

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. med. F. FEYRTER).

Zum Nachweis der alkalischen und sauren Phosphatase in der Leber am nativen Gefrierschnitt.

Von

W. EGER und H. F. GELLER.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 30. April 1952.)

Bei menschlichen und experimentellen Untersuchungen an Lebern hatten sich Unterschiede im Verhalten des Läppchenzentrums und der Peripherie ergeben. Diese als funktionelle Aktivitätsunterschiede im zentralen und peripheren Funktionsfeld des Leberläppchens gedeuteten Veränderungen mußten nach unseren Vorstellungen mit den in diesen Arealen verankerten Fermenten im engen Zusammenhang stehen. Es war daher naheliegend, den histochemischen Fermentnachweis nach der Methode von GÖMÖRI¹ für diese Frage heranzuziehen.

Es gibt in der amerikanischen und englischen Literatur eine Reihe Arbeiten²⁻⁶, die sich mit dem Nachweis der Phosphatase in der Leber beschäftigen. In der Hauptsache wird das Vorkommen der alkalischen Phosphatase in Organen und Geweben beschrieben. Die Angaben darüber sind recht einheitlich. Doch findet man einzelne Bemerkungen und Beschreibungen, die vermuten lassen, daß beim Nachweis dieser Phosphatase, der relativ einfach zu sein scheint, auch Kunstprodukte vorkommen, die die Beurteilung der Ergebnisse erschweren und unsicher machen. So gibt JAKOBY⁶ an, daß in der Peripherie des Schnittes von eingebettetem Material die Reaktion stärker ausfiele.

Die Beschäftigung mit der sauren Phosphatase ist dagegen viel seltener, die Angaben über ihr Vorkommen und ihre Verteilung unsicher^{9, 10}. Sie scheint demnach für ihre Darstellung erhebliche technische Schwierigkeiten zu bieten und empfindlicher zu sein.

Für unsere Stoffwechselversuche, die wir laufend an der Leber durchführten, war es Voraussetzung, zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, um überhaupt Aussagen machen zu können. Dazu erschien es uns vor allen Dingen notwendig, in der Vorbehandlung des Untersuchungsmaterials jede Einwirkung auszuschalten, die dem Ferment schaden konnte. Unseres Erachtens mußte vor allem die Vorbehandlung des Materials durch Fixierungsmittel und durch Einbettung umgangen werden.

Nach DANIELLI¹⁰ ergeben sich durch verschiedene Fixationsmethoden Intensitätsunterschiede, aber keine Abweichungen der Lokalisation. MAYNO und

ROUILLER⁹ erwähnen, daß sie bei Vergleich von in Alkohol fixierten und unfixierten Gefrierschnitten keine Unterschiede im Phosphatasebild der Niere sahen. Nach Paraffineinbettung soll für die alkalische Phosphatase ein Aktivitätsverlust von 70—80% und für die saure sogar ein Verlust von 95% eintreten¹¹.

FEYRTER¹² hat das native Gefrierschnittverfahren für histologische Gewebsuntersuchungen prinzipiell als Ausgangspunkt und Grundlage empfohlen. Das Verfahren erschien daher auch für die vorliegende Untersuchung als die Methode der Wahl, um schädigende, durch Vorbehandlung entstehende Einflüsse auszuschalten.

Von der planmäßigen Anwendung des nativen Gefrierschnittverfahrens auf diesen Gegenstand unterscheidet sich die Angabe ARNOLDS¹³, daß er bei seinen Phosphataseuntersuchungen den nativen Gefrierschnitt zu Kontrolluntersuchungen herangezogen habe, naturgemäß, wie schon allein daraus erhellt, daß diesem Vermerk keine Mitteilung der erzielten Ergebnisse angefügt erscheint. Übrigens ist uns die Angabe ARNOLDS¹³ erst später im Gang unserer Untersuchungen bei Durchsicht der Literatur zu Gesicht gekommen.

