

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Tübingen
(Direktor: Prof. Dr. E. LETTERER).

Histochemische Versuche an der Amyloidsubstanz.

Von

HANS-PETER MISSMAHL.

(Eingegangen am 23. November 1949.)

1. Über Verdauungsversuche an Amyloideiweiß, zugleich ein Beitrag zur Jodreaktion.

Der Wunsch, den Eiweißkörper „Amyloid“ rein zu erhalten, trat schon kurze Zeit, nachdem FRIEDREICH und KÉKULÉ die Eiweißnatur des Amyloid erkannten, auf.

KÜHNE und RUDNEFF lösten aus amyloiden Organen zuerst mit kaltem Wasser und dann mit verdünnten Säuren die darin löslichen Substanzen und verdauten sie dann mit „künstlichem Magensaft“. Den unverdaulichen Teil wuschen sie mit 0,4%iger Salzsäure und Wasser und erhielten schließlich durch Trocknen ein schneeweißes Pulver. Sie nahmen an, daß dies Amyloid sei. KRAWKOW kommt ebenfalls zu dem Ergebnis, daß Amyloid peptisch nicht verdaut werden kann. HANSSEN isolierte aus einer Sagomilz die „Sagokörnchen“ durch Ausschütteln. Die getrockneten Körnchen ergaben ein schneeweßes Pulver, welches ebenfalls unverdaulich blieb.

TSCHERMAK kommt zu dem Schluß, daß sich das Amyloid bei der peptischen Verdauung zunächst nicht löst, läßt man aber die Verdauung längere Zeit einwirken, dann entstehen „primäre und sekundäre Albumosen und Pepton“. Auch NEUBERG fand bei seinen Versuchen eine peptische Verdaubarkeit des Amyloid. Er stellte sich zuerst nach den Angaben von KRAWKOW durch peptische Verdauung Amyloid her, welches selbst wieder mit „guten Präparaten“ peptisch verdaubar sei. MAYEDA fand, daß das Amyloid bei peptischer Verdauung in Lösung ging, er läßt aber die Möglichkeit offen, daß es ein unverdauliches Amyloid gibt. Ganz anders als die bisher angeführten Autoren sieht SCHMIEDEBERG das Problem der peptischen Verdaubarkeit des Amyloid. Er glaubt, daß Amyloid nicht unverdaulich sei, die Verdauungsprodukte selbst seien in Säuren, also auch in Pepsinsalzsäure unlösbar.

Ein Fall einer sehr ausgeprägten Amyloidose, der im Pathologischen Institut Tübingen seziert wurde, schien uns geeignet, eigene Verdauungsversuche am Amyloid anzustellen.

Sektionsprotokoll. „Die Milz ist etwas vergrößert und zeigt eine feste, fast gummiartige Konsistenz. Die Kapsel zart und durchscheinend, Farbe frisch dunkelrot. Auffallend glatte Schnittfläche von schinkenartigem Aussehen. Follikel- und Trabekelzeichnung treten kaum noch in Erscheinung“ (Protokoll 260/1948).

14 Tage vor seinem Tode hatte der Patient intravenös Kongorot injiziert bekommen, der Kongorotschwund betrug 82 %. Bei der Sektion fiel auf, daß das Amyloid, vor allem in den Nebennieren, auffallend rötlich aussah. Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnte mit einer deutlichen Rotfluorescenz gezeigt werden, daß in dem Amyloid noch Kongorot vorhanden war.

Um die Milz der Verdauung leichter zugänglich zu machen, wurde sie mit dem Messer geschabt. Auf diese Weise erhielten wir aus der Milz eine frischrot aussehende breiige Masse, die in ihrem Aussehen an Tomatenmark erinnerte. Als Rest blieben zusammenhängende Bindegewebsstränge zurück. Das geschabte Material wurde 12 Std hindurch ständig abwechselnd mit destilliertem Wasser und physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, um die restlichen Blutbestandteile auszuwaschen. Beim Wechseln der Waschflüssigkeit wurde jeweils scharf zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit abgeschüttet. Diese Flüssigkeit zeigte in den ersten Stunden eine deutliche rote Farbe, der Gewebebrei begann nach 6 Std heller zu werden, und nach 12 Std wurde die Flüssigkeit nicht mehr rötlich. Aber der Milzbrei zeigte immer noch eine deutliche frischrote Farbe, welche, wie das Fluoreszenzmikroskop zeigte, auf den Kongorotgehalt des Amyloid zurückzuführen war. Nun wurde das Material noch histologisch überprüft.

Aus der feinkörnigen, breiigen Masse wurden Quetschpräparate hergestellt und diese mit Hämatoxylin-Eosin, Kongorot und Methylviolett gefärbt, außerdem wurde die Jod- und Jodschwefelsäureprobe angestellt. Im Hämatoxylin-Eosinpräparat fand sich eine stark mit Eosin anfärbbare Masse, in welcher, wahllos zerstreut, reichlich Zellkerne sich befanden, außerdem einige kleine Gefäße und einige Bindegewebsstränge. Die *Jodprobe* ergab eine intensive mahagonibraune Anfärbung, bei der Zugabe von verdünnter Schwefelsäure veränderte sich diese zu dunklem Blau. Mit Methylviolett zeigte sich ein blauer, rötlich untermischter Grundton. Eine leuchtend rote Farbe erhielten wir bei der Kongorotfärbung. Die Fettfärbung ergab, daß noch geringe Mengen feintropfigen Fettes in dem Gewebebrei enthalten waren.

Vor dem Verdauungsversuch wurde der Milzbrei eine Nacht lang in 96%igem Alkohol gelassen, um das Fett, welches sich bei der Färbung mit Scharlachrot gezeigt hatte, herauszulösen. Die Verdauung geschah in einem Gemisch von 0,5 g Pepsinum siccatum und 100 cm³ einer 0,2%igen Salzsäure mit 3 cm³ Tuluol. Die Kontrolle des Pepsin-Salzsäuregemisches mit Fibrinflocken ergab eine völlige Lösung des Fibrins. Temperatur 36° C. Die Pepsinsalzsäure wurde alle 4—5 Std gewechselt, und das Material mit Wasser gewaschen. Die histologische Überprüfung nach 5 Std ließ die Kerne in der Hämatoxylin-Eosinfärbung stark verändert erscheinen, es konnten nur noch Kerntrümmer gefunden werden. Die übrige Substanz färbte sich mit Eosin noch stark an. Bis auf die Metachromasie waren noch alle Reaktionen vorhanden.

