das Material wurde durch Obduktion gewonnen.

*Ergebnis.* Die Carcinomzellen wiesen bei diesen Färbeversuchen im Cytoplasma eine gelbrote bis kupferrote [+++(+)] Fluorescenzfarbe

Tabelle 9. Acridinorangespeicherung durch Carcinomgewebe.  
Acridinorange 1:2000, Färbezeit 10 min.

pH	Carcinomzellen		Lymphocyten und Reticulumzellen		Reticuläres Fasergerüst
	Cytoplasma	Kern	Cytoplasma	Kern	
7,0	++++ zum Teil gelbrot, zum Teil kupferrot	++++ zum Teil grün, zum Teil kupferrot	++ zum Teil schwach grün, zum Teil schwach kupferrot	+++ zum Teil grün, zum Teil kupferrot	rot
5,4	++++ gelbrot	++++ gelb	++ schwach grün	+++ gelb	rot
3,5	++++ gelbrötlich	++++ gelb	++ schwach grün	+++ gelb	rot
2,8	+++ gelborange	++++ gelb	++ schwach grün	+++ grün	rot
2,2	+++ gelborange	++++ gelb	++ schwach grün	+++ grün	rot
1,0	+++ gelborange	++++ gelb	++ schwach grün	+++ grün	rot

+= Leuchtintensität.

auf. Die Färbung der Kerne unterschied sich nicht von der des Zellplasmas. Die Leberzellen zeigten im Cytoplasma und Kern eine gleichartige grüne bis gelbe [++(+)] Sekundärfluoreszenz, dagegen hatten sich Endothel- und Bindegewebszellen in ihrem Plasmaanteil nur schwach grün [(+)] angefärbt, während deren Zellkerne heller grün [++] leuchteten.

#### Schlussfolgerungen.

Die Carcinomzellen des operativ gewonnenen, frischen Gewebes wie auch die des durch Obduktion erhaltenen toten Krebsmaterials zeigten in einem Ausmaß Acridinorangespeicherung, wie sie an anderen Zellen von mir bislang nicht beobachtet werden konnte. Dieses hohe Speicherungsmaß machte sich auch weit unterhalb des bei anderen Zellen üblichen isoelektrischen Punktes bemerkbar. Ob diese ungewöhnlich kräftige Adsorption des Farbstoffes auf die starke glykolytische Tätigkeit der Zellen oder aber auf Eigentümlichkeiten in der Struktur der Zellkolloide bzw. auf das Vorhandensein einer reichlicheren Anzahl saurer Valenzen der Eiweißkörper des Protoplasmas zurückgeführt werden muß, kann erst durch weitere Versuche geklärt werden.

Die Farbdifferenzen zwischen Krebszellen und den Zellen des infiltrierten Gewebes waren in den untersuchten Fällen derart deutlich, daß es sich lohnen würde, mit Hilfe der Acridinorange-Fluorochromierung

weitere Untersuchungen an Carcinomgewebe durchzuführen. Hinzuweisen ist auch auf die kräftige Adsorption des Acridinorange im retikulären Fasergerüst des Lymphknotens. Es handelt sich hier ja um Gewebsbestandteile, welche sicher nicht aktiv an Stoffwechselvorgängen beteiligt sind. Es zeigt dieser Befund damit deutlich, daß bei der Beurteilung experimenteller Befunde an tierischen Geweben der normale Reaktionsausfall für die einzelnen, zu untersuchenden Gewebsbestandteile eingehend klargestellt sein muß. Das Verhalten des Fasergerüstes ähnelt dem der Zellmembranen pflanzlicher Zellen (vgl. Tabelle I, S. 124), ist aber für die eigene Fragestellung, abgesehen von der Mahnung zur kritischen Beurteilung der Befunde an Parenchymzellen, weniger von Belang.

Um die Bedeutung der Glykolyse für das Ausmaß der Speicherung von Acridinorange ermessen zu können, werden weitere Versuche mit Hemmung der Glykolyse angeschlossen.

## *II. Einfluß des glykolysehemmenden Heptylalkohols auf die Speicherung von Acridinorange.*

*Erste Versuchsanordnung.* An weiteren Gefrierschnitten der Lymphknotenmetastase des Magencarcinoms wurden bei einem  $p_H$  von 3,5 Färbungen mit Acridinorange 1:10000 angestellt. Bei einem Teil der Färbeversuche waren sämtliche Farb- und Auswaschlösungen mit Heptylalkohol gesättigt.

*Ergebnis* s. Tabelle 10.

Das Fehlen der roten Töne im Plasma der Carcinomzellen nach Zusatz von Heptylalkohol zeigt an, daß die Farbstoffaufnahme aus den mit Heptylalkohol gesättigten Lösungen geringer war als aus zusatzfreien Farbansätzen. Die Kerne der Carcinomzellen sowie das übrige Gewebe wiesen gegenüber den Kontrollen keine Farbänderungen auf.