Der Vorteil des Verfahrens lag auf der Hand. 1. Die Einwirkung der Fixierung, der Einbettung, insbesondere der Erwärmung im Bruttofen, die weitere Behandlung mit verschiedenen Lösungsmitteln, wodurch Aktivitätshemmung, Diffusionsverschiebung u. a. des Fermentes zustande kommen, fallen weg. 2. Man hatte damit die Möglichkeit, die Bebrütungslösung direkt auf das frische unvorbehandelte Material wirken zu lassen. 3. Es mußte sich eine beträchtliche Zeit und Arbeitersparnis ergeben, die hier besonders ins Gewicht fällt, da bei der Einbettung strenge Einhaltung der Vorbedingungen zu beachten ist, um überhaupt vergleichbare Werte zu erhalten.

Wir haben nun systematisch den Nachweis der Phosphatase am nativen Gefrierschnitt der Leber untersucht und wollen kurz über diese Ergebnisse berichten.

I. Alkalische Phosphatase.

a) *Material und Methodik.*

Es wurden fast ausschließlich männliche Ratten von etwa 200 g Gewicht benutzt. Zum Versuch Tötung der Tiere durch Nackenschlag. Sofortige Anfertigung eines nativen Gefrierschnittes, der unfixiert in die Bebrütungslösung gebracht wurde. Als Phosphorsäureester verwandten wir das Natriumglycerinphosphat von Riedel de Haën. Bei der Herstellung der Bebrütungslösung richteten wir uns nach Vorschriften von NEUMANN (persönliche Mitteilung⁷). Die Zusammensetzung der Bebrütungslösung und die einzelnen Stationen der Untersuchung wollen wir besonders anführen, da die Methoden der einzelnen Autoren voneinander abweichen.

Bebrütungslösung	Ph 9,3—9,4
Aqua dest.	100 cm ³
Veronal Na	0,5 g
Natriumglycerinphosphat.	0,5 g
Calciumchlorid	2%ig, 5 cm ³
Magnesiumsulphat	2%ig, 2 cm ³

Nach der Bebrütung Abspülen der Präparate in destilliertem Wasser. Einstellen für 2 min in 2%iges Kobaltnitrat. Anschließend Spülen in 5mal erneuertem destilliertem Wasser je 2 min und Einlegen in Ammoniumsulfid. (Einige Tropfen einer hochkonzentrierten Lösung auf 100 cm³ Wasser.) Man erhält dann eine deutliche Reaktion mit den schwarzen Phosphatasestellen, die aus Kobaltsulfid bestehen. Nun werden die Präparate 10 min in fließendes Leitungswasser gestellt und über die aufsteigende Alkoholreihe und Xylol eingedeckt. NEUMANN⁸ bildet in seiner Arbeit ein anschauliches Reaktionsschema ab, das den chemischen Vorgang zeigt.

Neben den unfixierten Gefrierschnitten verwandten wir zum Vergleich auch solche, die vorher 3 Std in 80%igem eiskaltem Alkohol oder in einem kalten Gemisch von absolutem Alkohol und Chloroform fixiert waren. Die letzte Fixierung wurde deshalb mit herangezogen, da nach MAYNO und ROUILLE⁹ Chloroform ein besonders guter Fermentkonservator sein soll (die Arbeit erschien, als unsere Untersuchungen im Gange waren).

Unter der Vorstellung, daß man das Ferment während der Bebrütung vielleicht besser im Schnitt festhalten könne, haben wir einige in Alkohol fixierte Schnitte celloidiniert, ehe sie in die Bebrütungsflüssigkeit gestellt wurden. Wir gaben diesen Weg als unbrauchbar auf, weil Niederschläge und Unregelmäßigkeiten in der Intensität die Bilder nicht auswertbar machten.

b) Der Einfluß der Bebrütungszeit und verschiedener Fixierungsmittel.

Wir prüften zuerst den Einfluß verschieden langer Bebrütungszeiten, wobei 8 Schnitte der Leber zur gleichen Zeit in die Bebrütungslösung gebracht und in Abständen von 20, 40 und 60 min, 2, 4, 6 und 8 Std herausgenommen wurden. Die Dauer der Bebrütung, die bei verschiedenen Organen verschieden lange gewählt werden mußte⁸, um brauchbare histologische Bilder und gleiche Intensität zu erhalten, legten wir für die Leber bei der alkalischen Phosphatase auf 5 Std als Optimum fest.