Nach 20stündiger Verdauung waren die Kerne fast völlig verschwunden. Die mahagonibraune Anfärbung mit Jod wurde nun nicht mehr gefunden, es kam zu einer strohgelben Farbe, die bei der Zugabe von verdünnter Schwefelsäure verschwand. Nach kurzem Einwirken der

Schwefelsäure erschien das Material ungefärbt. Die Kongorotfärbung führte zu einer unverändert leuchtend roten Farbe.

Nachdem die Pepsinsalzsäure weiterhin regelmäßig gewechselt wurde, untersuchten wir erneut nach 48 Std. Die Substanz war noch völlig unverdaut, es zeigten sich keinerlei Kerne mehr, auch die vor der Verdauung noch vorhandenen kleinen Gefäße waren nun vollständig verschwunden. Alle Reaktionen bis auf die Kongorotprobe waren verschwunden. Ließ man die Verdauung noch weiter einwirken, so blieb das Material unbeeinflußt, es nimmt nicht ab und die histologischen Proben ergeben weiterhin dasselbe Resultat.

Bei der Verdauung verlor also dieses Amyloid zuerst die Fähigkeit, Metachromasie zu geben und dann die Eigenschaft der Jod- und Jod-schwefelsäureprobe.

Zu ähnlichen Ergebnissen kam KRAKOW, der angibt, daß die Jodprobe an dem verdauten Material nicht mehr regelmäßig auftrat. HANSSEN fand, daß bei der Verdauung das Amyloid die Jod- und Jod-schwefelsäureprobe verlor. Die Befunde von KRAKOW und HANSSEN werden von LEUPOLD bestätigt. LEUPOLD gelang es auch, im Filtrat der Pepsinsalzsäure einen Körper zu finden, welcher eine positive Jod-schwefelsäureprobe gab, er versetzte das Filtrat im Überschuß mit Ammoniak und erhielt einen wolkigen Niederschlag, der beim Trocknen ein weißes Pulver ergab mit positiver Jod-schwefelsäureprobe. Eigene Versuche am Filtrat der Pepsinsalzsäure führten zu denselben Ergebnissen.

Mit anderen Versuchsbedingungen gelangten GRIGORJEFF, LITTEN und MORGENTERN zu ähnlichen Ergebnissen. Sie überprüften, ob das Amyloid resorbiert werden kann und implantierten Tieren zu diesem Zwecke Stückchen von amyloiden Organen. Sie kommen übereinstimmend zu dem Ergebnis, daß die Jodprobe und die Fähigkeit, mit Methylviolett eine Metachromasie zu geben, an den implantierten Stückchen schwächer wurden.

Da die oben angeführten Versuche über die Verdaubarkeit des Amyloid alle vor dem Jahre 1922 ausgeführt wurden, konnte das Verhalten des Amyloid gegenüber der in diesem Jahre von BENNHOLD beschriebenen Anfärbbarkeit des Amyloid mit Kongorot nicht berücksichtigt werden. Die Kongorotfärbung kann heute als der Amyloid-nachweis gelten, welcher weitaus am regelmäßigsten auftritt. Es gibt wohl kein Amyloid, welches diese Anfärbbarkeit nicht zeigt. Durch unsere Versuche konnte gezeigt werden, daß das Amyloid auch nach sehr langem Einwirken von Pepsinsalzsäure die Fähigkeit, sich mit Kongorot anzufärben, unverändert beibehält.

Zugleich mit den Verdauungsversuchen wurde ein Teil des gewaschenen und entfetteten Milzbreies in einem Reagensglas mit Wasser der Fäulnis ausgesetzt.

Der Vorgang des Verfaulens lief wesentlich langsamer ab als die Verdauung mit Pepsinsalzsäure. Eine histologische Probe nach 3 Tagen ergab, daß zu diesem Zeitpunkt die Veränderungen an den Kernen erst begannen. Nach 5 Wochen war der Fäulnisvorgang soweit fort-

geschritten, daß im Hämatoxylin-Eosinpräparat keine Kerne mehr zu sehen waren. Im einzelnen waren die Ergebnisse bei der Fäulnis folgende:

Nach 5 Wochen war an dem Material kein übler Geruch mehr wahrzunehmen. Die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin zeigte, daß keine Kerne in dem Material mehr färbbar waren. Die Jodprobe, die Metachromasie und die Anfärbarkeit mit Kongorot waren unverändert erhalten, dagegen zeigte sich bei der Zugabe von verdünnter Schwefelsäure zu dem mit Jod braun gefärbten Material, daß nur ein ganz schwacher, grünlicher Farbton zurückblieb.

So verlor das Amyloid durch Fäulnis nur die Jodschwefelsäureprobe.

Nun wurden 3 g des amyloidhaltigen Milzbreies einer 22 g schweren, gesund erscheinenden Maus verfüttert. Das Tier mußte zuvor 2 Tage hungern. Dann fütterten wir 3 g des amyloidhaltigen Milzbreies. Zunächst wurde dieses Futter verweigert, nach 12 Std jedoch gefressen. Der Kot unterschied sich schon makroskopisch von normalem Mäusekot durch eine leicht rötliche Farbe. Die histologische Kontrolle unter dem Fluoreszenzmikroskop ergab, daß die rote Farbe von dem an dem verfütterten Amyloid hängenden Kongorot herkam. Bei der Kontrolle der Amyloidreaktionen fanden wir keine Jod- und Jodschwefelsäureprobe mehr, ebenso war die Metachromasie nicht mehr vorhanden. Die Anfärbarkeit mit Kongorot zeigte sich aber unverändert stark.

Die Versuche zeigten, daß Amyloid sich der peptischen Verdauung gegenüber resistent erweist, ebenso wird es bei der Passage durch den Magen-Darmkanal einer Maus nicht gespalten und resorbiert. Auch ist es resistent gegen Fäulnis.

Wieweit das Amyloid, trotz des Erhaltenbleibens der Kongorotanfärbarkeit bei der Verdauung, in seinem chemischen Aufbau verändert wird, läßt sich, solange keine genaue chemische Definition dieses Eiweißkörpers möglich ist, nicht sagen. Es scheint jedoch das Erhaltenbleiben der Anfärbarkeit mit Kongorot zu zeigen, daß die chemischen Veränderungen sehr geringe sind. Eine Erscheinung, welche bisher in der deutschen Literatur fast keine Beachtung fand, scheint mir noch mehr dahin zu weisen, daß die Veränderungen am Molekül des Amyloid nicht sehr hochgradig sein können.