*Zweite Versuchsanordnung.* Gleiche Gefrierschnitte wurden zuerst mit zusatzfreien Lösungen (Acridinorange 1:10000 in isotonischem Phosphatpuffergemisch) bei  $p_H$  3,5 gefärbt und ausgewaschen, sodann wurde ein Teil der Schnitte nachträglich 10 min lang mit einer Pufferlösung ausgewaschen, welche mit Heptylalkohol gesättigt war. Die übrigen Gewebschnitte wurden gleiche Zeit mit zusatzfreier Pufferlösung nochmals ausgewaschen.

Tabelle 10. Acridinorange 1:10000, Färbezeit 10 min,  $p_H$  3,5.

	Carcinomzellen		Lymphocyten und Reticulumzellen	
	Cytoplasma	Kern	Cytoplasma	Kern
Ohne Zusatz	+++ gelbrötl.	+++ gelb	(+) schwach grün	++ gelb
Mit Zusatz von Heptylalkohol	++ gelb	+++ gelb	(+) schwach grün	++ gelb

*Ergebnis* s. Tabelle 11.

Tabelle 11. Acridinorange 1:10000, Färbezeit 10 min,  $p_H$  3,5.

	Carcinomzellen		Lymphocyten und Reticulumzellen	
	Cytoplasma	Kern	Cytoplasma	Kern
Ohne Zusatz gefärbt und ausgewaschen	+++ gelbrötlich	+++ gelb	(+) schwach grün	++ gelb
Unter Zusatz von Heptylalkohol ausgewaschen	++ gelb	+++ gelb	(+) schwach grün	++ gelb

Es ergab sich demnach nach dem Auswaschen mit heptylalkoholhaltiger Lösung das gleiche Bild, als seien die Schnitte von vornherein unter Zusatz von Heptylalkohol gefärbt worden. Ein Teil des adsorbierten Farbstoffes wurde also durch diese Behandlung aus den Tumorzellen herausgelöst.

*Dritte Versuchsanordnung.* 20  $\mu$  dicke Gefrierschnitte vom unfixierten menschlichen Leichenherzen wurden bei  $p_H$  3,5 mit Acridinorange (1:10000 in isotonischem Phosphatpuffergemisch) 10 min lang mit und ohne Zusatz von Heptylalkohol gefärbt.

*Ergebnis.* Die Fluoreszenzfarbe war in beiden Versuchsreihen gleich und entsprach den früheren Befunden am gleichen Material, jedoch war anscheinend die Intensität der Sekundärfluoreszenz des Muskelzellplasmas bei der unter Zusatz von Heptylalkohol erfolgten Färbung geringfügig schwächer als in den Kontrollschnitten.

#### *Schlußfolgerung.*

Als erstes ist festzustellen, daß von den bisher untersuchten tierischen und menschlichen Zellen überlebende oder tote Carcinomzellen bei einer Wasserstoffionenkonzentration der Färbelösung von  $10^{-3,5}$  den Farbstoff Acridinorange im stärksten Ausmaß speichern. Ein Teil des von den Tumorzellen adsorbierten Farbstoffes wurde unter der Behandlung mit Heptylalkohol von den Zellen wieder abgegeben. Dieser Teil des Farbstoffes war demnach nicht elektroadsorptiv auf Grundlage einer Austauschadsorption von Ionen gebunden, denn die Farbstoffverdrängung geschah durch einen elektroneutralen Stoff. Diese Farbmenge mußte vielmehr mit Hilfe der „echten“ oder „VAN DER WAALSSCHEN“ Adsorption, also unter der topochemischen Bildung von Molekül-(Nebervalenz-) Verbindungen auf der Oberfläche des Adsorbens (HESSE und SAUTER<sup>21</sup>) gebunden sein. Nach Untersuchungen von HESSE und SAUTER an Aluminiumoxyd erfolgen Austauschadsorption und VAN DER WAALSSCHE Adsorption an verschiedenen Örtlichkeiten der Oberfläche des Adsorbens. Diese unabhängig voneinander vor sich gehenden Adsorptionsmecha-