Wenn man die Reaktion bei direkter Bebrütung des Schnittes in dieser Reihe verfolgt, bemerkt man das erste Auftreten in der Läppchenperipherie nahe den periportal Feldern nach etwa 1—2 Std. Man sieht eine beginnende Schwärzung der Zellen, die sich mit zunehmender Bebrütungszeit auf die ganze Zirkumferenz der Läppchenperipherie ausdehnt und allmählich auf das Läppchenzentrum zuschreitet (Abb. 1a). Die Reaktion tritt in allen Arealen des Gewebsschnittes mit derselben gleichen Intensität auf und nimmt mit der Dauer der Bebrütungszeit zuerst schneller, dann langsamer zu, so daß mit einem objektiven Meßverfahren⁸ eine zuerst steil ansteigende und allmählich flach verlaufende Kurve sich ergibt. Dieser Ablauf wiederholt sich in gleichmäßiger Weise bei jedem Tier.

Der Vorgang ist in derselben Form bei Alkohol- und Alkohol-Chloroformfixierung der nativen Gefrierschnitte zu beobachten. Nach 8 Std Bebrütung oder Inkubation sind die Zentralpartien des Läppchens beträchtlich eingengt, aber immer noch im wesentlichen frei. Nur die Zellkerne zeigen nun auch eine schwach positive Reaktion. Über diese Zeit dehnten wir die Bebrütung nicht aus. Wir glauben aber ohne

weiteres annehmen zu können, daß allmählich nach entsprechend langer Einwirkung auch das Läppchenzentrum, wenn auch viel schwächer, positiv wird.

Im einzelnen zeigt sich bei direkter Bebrütung des Gewebsschnittes schon nach 20 min die erste deutliche Reaktion an den Nucleoli, die dann intensiv schwarz erscheinen. Die übrigen Kernanteile sind blaß-

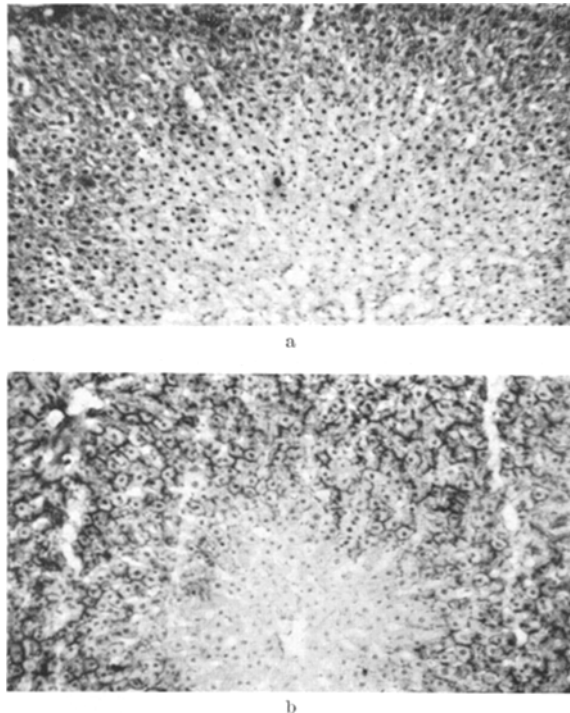


Abb. 1 a u. b. Rattenleber. Alkalische Phosphatase am nativen Gefrierschnitt a) bei direkter Bebrütung; b) nach Alkoholfixierung des Gefrierschnittes. Verankerung des Fermentes in der Peripherie des Läppchens.

grau ohne eine Betonung der Kernmembran. Mit derselben blaßgrauen Intensität zeichnen sich die Zellgrenzen und Gallecapillaren ab, während das Zellplasma eben angedeutet feinfädig aufscheint. Nach längerer Bebrütungszeit wird ohne besondere Zeichnung einer Kernmembran der ganze Kern allmählich tiefschwarz, so daß die Nucleoli von der Chromatinmasse nicht abzutrennen sind. Das feinfädige oder feinschaumige Protoplasma des Zelleibes dunkelt beträchtlich nach, ohne daß man eine besondere Betonung der Reaktion etwa um den Kern oder in den Randgebieten der Zelle beobachten könnte. Die Zellmembran, besonders aber die Gallecapillaren treten nun deutlich hervor, erreichen aber nicht die Intensität des Kernes (Abb. 2a).