ROMHANYI zeigte schon im Jahre 1943, daß Amyloid, welches mit Kongorot gefärbt ist, Doppelbrechung gibt. Denselben Befund beschreibt davon unabhängig LADEWIG im Jahre 1945. Sie kommen beide übereinstimmend zu der Überzeugung, daß die Doppelbrechung des mit Kongorot gefärbten Amyloid durch die Substruktur dieses Eiweißkörpers bedingt ist. Wir untersuchten das der Verdauung ausgesetzte Amyloid ebenfalls im polarisierten Licht, dabei trat unter gekreuzten

Nicols eine sehr deutliche Doppelbrechung auf. Die am verdauten Material erhaltene Doppelbrechung entsprach vollkommen der eines nur mit Kongorot gefärbten Amyloid, ebenso verhielt sich das einer Maus verfütterte und das der Fäulnis ausgesetzte Amyloid.

Die Frage, wieviel von den dem Amyloid nach dem Schaben noch anhängenden Bindegewebsbestandteilen und retikulären Fasern nach der Verdauung noch vorhanden sind, untersuchten wir mit der Fluoreszenz, der van-Gieson-Färbung und der Azanfärbung. Die kollagenen Fasern sind ebenso wie die elastischen und die retikulären Fasern nach HAMPERL durch eine bestimmte bläuliche Eigenfluoreszenz gekennzeichnet. Ebenso erscheinen die Fasern sehr schön bei der von HAITINGER und GEISER angegebenen Fluorochromierung mit Euchrysin und Thiazinrot.

Um gute histologische Schnitte zu erhalten, wurde das verdaute Material in Paraffin eingebettet. Ungefärzte Schnitte zeigten eine gleichmäßig verteilte, fast weiße Eigenfluoreszenz, ein bläulicher Farbton von Fasern trat nirgends auf. HAMPERL schreibt: „Amyloid fluoresciert weder im Gefrier- noch im Paraffinschnitt.“ Diesen Befund können wir nicht bestätigen, da das der Verdauung ausgesetzte und dann in Paraffin eingebettete Amyloid, ebenso wie nichtverdautes Amyloid, eine deutliche Eigenfluoreszenz gab. Auch FAHR sah Eigenfluoreszenz des Amyloid, die er durch Eiseneinlagerung zum Verschwinden brachte. In einem mit Euchrysin-Thiazinrot fluorochromierten Schnitt konnten wir nirgends Fasern finden. Der nach VAN GIESON gefärbte Schnitt zeigte eine gelbliche Farbe, kollagene Fasern konnten wir darin keine finden. Bei der Azanfärbung erschien das der Verdauung ausgesetzte Amyloid in rötlicher Farbe, kollagene Fasern stellten sich ebenfalls keine dar.

Das Verhalten der Jodprobe, der Jodschwefelsäureprobe und der Metachromasie mit Methylviolett, weist nach unserer Ansicht dahin, daß die 3 Amyloidproben von Substanzen abhängen, welche nicht fest am Amyloid verankert sind. Da die Metachromasie während der Verdauung zu einem anderen Zeitpunkt verschwand als die Jod- und die Jodschwefelsäureprobe, so scheint sie von einem anderen Körper abzuhängen als diese. Ein Vergleich des Verhaltens der Jod- und der Jodschwefelsäureprobe bei der Verdauung und der Fäulnis weist wohl dahin, daß auch diese beiden Proben von 2 verschiedenen Gruppen abhängen. Von diesen beiden Gruppen wird die, welche die Jodprobe bedingt, bei der Verdauung und bei der Fäulnis, die aber, welche die Jodschwefelsäureprobe bedingt, nur bei der Verdauung zerstört oder abgelöst.

Die Ergebnisse, welche die Kongorotfärbung und die Doppelbrechung an mit Kongorot gefärbtem Amyloid zeigten, sprechen dafür, daß

Tabelle 1.

Eingriff	Kongorot-färbung	Doppelbrechung	Meta-chromasie	Jodprobe	Jod-schwefelsäureprobe
Nativ	+	+	+	+	+
Verdauung	+	+	—	—	—
Fäulnis	+	+	+	—	+
Darmpassage bei der Maus	+	+	—	—	—

während der peptischen Verdauung die Struktur des Amyloid nicht wesentlich verändert wird.

In einer tabellarischen Übersicht stellen sich diese Ergebnisse folgendermaßen dar (Tabelle 1).

Neben den oben erwähnten Farbreaktionen des Amyloid gilt heute die Anfärbarkeit dieser Substanz mit Kongorot als sicherste Identifizierung. Diese Amyloidnachweise werden nun aber nicht nur bei der allgemeinen Amyloidose angewandt, sondern ebenso für das tumorförmige Amyloid, das Paramyloid und können auch von den Corpora amylacea gegeben werden. Immer ist hierbei die Anfärbarkeit mit Kongorot am regelhaftesten. Die Jodprobe, die Jodschwefelsäureprobe und die Metachromasie mit Anilinfarbstoffen können in jedem der oben erwähnten Fälle wechselweise fehlen, wie sie alle vorhanden sein können. Die Unregelmäßigkeit im Auftreten der Jodprobe, der Jodschwefelsäureprobe und der Metachromasie nimmt die Möglichkeit, mit Hilfe dieser Amyloidnachweise verschiedene Amyloide voneinander zu unterscheiden; es erscheinen daher von dieser Seite gesehen sowohl das bei der allgemeinen Amyloidose auftretende, wie das tumorförmige Amyloid, das Paramyloid und die Corpora amylacea identisch.

Tabelle 2.

	v. BONSDORFF	NEUBERG	EPPINGER
Lysin	2,2 %	11,6 %	4,3 %
Arginin	5,9 %	13,9 %	14,6 %
Histidin	2,3 %	0	0

Betrachtet man aber die Ergebnisse, welche durch chemische Aufarbeitung der Amyloidsubstanz bis jetzt gewonnen wurden, so zeigt sich eine ziemliche Uneinheitlichkeit in den gefundenen Werten. Vergleichswerte lassen sich am ehesten aus den Arbeiten von v. BONSDORFF, NEUBERG und EPPINGER finden; sie stellten alle 3 den prozentualen Gehalt von Lysin, Arginin und Histidin im Amyloid fest. Die chemischen Untersuchungen, welche v. BONSDORFF veröffentlichte, wurden an einem tumorförmigen Amyloid (Prof. Dr. E. ABDERHALDEN) ange stellt, EPPINGER benutzte zu seinen Untersuchungen ebenfalls ein

tumorförmiges Amyloid, dagegen handelte es sich bei NEUBERG um das Amyloid einer allgemeinen Amyloidose.

Zu diesen Ergebnissen kommen noch die von MAYER-OBIDITSCH gefundenen Werte. Sie untersuchten eine „tumorförmige Paramyloidose der Haut“ und fanden dabei im Herzen, in welchem Amyloid vorhanden war, eine Erhöhung des Histidins und des Tyrosins, in der amyloidhaltigen Milz dagegen niedrige Histidinwerte und einen hohen Tyrosingehalt.