nismen unterliegen dabei unterschiedlichen Gesetzen. Auch dann, wenn Heptylalkohol den adsorbierenden Zelleiweißen der Carcinomzelle gleichzeitig mit dem Farbstoff Acridinorange geboten wird, erfolgt eine geringere Speicherung von Acridinorange, es wird damit angezeigt, daß der elektroneutrale Heptylalkohol bei der Adsorption bevorzugt wird. Durch die Untersuchungen von WARBURG<sup>9</sup> und MINAMI<sup>8</sup> ist bekannt, daß Heptylalkohol die Glykolyse hemmt und zwar beruht diese Hemmung nach deren Ansicht darauf, daß Heptylalkohol an den zur Glykolyse erforderlichen submikroskopischen Strukturoberflächen der Zelle adsorbiert wird. Wenn in den eigenen Versuchen ein Teil des Farbstoffes Acridinorange an den gleichen Örtlichkeiten der Strukturoberfläche gebunden wird wie Heptylalkohol, so sind dies aller Wahrscheinlichkeit nach diese glykolytisch wirksamen Oberflächen. Diese Ansicht steht auch in Übereinstimmung mit dem Befund von YABUSOE<sup>7</sup>, daß Acridinorange die Tumorglykolyse teilweise hemmt. Ob die Haftpunkte an der Strukturoberfläche für Heptylalkohol bzw. Acridinorange gleichzeitig die Lokalisationsstellen der zur Glykolyse erforderlichen Fermentsysteme darstellen, ist möglich, doch kann diese Frage durch die eigenen Untersuchungen nicht geklärt werden.

Aus den obigen Versuchen, insbesondere denen an Herzmuskelzellen, geht aber hervor, daß auch unterhalb des IEP<sub>M</sub> der Gewebeeiweiße der größte Teil des adsorbierten Farbstoffes nicht an der artigen, glykolytisch wirksamen Oberflächen durch VAN DER WAALSSCHE Adsorption gebunden ist, denn nur eine relativ geringe Menge des Farbstoffes wurde durch Heptylalkohol verdrängt. Ob es sich bei der nicht verdrängten Farbstoffmenge um Austauschadsorption an extrem sauren Zellbestandteilen, um VAN DER WAALSSCHE Adsorption an nicht durch Heptylalkohol besetzbare Oberflächen, um Diffusion des Farbstoffes in submikroskopische Zellsafräume oder um Lösung des Farbstoffes in Lipoiden handelt, soll in dieser Arbeit nicht weiter untersucht werden.

Zur quantitativen Messung der durch Hemmung der Glykolyse verringerten Farbstoffspeicherung werden im folgenden Untersuchungen an Hefezellen durchgeführt.

### *III. Der Einfluß glykolysehemmender Substanzen auf die Speicherung von Acridinorange durch Hefezellen.*

Nach Untersuchungen von KÖLBEL<sup>13</sup> sind zu quantitativen Untersuchungen über die Speicherung von Acridinorange im Protoplasma Hefezellen besonders gut geeignet. In gleicher Weise stellen aber auch die Hefezellen ein geeignetes Objekt für Studien über die Glykolyse dar (WARBURG<sup>9</sup>). Für die eigenen Versuche wurde die von KÖLBEL ausgearbeitete Methode mit geringen, durch die zur Verfügung stehenden Geräte bedingten Abweichungen angewandt.

Tabelle 12. Acridinorange 1:10000, Färbezeit 10 min,  $p_{\text{H}}$  7,3, Hefe 100 mg.

	Hemmung durch Heptylalkohol (gesättigte, wässrige Lösung)		Hemmung durch Äthylurethan (3 %)	
	amerikanische Trockenhefe	Bäckerhefe	amerikanische Trockenhefe	Bäckerhefe
Farbstoffaufnahme in Milligramm in der Leerkontrolle . . .	0,7725	0,6900	0,7625	0,5375
Farbstoffaufnahme in Milligramm in dem Hemmungsversuch .	0,5750	0,5125	0,6500	0,4625
Hemmung in Prozent .	25,9	25,4	14,8	14,0

*Erste Versuchsanordnung.* In den einzelnen Versuchsansätzen wurden 0,1 (bzw. 0,4) g Hefe in 5 (bzw. 20) cm<sup>3</sup> Leitungswasser ( $p_{\text{H}} = 7,3$ ) im Zentrifugenglas suspendiert. Dieser Suspension wurden 5 (bzw. 20) cm<sup>3</sup> Acridinorangelösung (1:5000 in Leitungswasser) zugesetzt, so daß eine Endkonzentration des Farbstoffs von 1:10000 vorlag. Nach einer Einwirkungszeit von 10 min wurde 10–15 min scharf zentrifugiert und sodann die überstehende Farblösung im Stufenphotometer (Filter S 53, 20-mm-Cuvette) photometriert. Die Differenz der Farbstoffkonzentration zwischen der in gleicher Weise verdünnten, ursprünglichen Farblösung und der überstehenden Restlösung ergab die von den Hefezellen aufgenommene Farbstoffmenge. Diese wurde jeweils für 100 mg Hefe berechnet. In den Hemmungsversuchen wurden sämtliche angewandte Lösungen mit Heptylalkohol gesättigt oder mit Äthylurethan in einer Konzentration von 3 % versetzt.