Bei der Alkoholfixierung der nativen Gefrierschnitte tritt wieder als erste Reaktion nach 20 min eine Schwärzung der Nucleoli auf. Etwa in derselben Intensität erscheinen zu gleicher Zeit einzelne Gallecapillaren, während das Zellplasma unbeteiligt bleibt. Das Chromatin des Kernes ist blaßbraun, homogen, eine Kernmembran mitunter angedeutet abzugrenzen, aber auch bei längerer Inkubation nie bemerkenswert deutlich. Bei zunehmender Bebrütung zeigt sich, daß die Kernintensität der alkoholfixierten Schnitte gegenüber den unfixierten

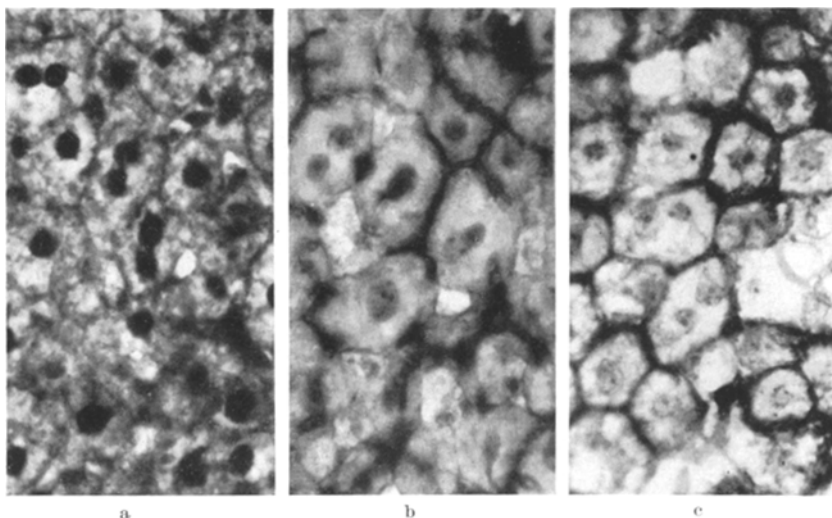


Abb. 2 a—c. Rattenleber. Alkalische Phosphatase am nativen Gefrierschnitt a) nach direkter Bebrütung, b) nach Alkohol-, c) nach Alkohol-Chloroformfixierung. Aktivierung der biliären Reaktion bei b) und c). Hemmung und Aufhebung der Kern- und Plasma-reaktion bei b) und c. (Gleiche Vergrößerung. Gleiche Belichtungszeit der Aufnahmen und der Abzüge.)

beträchtlich zurückbleibt. Die Kerne sind schwarzgrau, noch durchscheinend und lassen die etwas dunkleren Nucleoli erkennen. Das Zellplasma ist homogen oder angedeutet schaumig und grau gefärbt und macht die Reaktion nur schwach mit. Dagegen schwärzen sich die Gallecapillaren in einer Stärke, die die der Kerne übertrifft und etwa der Kernreaktion bei direkter Bebrütung entspricht, und zeigen dann in der Übersicht ein zierlich verästeltes Netzwerk (Abb. 1 b), bei starker Vergrößerung eine ziemlich distinkte Reaktion, die nur wenig auf die angrenzenden Zellen übergreift (Abb. 2 b). Die Gesamtintensität der alkoholfixierten Schnitte wird also im wesentlichen von der Reaktion der Gallecapillaren, weniger der Kerne bestimmt, während bei der direkten Bebrütung die Schwärzung des Schnittareals von der Beteiligung der Kerne und des Zellplasmas, weniger von den Gallecapillaren beherrscht wird. Die Gesamtreaktion ist am nativen Gefrierschnitt

ohne Vorbehandlung deshalb deutlicher und stärker als am alkoholfixierten, was in der Abb. 1 nicht so eindringlich herauskommt, wie es sich unter dem Mikroskop darstellt.