In jüngster Zeit befaßten sich HASS und seine Mitarbeiter in Amerika wieder mit den chemischen Verhältnissen am Amyloid. Sie stellten Untersuchungen an über die Löslichkeit des Amyloid bei verschiedenem p_H . Als Puffer benützten sie hierzu einen Phosphatpuffer, welcher bis p_H 12 eingestellt werden konnte. HASS fand Löslichkeit von jedem Amyloid im Bereich zwischen p_H 11 und 12, aber die Löslichkeit der verschiedenen Amyloide in diesem p_H -Bereich war unterschiedlich. Zum Beispiel war das Amyloid, welches bei einem Fall von Plasmocytom auftrat, erst bei p_H 12 löslich, dagegen konnte bei dem Amyloid eines Pferdes die Lösung schon bei p_H 11,6 erreicht werden. Ausschlaggebend für die Löslichkeit des Amyloid in diesen Versuchen waren die Tierart und der Grund, welcher zur Amyloidose führte. So zeigte Amyloid von Pferden, welche mit Tetanustoxin behandelt wurden, immer die gleiche Löslichkeit.

Die Verschiedenheit der einzelnen Amyloide spricht sich nicht nur durch die chemischen Untersuchungen aus, es bestehen auch im biologischen Verhalten Unterschiede: Die Unterschiedlichkeit der Ablagerungsorte, etwa der Corpora amylacea und des Amyloid bei einer allgemeinen Amyloidose, ferner des knotigen Amyloid und des Amyloid bei der Paramyloidose. Zwischen dem tumorförmigen Amyloid und dem allgemeinen Amyloid scheinen aber auch in der biologischen Wertigkeit Unterschiede zu bestehen. APITZ schreibt: „Die knotige Ablagerung und die riesenzellige Resorption sind gewöhnliche Ereignisse bei Paramyloidose, fehlen, oder sind zum mindesten äußerst selten bei echtem Amyloid.“ Zu dieser eben angeführten Anschauung bekennt sich auch BRASS.

Die oben gezeigte Verschiedenheit der einzelnen Amyloide führt zu dem Schluß, daß Amyloid nach unseren heutigen Kenntnissen eher ein pathologisch-anatomischer und histologischer Begriff ist als ein chemischer.

Dazu scheint ferner festzustehen, daß, wie LEUPOLD es ausdrückt, die Jodprobe, die Jodschwefelsäureprobe und die Metachromasie von verschiedenen, dem Protein des Amyloid nicht zugehörigen Gruppen getragen wird. Diese Überlegungen führen zu dem Schluß, daß die Substanzen, welche die Jodprobe und Jodschwefelsäureprobe bedingen, von außen an das Amyloid herankommen und nicht eigentliche Bestandteile des Amyloid selbst sind.

Aber es tritt nun die Frage auf, woher die Stoffe stammen, welche die Jod- und die Jodschwefelsäureprobe bedingen. Ein Weg sie zu suchen, schien sich durch die Verdauungsversuche zu zeigen. Das

durch die peptische Verdauung erhaltene Amyloid gab außer der Anfärbarkeit mit Kongorot keinen der üblichen Amyloidnachweise mehr, es entsprach also wohl dem, was KLEBS als achromatisches Amyloid bezeichnet. Stimmten die Ergebnisse, daß die Jod- und Jodschwefelsäureprobe von den dem Amyloidprotein angehängten Gruppen bewirkt werden, so stand die Möglichkeit offen, daß diese Stoffe, welche durch die Verdauung dem Amyloid verlorengingen, demselben Amyloid wiedergegeben werden könnten.

Die BENNHOLDSche Kongorotprobe führt zu dem Schluß, daß das in die Blutbahn injizierte Kongorot vom Amyloid aufgenommen wird. Der Farbstoff läßt sich, wie FAHR zeigt, im Amyloid mit dem Fluoreszenzmikroskop, selbst wenn er Wochen vor dem Tode gegeben wurde, nachweisen. Dabei zeigen nicht nur die der Blutbahn am nächsten gelegenen Teile des Amyloid eine Rotfluoreszenz, sondern das gesamte abgelagerte Amyloid leuchtet rot auf. Demnach muß das Amyloid *in vivo* von Bestandteilen des Plasma durchströmt werden. Auf eine Durchströmbarkeit des Amyloid weist auch die Tatsache hin, daß in der Klinik, selbst bei starkem Befallensein der Leber mit Amyloid, keine ausgesprochene Leberinsuffizienz eintritt. Die Ernährung der Leberzelle scheint also trotz einer Amyloidose noch ganz gut möglich zu sein. In der Niere ist eine Harnbereitung bei glomerulärem Amyloid ebenfalls nur denkbar, wenn das Amyloid durchströmbar ist. Weiter zeigen Verkalkungsherde, welche in Amyloidtumoren gefunden werden können, daß das Amyloid ein Körper ist, in welchem Bestandteile aus der Blutbahn eindringen können. Wie sich das Kongorot in das Amyloid einlagert, läßt sich mit endgültiger Sicherheit noch nicht sagen. Von den älteren Untersuchern wird angenommen, daß es sich bei der histologischen Färbung des Amyloid mit Kongorot um eine Adsorption dieses Farbstoffes handelt (BENNHOLD, KOCH, LEUPOLD, HERZENBERG). Die Doppelbrechung an mit Kongorot gefärbtem Amyloid läßt schließen, daß diese Adsorption zu einer gerichteten Einlagerung des Farbstoffes führt (ROMHANYI), weiter kann durch sie gezeigt werden, daß Kongorot, welches *in vivo* gegeben wurde, auf die gleiche Art in das Amyloid eingelagert wird wie bei der histologischen Färbung.

Die Vorstellung über die Durchströmbarkeit des Amyloid, und die Annahme der Adsorption des Kongorot führen nun zu dem Schluß, daß die Substanzen, welche die Jod- und Jodschwefelsäureprobe bedingen, ebenfalls von der Blutbahn aus in das Amyloid aufgenommen werden können. Nach dem oben Gesagten müßte es also möglich sein, achromatisches Amyloid durch Behandlung mit Blut in ein solches zu verwandeln, welches die Jod- und die Jodschwefelsäureprobe gibt. Von diesen Gedankengängen ausgehend stellten wir Versuche an, welche dies erproben sollten.

Wir verwandten Amyloid, welches durch peptische Verdauung die Jodprobe und die Jodschwefelsäureprobe verloren hatte. Dieses Amyloid verbrachten wir in Serum gesunder Menschen. Eine Änderung bzw. ein Wiedererscheinen der Jod- und Jodschwefelsäurereaktion fand aber *nicht* statt. Auch Serum von Amyloidkranken blieb ohne Wirkung.