#### Versuchsbeispiel (s. Tabelle 12).

*Zweite Versuchsanordnung.* 0,1 (bzw. 0,4) g Hefe wurden zunächst entsprechend der ersten Versuchsanordnung ohne Zusatz glykolysehemmender Stoffe gefärbt, dann wurden die Hefezellen von dem anhaftenden, nicht adsorbierten Farbstoff freigeswaschen. Anschließend erfolgte die Suspension der Hefezellen in 10 (bzw. 40) cm<sup>3</sup> Leitungswasser, welchem 3 % Äthylurethan oder Heptylalkohol bis zur Sättigung zugesetzt worden war. Nach einer Einwirkungszeit von 10 min wurde wiederum 10–15 min lang scharf zentrifugiert und sodann mit dem Stufenphotometer die Farbstoffkonzentration in der überstehenden Restlösung bestimmt.

#### Versuchsbeispiel (s. Tabelle 13).

*Ergebnis der Versuche.* Durch die beiden angewandten glykolysehemmenden Substanzen wird die Speicherung des Farbstoffes Acridinorange gehemmt. Die Hemmungseffekte mit durchschnittlich 25 % bei Heptylalkohol und 14 % bei Äthylurethan sind zwar erheblich, erreichen jedoch nicht die Zahlen wie bei der Glykolysehemmung. An intakten Hefezellen beträgt nach WARBURG<sup>9</sup> und MINAMI<sup>8</sup> die Hemmung der Glykolyse bei Heptylalkohol 100 % und nach Äthylurethan (3 % ig) 41 %. Auffallend ist jedoch die Tatsache, daß bei beiden Hemmungsvorgängen Heptylalkohol die stärkere Wirkung ausübt. Daß bei den Hemmungsversuchen Acridinorange von der glykolysehemmenden Substanz bei der Adsorption verdrängt wird, geht aus der zweiten Versuchsanordnung hervor.

Tabelle 13. Acridinorange 1:10000, Färbezeit 10 min, pH 7,3, Hefe 100 mg.

	Farbstoffverdrängung durch Heptylalkohol (gesättigte, wässrige Lösung)		Farbstoffverdrängung durch Äthylurethan (3 %)	
	amerikanische Trockenhefe	Bäckerhefe	amerikanische Trockenhefe	Bäckerhefe
Farbstoffaufnahme in Milligramm . . . . .	0,6250	0,5000	0,7475	0,3500
Farbstoffabgabe unter Einwirkung des Phar- makons . . . . .	0,0975	0,1125	0,0500	0,0875
Farbstoffabgabe in Prozent der anfäng- lich aufgenommenen Menge . . . . .	15,6	22,5	8,0	25,0

Um feststellen zu können, ob bei dem Ausfall der Hemmungsversuche glykolytisch wirksame Fermente eine Rolle spielen, wurden weitere Versuche an abgetöteter Hefe unternommen.

Dritte Versuchsanordnung. 0,1 g amerikanischer Trockenhefe wurde in 5 cm<sup>3</sup> Leitungswasser suspendiert, welchem 6 % Äthylurethan zugesetzt worden war. Diese Suspension wurde im Zentrifugenglas 5 min im Wasserbad zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen wurden 5 cm<sup>3</sup> Acridinorangelösung (1:5000 in Leitungswasser) zugefügt, 10 min lang stehen gelassen und dann 10 min lang zentrifugiert. Die überstehende Restlösung wurde in der üblichen Art photometriert. Als Kontrollen wurden entsprechende Versuchsansätze ohne Zugabe von Urethan in der gleichen Weise behandelt. In entsprechender Art wurden weitere Versuche durchgeführt, in denen an Stelle des Urethanzusatzes sämtliche Lösungen mit Heptylalkohol gesättigt worden waren.

Versuchsbeispiel (s. Tabelle 14).

Ergebnis. Die Hemmungsversuche an durch Kochen abgetöteter Hefe, bei welcher die glykolytisch wirkenden Fermente durch die angewandte Temperatur inaktiviert worden waren, zeigen, daß die Enzyme für die Speicherung von Acridinorange und deren Hemmung durch glykolysehemmende Agentien nicht von Bedeutung sein können. Es ist damit erwiesen, daß die Speicherung von Acridinorange an der Oberfläche von Strukturteilen vor sich geht und zwar zum Teil an der

Tabelle 14. Acridinorange 1:10000, Färbezeit 10 min, pH 7,3, durch Kochen abgetötete Hefe: 100 mg.