Erst als wir dazu übergingen, Plasma statt Serum zu benützen, gelang es, an Amyloid, das keine Jodprobe und keine Jodschwefelsäureprobe mehr gab, diese beiden Reaktionen wieder zu erhalten.

In der Zwischenzeit bekamen wir eine Amyloidmilz, welche von vornherein *keine* Jod- oder Jodschwefelsäureprobe gab. Aus dieser Milz (Sektionsprotokoll Nr. A 38/48) wurde durch Schaben, aber *ohne* Verdauung ein Amyloideiweißpräparat hergestellt (Amyloid II), das nun zu weiteren Versuchen gut geeignet war.

Folgende Methodik wurde angewandt: Zu 20 cm^3 Blut¹ kommen 2 cm^3 7%iges Natriumeitrat. Nach 24ständigem Stehen wird pipettiert und das überstehende Plasma in einem Reagensglas mit etwa 0,1 g Amyloid vermischt. Die Jod- und die Jodschwefelsäureprobe wird dann nach 3 Tagen an dem im Plasma verbliebenen Amyloid angestellt. Die Versuche verliefen im einzelnen wie folgt:

1. Plasma von einem Amyloidkranken mit Tuberkulose. Kongorotschwund 82 %. Amyloid I (Verdauungsamyloid) verblieb 3 Tage in diesem Plasma und zeigt bei der Jodprobe eine deutliche Braunfärbung, bei der Jodschwefelsäureprobe wird der Farbton blaugrünlich. Amyloid II gibt mit diesem Plasma ebenfalls eine deutliche Braunfärbung bei der Jodprobe und zeigt bei der Jodschwefelsäureprobe denselben Farbton wie Amyloid I.

2. Plasma einer lobären Pneumonie am 5. Krankheitstag. Amyloid I verblieb 3 Tage in diesem Plasma und zeigt eine deutliche Jodprobe, jedoch keine Jodschwefelsäureprobe. Amyloid II verhielt sich auch hier wie Amyloid I.

3. Plasma eines Gesunden. Amyloid I verbleibt 3 Tage in diesem Plasma und zeigt weder eine Jod- noch eine Jodschwefelsäureprobe.

Tabelle 3 gibt Auskunft über alle Versuche dieser Art.

Diese Befunde lassen sich wohl nicht anders erklären, als daß Amyloid aus dem Plasma Stoffe aufnehmen kann, welche ihm die Fähigkeit verleihen, positive Jod- bzw. Jodschwefelsäureprobe zu geben. Hinweise, daß diese jod- und jodschwefelsäurepositiven Substanzen nicht nur bei manifester Amyloidose vorhanden sein können, scheinen die Versuche 3, 4 und 5 zu geben, außerdem auch das Auftreten einer positiven Jodprobe bei einer lobären Pneumonie. Einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Substanzen, welche die Jod- und Jodschwefelsäureprobe geben und bestimmten Vorgängen im Körper konnten wir bis jetzt nicht finden. Die positive Jodprobe bei einer Lobärpneumonie scheint zu zeigen, daß das Vorhandensein einer Infektion eine Rolle spielt. W. SCHMIDT glaubt, daß diese Substanzen, welche die Reaktionen des Amyloid bedingen, schon im normalen Organismus vorhanden sind.

¹ Das Plasma der Amyloidkranken verdanken wir dem freundlichen Entgegenkommen von Prof. DEIST, von dessen Abteilungen in den Zentralkliniken Göppingen.

Tabelle 3.

Nr.	Material	Jodprobe vor Verdauung	Jodschwefelsäureprobe vor Verdauung	Klinische Diagnose	Kongorotprobe %	Jodprobe nach Plasma-behandlung	Jodschwefelsäureprobe nach Plasma-behandlung
1	Amyloid I	+++	+++	Amyloidose bei Tbc.	82	+	+
	Amyloid II	—	—			+	+
2	Amyloid I	+++	+++	Amyloidose bei Tbc.	92	+	+
	Amyloid II	—	—			+	+
3	Amyloid I	+++	+++	Tbc.	65	+	—
	Amyloid II	—	—			+	—
4	Amyloid I	+++	+++	Tbc.	63	+	+
	Amyloid II	—	—			+	+
5	Amyloid I	+++	+++	Tbc.	68	+	—
	Amyloid II	—	—			+	—
6	Amyloid I	+++	+++	lobäre Pneumonie	—	+	—
	Amyloid II	—	—			+	—
7	Amyloid I	+++	+++	—	—	—	—
	Amyloid II	—	—			—	—
8	Amyloid I	+++	+++	—	—	—	—
	Amyloid II	—	—			—	—
9	Amyloid I	+++	+++	—	—	—	—
	Amyloid II	—	—			—	—
10	Amyloid I	+++	+++	—	—	—	—
	Amyloid II	—	—			—	—
11	Amyloid I	+++	+++	—	—	—	—
	Amyloid II	—	—			—	—
12	Amyloid I	+++	+++	7% Na-Citrat	—	—	—
	Amyloid II	—	—			—	—

Der Nachweis der fraglichen Stoffe unmittelbar im Plasma gelang vorerst nicht. Die Plasmen wurden im Wasserbad coaguliert und anschließend mit dem Gefriermikrotom geschnitten. An den so erhaltenen Gefrierschnitten wurde die Jod- und die Jodschwefelsäureprobe angestellt, es gelang jedoch nie, positive Jod- oder Jodschwefelsäureproben zu erhalten. Den negativen Befunden, welche wir hier erhielten, liegen vielleicht ähnliche Verhältnisse zugrunde, wie ich sie bei Untersuchungen über die Anfärbbarkeit des Amyloid mit sehr verdünntem Kongorot fand. Läßt man einen histologischen Schnitt 24 Std in einer Kongorotlösung von 1 : 500 000, so färbt sich dieser schon makroskopisch erkennbar rot an, obwohl die Kongorotlösung selbst in einer Schichtdicke von 1 cm nicht rot erscheint. Es wäre demnach also denkbar, daß die Verdünnung der jod- und jodschwefelsäurepositiven Substanzen im Plasma so stark ist, daß diese Stoffe mit Hilfe einer direkt am Plasma angestellten Jod- oder Jodschwefelsäureprobe nicht nachgewiesen werden können.

Den Aussagen von M. B. SCHMIDT und HÜBSCHMANN, nach denen das Amyloid erst bei längerem Bestehen eine Jod- und Jodschwefelsäureprobe gibt, läßt sich nach unseren Befunden zwanglos eine Erklärung geben. Bei längerem Vorhandensein des Amyloid im Körper, wächst die Wahrscheinlichkeit, daß die jod- und jodschwefelsäure-positiven Stoffe auftreten und in das Amyloid bzw. den Amyloidtumor oder die Corpora amylacea eingelagert werden.