	Hemmung durch Heptyl- alkohol (gesättigte, wässrige Lö- sung)		Hemmung durch Äthylurethan (3 %)	
	amerikanische Trockenhefe		amerikanische Trockenhefe	
Farbstoffaufnahme in Milligramm in der Leerkontrolle . . .			0,7000	0,5375
			0,5375	
Farbstoffaufnahme bei Einwirkung des Pharmakons . . .			0,5625	0,4500
Hemmung in Prozent			18,2	16,3

gleichen Strukturoberfläche, welche die Stoffe Heptylalkohol und Äthylurethan adsorbiert. Alle 3 Substanzen, Acridinorange, Heptylalkohol und Urethan hemmen infolge ihrer Adsorption die Glykolyse in den Zellen, wie aus Untersuchungen von WARBURG<sup>9</sup>, MINAMI<sup>8</sup> und YABUSOE<sup>7</sup> bekannt ist. Die durch glykolysehemmende Stoffe aus der Zelle verdrängbare Menge an Acridinorange wird somit aller Wahrscheinlichkeit nach an Örtlichkeiten der Strukturoberfläche gebunden sein, welche für die Glykolyse von Bedeutung ist.

#### Zusammenfassende Erörterung der Versuchsergebnisse.

Auf Grund der eigenen Versuche kann festgestellt werden, daß die von STRUGGER<sup>10</sup> für den botanischen Bereich ausgearbeitete Methode der Fluorochromierung von Zellen mittels Acridinorange auch bei der Untersuchung tierischen Gewebes ein wertvolles Hilfsmittel darstellt. Voraussetzung ist allerdings die Anwendung von Reaktionsbedingungen, welche dem tierischen Gewebe angepaßt sind. Aber auch dann ergibt sich mit dem Acridinorange kein Färbeverfahren, welches als Routine-methode angewandt werden könnte, sondern die Fluorochromierung mittels Acridinorange bleibt immer ein Verfahren, welches als wissenschaftliche Forschungsmethode nur wirklich geschulten Kräften überlassen bleiben sollte. Bei einer dem Forschungsexperiment entsprechenden Anwendung und bei gleichfalls kritischer Auswertung werden sich am ehesten Mißerfolge und Fehldeutungen vermeiden lassen.

In den angeführten Versuchen sollte zunächst die Methode der Fluorochromierung tierischer Gewebe ausgearbeitet und diese dann zur Untersuchung zweier Fragen, nämlich der Bedeutung des Oxydations-potentials der Herzmuskelzelle und der Glykolyse für die Aufnahme und Speicherung basischer Farbstoffe in Zellen, angewandt werden.

Es zeigte sich, daß wie in Pflanzenzellen auch in der tierischen Herzmuskelzelle der Farbstoff Acridinorange im wesentlichen auf Grund elektrostatischer Bindung im Zellprotoplasma gespeichert wird. Doch ein Teil des Farbstoffes wird auch auf andere Art und Weise, sehr wahrscheinlich mit Hilfe VAN DER WAALSSCHER Kräfte an solche Struktur-oberflächen adsorbiert, welche von elektroneutralen, bei ihrer Adsorption die Glykolyse hemmenden Substanzen besetzt werden können. Wenn es auch nicht vollkommen bewiesen werden konnte, so ist doch anzunehmen, daß dieser Anteil des ebenfalls die Glykolyse hemmenden Farbstoffes Acridinorange an Strukturoberflächen gebunden wird, welche bei der Glykolyse von Bedeutung sind.

Aus den eigenen Versuchen geht hervor, daß der Färbeeffekt bei vitaler und supravitaler Fluorochromierung des Herzmuskels mit Acridinorange vollkommen der gleiche ist. Bei supravitaler Färbung war eine Verstärkung der Fluorescenzerscheinungen nach Verschiebung des  $p_H$ -Wertes der Farblösung in den alkalischen Bereich möglich. Alle

gefärbten Anteile der Zelle zeigten bei vitaler und supravitaler Färbung eine ausgesprochene Grünfluorescenz. Niemals konnte an lebenden oder überlebenden Herzmuskelzellen eine rotorange oder kupferrote Fluorescenzfarbe erreicht werden. Im Gegensatz hierzu traten jedoch an toten Muskelzellen des Herzens rote Farbeffekte im Cytoplasma und Kern auf, sofern nur oberhalb des  $IEP_M$  der Zelleiweiße und mit einem Farbstoffüberschuß gefärbt wurde. Der Kern selbst zeigte im vitalen und supravitalen Zustand grüne bis grüngelbe Fluorescenzfarben, regelmäßig war er vom Cytoplasma durch seine stärkere Leuchtintensität deutlich zu unterscheiden. Diese Färbungsergebnisse an tierischen Herzmuskelzellen ergaben eine überraschend gute Übereinstimmung mit dem Färbungsausfall an Pflanzenzellen, wie ihn STRUGGER<sup>10</sup> beschreibt.

Hervorzuheben ist die Tatsache, daß Acridinorange das Cytoplasma vital diffus anfärbt. Die bisher bekannten basischen Vitalfarbstoffe, wie unter anderem Neutralrot und Methylenblau färben dagegen in fast allen tierischen Zelltypen präformierte Gebilde (Granula, Vacuolen usw.) (RIES<sup>6</sup>). Mit den anderen basischen Vitalfarbstoffen hat aber Acridinorange gemeinschaftlich die Fähigkeit, unter gleichen Färberscheinungen ebensgleich supravital die Zellen zu färben wie nach Injektion des Farbstoffes in den lebenden Organismus.

Differente Färbeeffekte gegenüber den Herzmuskelzellen ergaben aber die Zellen des Interstitiums, also Bindegewebs- und Endothelzellen. Hier war im vitalen und auch supravitalen Zustand eine Plasmafärbung überhaupt nicht festzustellen, während die Zellkerne regelmäßig eine kräftige Fluorescenz aufwiesen, die meist stärker und gelblicher war, als in den Muskelzellkernen. Eine Speicherung des Farbstoffes hatte im lebenden und überlebenden Cytoplasma der Endothel- und Bindegewebszellen demnach in genügender Konzentration nicht stattgefunden, doch trat eine solche nach Absterben der Zellen auf, so daß auch an diesen Zellen mit dem Absterbevorgang eine erhöhte Speicherungsfähigkeit des Cytoplasma verbunden war. Wenn auch damit grundsätzlich der gleiche, zur erhöhten Speicherung führende, kolloidchemische Vorgang am Cytoplasma eintrat, so besitzen doch im tierischen Organismus nicht alle Zellen im toten Zustand eine solch ausgesprochene Speicherfähigkeit für Acridinorange, daß in jedem Fall rote Fluorescenzfarben erreicht würden. Damit entfällt die Möglichkeit, ohne weiteres auf Grund des Färbeerfolges über die Vitalität jeder einzelnen Zelle Schlüsse ziehen zu können. Ein genau gegensätzliches Verhalten zeigten Carcinomzellen. Hier traten sowohl an überlebenden wie an toten Zellen im Cytoplasma und Kern orange bis rote Farbnuancen auf und zwar auch dann, wenn weit unterhalb des sonst üblichen  $IEP_M$  gefärbt wurde. Mit diesem Befund sind drei verschiedene Zelltypen des tierischen Organismus gekennzeichnet, die in ihrem Verhalten die überhaupt möglichen Färbeeffekte aufweisen. Diese Beobachtung ist von grundsätzlicher

Bedeutung für weitere Untersuchungen an tierischem Gewebe mit der Methode der Acridinorange-Fluorochromierung. Nicht in jedem Fall sind im Cytoplasma grün gefärbte Zellen lebend und umgekehrt unter Umständen auch, supravital wenigstens, rötliche Fluoreszenzfarben an nichttoten Zellen auftreten. Die Untersuchungen von STRUGGER<sup>10</sup> und Mitarbeiter<sup>13,15</sup> erfolgten immer an einem relativ einheitlichen Material, welches in gleicher Weise wie die Herzmuskelzellen in den eigenen Versuchen reagierte. Unabhängig jedoch von der eben genannten Einschränkung konnte die Feststellung von STRUGGER auch an tierischem Gewebe bestätigt werden, daß tote Zellen in jedem Fall eine kräftigere Speicherung von Acridinorange aufweisen als lebende. Durch die eigene Fragestellung wurde die unterschiedliche Speicherung von Acridinorange zwischen den verschiedenen Zelltypen in Beziehung gesetzt zur Stoffwechselaktivität dieser Zellen. Das Oxydationspotential hat anscheinend für das Ausmaß der Farbspeicherung keine Bedeutung, während Beziehungen zur Glykolyse sehr wahrscheinlich bestehen. Allerdings weist die Adsorption von Acridinorange keine unmittelbaren Zusammenhänge mit dem fermentativ katalysierten Vorgang der Glykolyse selbst auf, sondern lediglich mit den submikroskopischen Strukturoberflächen, an denen die Glykolyse in der Zelle abläuft. Möglicherweise sind es Strukturoberflächen, an welchen die Kohlenhydrate zur glykolytischen Spaltung adsorbiert werden. Bei den eigenen Versuchen über die Hemmung der Farbstoffadsorption durch glykolysehemmende Stoffe handelte es sich in beiden Fällen um Nar-kotica. Die Hemmung war somit unspezifisch und stellte Oberflächenreaktionen dar. Allerdings wird nur ein kleinerer Teil des Farbstoffes Acridinorange mit Hilfe VAN DER WAALSSCHER Kräfte an die submikroskopische Protoplasmastuktur gebunden. Der Hauptanteil des Farbstoffes wird dagegen mittels Elektroadsorption an amphotere Zell-eiweißkörper festgehalten, während ein weiterer Teil des Farbstoffes wohl entsprechend der Ansicht von STRUGGER durch Ionenaustauschreaktion (Elektroadsorption) an Cytoplasmabestandteile ohne amphoteren Charakter adsorbiert wird. Die unterschiedlichen Färbeeffekte zwischen den verschiedenen Zelltypen können nun aber nicht allein auf stärkere oder geringere glykolytische Aktivität oder besser gesagt mehr oder weniger umfangreiches Vorhandensein glykolytisch wirksamer Oberflächen bezogen werden, denn in Hemmungsversuchen mit Heptylalkohol an Krebszellen, bei denen also die in Frage kommenden Strukturgrenzflächen entsprechend den Untersuchungen von WARBURG<sup>9</sup> und MINAMI<sup>8</sup> zu 100% blockiert waren, zeigte sich doch noch eine höhere Speicherungsfähigkeit als in Bindegewebszellen mit verhältnismäßig geringer Stoffwechselaktivität. Der gleiche Befund traf übrigens auch für die Herzmuskelzellen zu. Diese Unterschiede in der Speicherungsfähigkeit für das Acridinorange müssen somit auf Eigen-