Die verschiedenen Farbwerte, welche man bei der Jodschwefelsäureprobe erhalten kann und welche nach LEUPOLD von dem verschiedenen Oxydationsgrad der diese Reaktion bedingenden Substanzen abhängen, scheinen nach meinen Befunden erst aufzutreten, wenn die Substanz schon in das Amyloid eingelagert ist. Ich erhielt nämlich jeweils einen blaugrünen Farbton an dem Amyloid, welches die Jodschwefelsäureprobe durch die Plasmabehandlung erneut gab.

Zusammenfassung.

1. Das Amyloid der allgemeinen Amyloidose ist gegenüber der peptischen Verdauung, gegenüber der Fäulnis und gegenüber den Verdauungseinflüssen im Magen-Darmkanal einer Maus resistent.
2. Die Metachromasie mit Methylviolett, die Jodprobe und die Jodschwefelsäureprobe verschwinden bei der peptischen Verdauung und bei der Verdauung durch eine Maus, während bei der Fäulnis nur die Jodschwefelsäureprobe verschwindet.
3. Die Metachromasie, die Jodprobe und die Jodschwefelsäureprobe hängen von 3 verschiedenen, dem Amyloid nicht fest anhängenden Gruppen ab.
4. Die Anfärbbarkeit des Amyloid mit Kongorot und die Eigenschaft, mit Kongorot gefärbt Doppelbrechung zu geben, bleiben bei der peptischen Verdauung, der Verdauung durch eine Maus und bei der Fäulnis erhalten.
5. Stoffe, welche die Jodprobe und die Jodschwefelsäureprobe geben, konnten im Blutplasma gefunden werden.
6. In vitro konnte gezeigt werden, daß Amyloid diese Stoffe aufnehmen kann und dann, ohne vorher eine Jodprobe oder eine Jodschwefelprobe gegeben zu haben, diese Reaktionen zeigt.
7. Eine genaue Aussage darüber, unter welchen Bedingungen diese die Jod- und Jodschwefelsäurereaktion bedingenden Stoffe im Blut auftreten, kann noch nicht gemacht werden. Im Plasma von gesunden Menschen konnten sie nicht nachgewiesen werden.

Literatur.

ÄPITZ: Virchows Arch. **306** (1941). — BENNHOLD: Münch. med. Wschr. **1922**. — BONSDORFF, v.: Arb. path. Inst. Univ. Helsingfors (Jena) **7** (1933). — BRASS:

Frankf. Z. Path. **58** (1943). — DAVIDSOHN: Münch. med. Wschr. **1905**. — EPPINGER: Biochem. Z. **127** (1922). — FAHR: Dienstbesprechung der Deutschen Pathologen. Breslau 1944. — FRIEDREICH u. KÉKULÉ: Virchows Arch. **16** (1859). — GRIGORJEFF: Beitr. path. Anat. **18** (1895). — HAITINGER u. GEISER: Virchows Arch. **312** (1944). — HAMPERL: Virchows Arch. **292** (1934). — HANSEN: Biochem. Z. **13** (1908). — HASS: Arch. of Path. **33** (1943). — HERZENBERG: Virchows Arch. **253** (1924). — HÜBSCHMANN: Virchows Arch. **279** (1929). — KOCH: Münch. med. Wschr. **1937**. — KRAWKOW: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **40** (1897). — KÜHNE u. RUDNEFF: Virchows Arch. **33** (1865). — LADEWIG: Nature (Lond.) **156** (1945). — LEUPOLD: Beitr. path. Anat. **64** (1918). — LITTEK: Berl. med. Wschr. **1887**. — MAYEDA: Z. physiol. Chem. **58** (1909). — MAYER-OBIDITSCH: Frankf. Z. Path. **54** (1940). — MORGENSTERN: Virchows Arch. **259** (1920). — NEUBERG: Verh. dtsch. path. Ges., 7. Tagg **1904**. — ROMHANYI: Zbl. Path. **80** (1943). — SCHMIDT, M. B.: Verh. dtsch. path. Ges. 7. Tagg **1904**. — SCHMIDT, W.: Virchows Arch. **260** (1926). — SCHMIEDEBERG: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **87** (1920). — TSCHERMAK: Z. Physiol. Chem. **20** (1895).

2. Über das „grüne“ und das „braune“ Amyloid HAITINGERS bei der Fluorochromierung mit Euchrysin und Thiazinrot.

Nach den Beobachtungen von HAITINGER und GEISER gibt die Amyloidsubstanz mit Euchrysin und Thiazinrot im Fluoreszenzlicht 2 verschiedene Resultate. Sie schließen daraus auf das Vorkommen zweier verschiedener Amyloidarten. Die eine dieser beiden gibt eine braune Fluoreszenz, ähnlich derjenigen, welche das in den Gefäßen liegende Blutplasma im histologischen Präparat zeigt. Die andere zeigt grüne Fluoreszenz. Da „grünes Amyloid“ manchmal von einem braunen Amyloidsaum umgeben war und weil ferner experimentelles Mäuseamyloid nie Grünfluoreszenz ergab, kommen sie zu dem Schluß, daß es sich bei dem braun fluoreszierenden Amyloid um ein „junges, dem Serum ähnliches Amyloid“ handelt. Grünfluoreszierendes soll dagegen älteres Amyloid sein, welches durch physikalisch chemische Umwandlungen im Laufe der Zeit aus dem braun fluoreszierenden entstanden ist.

Eigene Versuche mit der genannten Methodik führten zunächst zu ähnlichen Ergebnissen. Fixierung und Färbung wurde in der angegebenen Weise streng befolgt. Die Farbwerte entsprachen vollkommen den dort angegebenen. In Amyloidorganen von Mäusen mit experimentell erzeugtem Amyloid fand sich die braune Fluoreszenz des Amyloid. Jedoch gelang es nicht, bei länger lebenden Tieren aus dem gleichen Experiment, also mit annehmbar älterem Amyloid, eine grüne Fluoreszenz zu erzeugen.

Grünfluoreszenz am Amyloid sahen wir erstmals in einer Sagomilz bei allgemeiner menschlicher Amyloidose. Die äußeren Bezirke der Sagokörnchen zeigten eine braune Fluoreszenz, während das Zentrum grün erschien. Hier traf also die HAITINGERSche Beobachtung zu. Der gleiche Fall brachte uns aber wie durch Zufall der Aufklärung dieser

eigentümlichen Divergenz der Färbeeffekte näher. Wir untersuchten ein Stückchen Leber des gleichen Falles, welches, anstatt vorschriftsgemäß mit Carnoylösung, nur in Alkohol fixiert war. An diesen Schnitten erschien das Amyloid nur in einem schmalen Saum am *Rande der Präparate braun*. Alles andere Amyloid erschien dagegen grün und ließ sich kaum vom Protoplasma der Leberzellen differenzieren.

Weitere Untersuchungen an Material, das in Carnoy fixiert war, zeigten nun, daß auch hier unter Umständen Grünfluorescenz des Amyloid auftreten kann. Nimmt man nämlich Organstückchen von etwa 3—4 mm Dicke aus Carnoyfixierung, so färbt sich das Amyloid in den ersten Schnitten über den *ganzen Schnitt* hin braun. Es zeigt sich aber bald, daß um so mehr grünfluorescierendes Amyloid, vorwiegend in den mittleren Teilen des Schnittes, auftritt, je tiefer man schneidet. Die aus der Mitte des Blockes entnommenen Schnitte zeigen dann deutlich, daß nur das Amyloid der Außenzonen sich braun färbt, wogegen das im Zentrum gelegene grün fluorescirt.

Da frische Amyloidfälle selten sind, suchten wir nach einem Eiweißkörper, der sich bei Fluorochromierung verhält wie Amyloid. Es erwiesen sich Speckhautgerinnse aus dem Herzen und den großen Gefäßen als gut geeignet. Solche finden sich bei der gewöhnlichen Rückenlage einer Leiche im rechten Herzohr, in der rechten Kammer, in der Pulmonalis und in hochliegenden Teilen der Aorta. An die Speckhautgerinnse anschließend findet sich nach unten Cruor. Diese Schichtung folgt also dem physikalischen Gesetze der Schwere. Ein histologischer longitudinal gelegter Schnitt durch ein Speckhautgerinnse zeigt, daß zwischen der Speckhaut und dem Cruor eine Schicht liegt, in welcher sich die Leukocyten abgesetzt haben. Die Verhältnisse liegen also ähnlich, wie bei der in der Klinik geübten Blutsenkungsprobe: Oben findet man Blutplasma, dann, am besten darstellbar bei Leukämien, die leukocytenhaltige Schicht, unten dann die Erythrocyten. Eigentümlich glasiges Aussehen kennzeichnet schon für das bloße Auge die leukocytenhaltige Schicht. In solchen nach HATTINGER und GEISER gefärbten Gerinnseñ zeigt sich gerade in der leukocytenhaltigen Schicht braune Fluorescenz wie am Amyloid.

Fixiert man verschieden in Alkohol und Carnoy, so zeigen sich die leukocytenhaltigen Teile der Gerinnse, wie Amyloid, mit Carnoy braun, in Alkohol dagegen grün. Es schien also deutlich zu werden, daß die geschilderte Divergenz zwischen braun und grün nicht vom Alter der Amyloidsubstanz abhängig sein konnte.

Um nun festzustellen, welche Faktoren von Bedeutung sein konnten, fixierten wir Speckhautgerinnse in gepuffertem 4%igem Formalin. Zur Pufferung wurde Veronal- und Phosphatpuffer angewandt. Das Ergebnis war für beide Pufferlösungen das gleiche. Im sauren Milieu fixierte Gerinnse zeigten in der Leukocytenzone braune Fluorescenz,

die Grenze liegt bei p_H 4,5. Unterhalb davon kommt es zur Braunkärbung, oberhalb von p_H 4,5 wird die leukocytenhaltige Zone grün.

ZEIGER hat den Einfluß verschiedener Fixierungsmittel auf die Gewebe untersucht. Er stellte fest, daß Essigsäure den isoelektrischen Punkt nach der basischen Seite verschiebt. Die Tatsache, daß Amyloid sich bei der Fixierung mit essigsäurehaltiger CARNOYScher Flüssigkeit anders anfärbte als bei Alkoholfixierung, sowie das Verhalten der Speckhautgerinnung nach der Fixierung in gepufferten Lösungen ließ daran denken, daß die Verschiebung des isoelektrischen Punktes auch der auslösende Faktor für die verschiedene Färbung der Amyloidsubstanz sei. Aber bei Färbeversuchen mit gepufferten Farblösungen zeigte sich, daß sowohl Euchrysin wie Thiazinrot in ihrer Färbequalität unabhängig vom isoelektrischen Punkt sind. Amyloid, das sich mit der HAITINGER-GEISERfärbung braun färbt, bleibt im ganzen p_H -Bereich zwischen 4,0 und 8,0 unverändert.

Fluorochromierungsfarbstoffe wirken nun bekanntlich nicht durch Absorption bestimmter Wellenlängen farbig, sondern als fluoreszierende Substanzen senden sie bestimmte Wellenlängen aus. Es erscheint klar, daß gewöhnliche Farbstoffe ihre Farbwirkung nur zeigen können, wenn sie in einer gewissen Menge vorhanden sind, welche durch die Dicke des zu färbenden Schnittes und die Konzentration des Farbstoffes bestimmt wird. Die Fluorochrome dagegen senden die ihrer Fluoreszenzfarbe entsprechenden Wellenlängen aus, sobald sie von ultraviolettem Licht angestrahlt werden, bzw. wandeln sie das ultraviolette Licht in die entsprechenden Wellenlängen um.

Zur Klärung der Verhältnisse haben wir nun folgenden Versuch gemacht. Ein Gewebsschnitt, welcher bei Anwendung der kombinierten Euchrysin-Thiazinrotfärbung braunes Amyloid ergab, wurde mit Euchrysin allein gefärbt. Jetzt färbt sich die Amyloidsubstanz grün. Die braune Farbe konnte also nur durch das Hinzutreten von Thiazinrot entstehen, in wässriger Lösung gibt aber Thiazinrot eine bläuliche Fluoreszenz, womit die braune Fluoreszenz des Amyloid allein nicht erklärt werden kann. Bringt man das Thiazinrot in bestimmten Verdünnungen zu Blutserum, so wird seine Fluoreszenz rötlich, wie dies von HAITINGER und GEISER beschrieben ist. Mit der Rotfluoreszenz läßt sich nun auch die braune Fluoreszenz des Amyloid, nämlich als eine Mischung von grün und rot, verstehen. Demnach ist also „grünes Amyloid“ nur von Euchrysin gefärbt, während „braunes Amyloid“ auch Thiazinrot enthält. Es gelingt auch an mit Thiazinrot rötlich fluoreszierendem Serum durch Zugabe von Euchrysin einen braunen Farbton im ultravioletten Licht hervorzurufen.

Indem wir den Färbevorgang in den einzelnen Phasen der Färbung untersuchten, konnten wir feststellen, daß Thiazinrot in „grünes Amyloid“ nicht eindringt.