schaften des Protoplasmas beruhen, welche eine unterschiedliche Elektroadsorption bedingen können. Über die Art dieser Struktureigenheiten des Cytoplasmas können nur Vermutungen ausgesprochen werden. Verlockend ist es, entsprechend der durch Nucleoproteide bedingten kräftigen Speicherung des Farbstoffes in den Zellkernen, anzunehmen, der unterschiedliche Gehalt des Cytoplasmas an phosphorsäurehaltigen Komplexen (unter anderem Ribonucleinsäure, Lactacidogen, Kreatinphosphorsäure, Muskeladenylsäure, Adenosintriphosphorsäure, Co-Zymase; vgl. LEHNARTZ<sup>22</sup>) würde die differenten Färbeergebnisse auf Grund der zur Verfügung stehenden freien Säuregruppen hervorgerufen. Diese Annahme würde unter Umständen auch die extrem hohe Speicherung in den Krebszellen verständlich machen, wenn man nämlich entsprechend der Ansicht von FLASCHENTRÄGER und BULLET<sup>23</sup> in den Krebszellen ein tumorproduzierendes Agens annimmt, welches Enzymnatur besitzen und wie die Viren aus Nucleoproteiden aufgebaut sein soll. Aber, wie gesagt, es können nur Vermutungen geäußert werden, denn es kann sich ebenso wahrscheinlich um Unterschiede im kolloidalen Zustand des Cytoplasmas handeln, welche in naher Beziehung zum Fermentapparat der Zelle stehen können (Literatur vgl. LEHNARTZ<sup>22</sup>).

#### *Zusammenfassung.*

1. Die Methodik der Fluorescenzmikroskopie mit Ultraviolett- und Blaulichterregung der Fluorescenz zur Beobachtung im durchfallenden und auffallenden Licht wird eingehend beschrieben.
2. Die von STRUGGER zu zellphysiologischen Untersuchungen an Pflanzen ausgearbeitete Fluorochromierung der Zellen mit dem basischen Fluorescenzfarbstoff Acridinorange wird für Untersuchungen an lebenden, überlebenden und toten tierischen und menschlichen Geweben neu ausgebaut.
3. Es zeigte sich, daß Herzmuskelzellen bei Anwendung isotonischer, gepufferter Farblösungen sich praktisch so verhalten wie Pflanzenzellen. Im Gegensatz hierzu zeigen Bindegewebs- bzw. Endothelzellen und Carcinomzellen bei der Fluorochromierung mit Acridinorange ein völlig abweichendes Bild.
4. An toten Zellen ist mit dieser Methode eine einfache Bestimmung des isoelektrischen Punktes der Zellbestandteile möglich.
5. Es wird geprüft, ob sich die Differenzen im Verhalten der einzelnen Zelltypen auf die unterschiedliche Stoffwechselaktivität der Zellen zurückführen lassen.
6. Das mehr oder weniger hohe Oxydationspotential der verschiedenen Zellen ist nach Versuchen mit Cyanvergiftung der zelleigenen Atemfermente ohne Einfluß auf die Speicherung von Acridinorange.
7. Die ihren Energiebedarf vorwiegend durch Glykolyse deckenden Carcinomzellen zeigen die bisher beobachtete stärkste Speicherung von Acridinorange.

8. Der glykolysehemmende Heptylalkohol hemmt bei Zusatz zur Farblösung teilweise die Acridinorangespeicherung und kann nach bereits vollzogener Färbung einen Teil des Farbstoffes aus den Zellen verdrängen.

9. Bei quantitativen Versuchen an Hefezellen weist neben Heptylalkohol auch Äthylurethan eine Hemmwirkung auf die Farbstoffspeicherung auf. Diese Hemmung wird in Beziehung gebracht zur „narkotischen“ Hemmung der Glykolyse als Oberflächenwirkung durch die beiden gleichen Substanzen.

10. Es lässt sich damit die Speicherung von Acridinorange in den untersuchten Zellen auf 3 Einzelfaktoren zurückführen: a) Elektroadsorption an amphotere Eiweißkörper, b) VAN DER WAALSSCHE Adsorption an Oberflächen, die in gleicher Weise von den glykolysehemmenden Stoffen Heptylalkohol und Äthylurethan besetzt werden können und c) elektrostatische Bindung an Zellbestandteile ohne amphoteren Charakter.

#### Literatur.

- <sup>1</sup> SCHÜMMELEFEDER, N.: Virchows Arch. **317**, 707 (1949). — <sup>2</sup> FRIEDENWALD, J. S., and J. D. STIEHLER: Arch. of Ophthalm. **20**, 761 (1938). — <sup>3</sup> NASSONOV, D.: Z. Zellforschg **11**, 179 (1930). — <sup>4</sup> RUNNSTRÖM, J.: Protoplasma (Berl.) **5**, 201 (1929); **10**, 106 (1930). — <sup>5</sup> GERSH, M., u. E. RIES: Roux' Arch. **136** (1937). — <sup>6</sup> RIES, E.: Grundriss der Histophysiologie. Allgemeine Methoden und Probleme. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft 1938. — <sup>7</sup> YABUSOE, M.: Biochem. Z. **168**, 227 (1926). — <sup>8</sup> MINAMI, S.: Biochem. Z. **142**, 334 (1923). — <sup>9</sup> 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: W. Saenger 1948. — <sup>10</sup> STRUGGER, S.: Jena. Z. Naturwiss. **73**, 97 (1940). — Z. Mikrosk. **57**, 415 (1940). — Dtsch. tierärztl. Wschr. **1940**, 645; **1942**, 51; **1947**, 161. — Flora (Jena) **135**, 101 (1941); **137**, 73 (1943). — Z. Fleisch- u. Milchhyg. **54**, 161 (1943); Canad. J. Res. **26**, 188 (1948). — Naturwiss. **34**, 267 (1947). — STRUGGER, S., u. P. HILLBRICH: Dtsch. tierärztl. Wschr. **1942**, 121. — STRUGGER, S., u. G. ROSENBERGER: Dtsch. tierärztl. Wschr. u. Dtsch. tierärztl. Rdsch. **1944**, Nr 39/40. — ROUSCHAL, Ch., u. S. STRUGGER: Naturwiss. **31**, 300 (1943). — <sup>11</sup> KREBS, A.: Strahlenther. **75**, 346 (1944). — Naturwiss. **34**, 59 (1947). — <sup>12</sup> BUKATSCH, Fr., u. M. HAITINGER: Protoplasma (Berl.) **34**, 515 (1940). — <sup>13</sup> KÖLBEL, H.: Z. Naturforschg **2b**, 382 (1947). — <sup>14</sup> JENSEN, K. A.: Z. anal. Chem. **94**, 177 (1933). — <sup>15</sup> JOHANNES, H.: Zit. nach S. STRUGGER: Naturwiss. **34**, 267 (1947). — <sup>16</sup> GÄRTNER, K.: Z. Hyg. **125**, 86 (1943). STRICKL, O., u. K. GÄRTNER: Z. Hyg. **125**, 226 (1943). — <sup>17</sup> ASHER: Tagg dtsch. Physiologen, Bonn 1947. Zit. nach S. STRUGGER: Naturwiss. **34**, 267 (1947). — <sup>18</sup> ELLINGER, Ph., u. A. HIRT: Z. Anat. **90**, 791 (1929). — Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **145**, 193 (1929); **150**, 111 (1930). — ABDERHALDEN'S Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Bd. V, Abt. 2/2, S. 1753. 1930. — Umsch. **34**, 136 (1930). — <sup>19</sup> MURALT, A. v.: Einführung in die praktische Physiologie. Berlin: Springer 1944. — <sup>20</sup> KORDATZKI, W.: Taschenbuch der praktischen  $p_{\text{H}}$ -Messung. München: Müller & Steinicke 1938. — <sup>21</sup> HESSE, G., u. O. SAUTER: Naturwiss. **34**, 250 (1947); **34**, 251 (1947). — <sup>22</sup> LEHNARTZ, E.: Zbl. inn. Med. **59**, 65 (1938). — <sup>23</sup> FLASCHENTRÄGER, B., u. F. BULLET: Schweiz. med. Wschr. **1944**, 290.