Dies bedeutet, daß nicht chemische, sondern physikalische Veränderungen der Amyloidsubstanz dafür verantwortlich zu machen sind. Wenn wir vorhin gewisse Abhängigkeiten des Färbungseffektes von der angewandten Fixierungsflüssigkeit feststellen konnten, so fand ZIRKLE, daß zwischen dem Fixationsergebnis und der aktuellen Acidität enge Beziehungen bestehen.

Für die zweierlei Anfärbungen des Amyloid im Verfahren von HAITINGER-GEISER habe ich mir als Grund folgende Vorstellung gebildet: Das CARNOYSche Gemisch dringt nach meinen Erfahrungen in 4 Std etwa 3 mm tief in ein zu fixierendes Gewebe ein. Im allgemeinen werden aber Organstückchen nur bis zu 1 Std in der CARNOYSchen Flüssigkeit gelassen, um dann für 48 Std in Alkohol eingelegt zu werden. Meine Befunde an einem stufenweise geschnittenen Block zeigten, daß gerade in den Randpartien das Amyloid braun aufleuchtet, also in Gebieten, in denen das Gewebe sicher von CARNOYScher Flüssigkeit und nicht von Alkohol fixiert wurde. Nach den Befunden von SEKI spaltet Essigsäure in wäßrigen Geweben H-Ionen ab. Sowohl bei in Carnoy fixiertem Amyloid, als auch bei in gepufferten Formalinlösungen fixierten Speckhautgerinnseln, konnte bei Anwesenheit freier H-Ionen nie eine Braunfluorescenz gesehen werden; d. h. also, die Anwesenheit von freien H-Ionen während der Fixierung kann die Braunfärbung des Amyloid bewirken, oder anders ausgedrückt, läßt Thiazinrot in das Amyloid eintreten, während Abwesenheit freier H-Ionen dies verhindert. Ob dabei Milieuänderung oder physikalisch-chemische Strukturwandlung des Amyloideiweißes das Ausschlaggebende sind, soll vorerst nicht entschieden werden.

Bei der Beurteilung des Verhaltens des Amyloid der Euchrysin-Thiazinrotfärbung gegenüber, muß man nach diesen Befunden darauf achten, daß das ganze zur Untersuchung kommende Organstückchen einwandfrei von CARNOYScher Flüssigkeit fixiert ist. Hier ist um so mehr Vorsicht am Platze, als die CARNOYSche Flüssigkeit, frisch angesetzt, ein p_H von 4,5 hat. Sobald aber Gewebsstückchen darin fixiert werden, wandert das p_H nach der alkalischen Seite. ZIRKLE macht darauf aufmerksam, daß das p_H der Fixierungsflüssigkeiten im Laufe der Fixierung durch chemische Umsetzung ihrer Komponenten, sowie durch den Einfluß des Präparates, stark verändert wird.

Die genaue Durchmusterung von Schnitten, welche von Organen stammten, die sorgfältig in CARNOYScher Flüssigkeit fixiert wurden, zeigte nun weiterhin, daß an einigen Stellen immer noch grünes Amyloid auftrat. Da bei Serienschnitten das grün fluorescierende Amyloid sich nicht auf einen bestimmten Bezirk lokalisieren ließ, kam als Grund hierfür nur eine Einwirkung nach der Fixierung in Frage.

Von dieser Beobachtung abgesehen, machten wir im Verlaufe unserer Untersuchungen noch eine andere nicht unwichtige Feststellung.

Nachdem die Schnitte gefärbt sind, werden sie mit hartem Filterpapier abgetrocknet und mit flüssigem Paraffin eingedeckt. Trocknet man vor dem Eindecken die eine Hälfte eines Schnittes vollkommen aus, die andere dagegen nur in dem Maße wie Gefrierschnitte getrocknet werden, bevor sie beim Aufziehen mit Celloidin in 100%igen Alkohol gebracht werden, so fluoresciert das Amyloid des vollkommen ausgetrockneten Teiles grün, das übrige braun. Der Grund dieser Grünfluorescenz ist wohl das Fehlen des Lösungsmittels für Thiazinrot, welches als Substanz nur geringe Fluorescenz gibt.

Wir sahen nach Beachtung dieser Vorsichtsmaßregeln bei 4 menschlichen Amyloidosen, einer Pferdeamyloidose und 38 experimentellen Mäuseamyloidosen nie grünes Amyloid und möchten daher zur größten Vorsicht mahnen bei der Feststellung von zweierlei Amyloiden mit der von HAITINGER-GEISER angegebenen Färbung.

Eine Amyloidose beim Menschen zeigte darüber hinaus noch andere Befunde. Hier konnten wir selbst nach genauerer Fixierung in CARNOVYSCHER Lösung keine Braunfluorescenz des Amyloid erreichen, das Amyloid nahm einen bläulichbraunen Farbton an. Die Erklärung dieses Verhaltens brachte die Eisenfärbung, welche zeigte, daß das in den Organen abgelagerte Amyloid eisenhaltig war. FAHR weist darauf hin, daß Eisen die Fluorescenz löschen kann. Dieser Befund FAHRS konnte dadurch bestätigt werden, daß das Amyloid nach Enteisenung der Schnitte in n/10 Salzsäure die gewohnte braune Farbe zeigte.

Zusammenfassung.

1. Die gleiche Amyloidsubstanz kann, durch verschiedene Fixierung bedingt, bei der von HAITINGER und GEISER angegebenen Fluorochromierung mit Euchrysin und Thiazinrot verschiedene Fluorescenzerscheinungen geben. Die Divergenz der Färbung hängt also nicht mit dem Alter des Amyloid zusammen.

2. Ein Grund für die verschiedene Anfärbbarkeit des Amyloid liegt in der Anwesenheit einer genügenden Menge freier H-Jonen in der Fixierungsflüssigkeit, wodurch „braunes“ Amyloid erzeugt wird.

3. In das Amyloid eingelagertes Eisen stört die Fluorescenz des Amyloid bei dieser Fluorochromierung.

4. Völlige Abtrocknung der Schnitte läßt Thiazinrot, welches nur in gelöstem Zustand fluoresciert, nicht aufleuchten, und es bleibt dann die braune Fluorescenz am Schnitt aus.

Literatur.

HAITINGER u. GEISER: Virchows Arch. **312** (1944). — HASS and SCHULZ: Arch. of Path. **33** (1943). — SEKI: Z. Zellforschg **26** (1936). — ZIRKLE: Protoplasma (Berl.) **4** (1927).

Dr. HANS-PETER MISSMAHL, Patholog. Institut der Universität Tübingen.