Bei Fixierung mit Alkohol-Chloroform ändert sich das Bild noch weiter. Die Kernreaktion und die des Protoplasmas des Zelleibes ist aufgehoben, die Kerne sind gerade noch erkennbar, die Nucleoli mit schwacher Anfärbung vereinzelt abzugrenzen. Die Reaktion ist ganz auf die Galleepillaren beschränkt, die kräftig geschwärzt sind und im Gegensatz zu dem negativen Kern und Plasma um so deutlicher hervortreten. Dadurch daß bei dieser Fixierung die Kern- und Plasmareaktion vollständig aufgehoben ist, fällt die Gesamtintensität, die sich nur auf die Reaktion der Galleepillaren stützt, beträchtlich geringer als bei direkter Bebrütung und nach Alkoholfixierung aus. Chloroform ist demnach nicht in jedem Falle als guter Fermentkonservator zu betrachten.

Nach einer Vorfixierung, bei der wir statt Chloroform ein Alkohol-Tetrachlorkohlenstoffgemisch verwandten, erhielten wir dieselben Bilder, nämlich Aufhebung der Kern- und Plasmareaktion und kräftige Schwärzung der Galleepillaren.

c) Vergleich von eingebettetem Material mit nativen Gefrierschnitten.

Zum Vergleich mit den Ergebnissen anderer Untersucher und mit den eigenen am nativen Gefrierschnitt gewonnenen betteten wir einige Lebern im Paraffin ein.

Fixierung im 80%igen Alkohol bei 0° 24 Std lang. Absoluter Alkohol 12 Std. Methylbenzoat 12 Std. Benzol $\frac{1}{2}$ Std. Paraffin, wobei zu beachten ist, daß das Stück nicht länger als 3—4 Std im Brutofen steht und die Temperatur 56° nicht überschreitet. Beim Schneiden darf das Wasser zum Auflegen der Schnitte nicht wärmer als 40° sein. Entparaffiniert wird 2mal in Xylol 30 sec, 2mal Alkohol 96% und dann in Wasser. Weitere Behandlung in der oben angegebenen Weise.

Wenn wir unsere am nativen Gefrierschnitt gewonnenen Bilder mit solchen von eingebettetem Material derselben Leber vergleichen, ergeben sich eindrucksvolle Unterschiede. Der eingebettete Schnitt ist bei der gleichen Bebrütungszeit von 5 Std im Überblicksbild in den einzelnen Arealen kaum differenziert. Er ist im ganzen blaßgrau, die periportalen Felder sind etwas dichter. Neben zart positiven Kernen sieht man das feine Netzwerk der Galleepillaren, die im wesentlichen die Reaktionsträger sind und auch am eingebetteten Schnitt die Intensität bestimmen. Die Ränder des Schnittes reagieren etwas stärker, wie es auch amerikanische Arbeiten⁶ mitunter angeben. Also auch *innerhalb des Schnittes verhalten sich die Reaktionsorte ungleichmäßig*. Man muß schon ein besonderes, etwas stärker reagierendes Feld zum Vergleich mit dem nativen Schnitt heraussuchen, um überhaupt eine Reaktion demonstrieren zu können. Wir setzen dazu in unserer Abb. 3 einen alkoholfixierten nativen Gefrierschnitt von derselben Inkubationszeit in Vergleich, der die wesentlich stärkere Reaktion in derselben

Zeiteinheit und das schon eingehend beschriebene Bild der zart verästelten geschwärzten Galleepillaren zeigt. Der Vergleich führt die beträchtliche Aktivitätshemmung, wie wir die Abnahme oder Zunahme der Reaktion im Sinne der Literatur bezeichnen wollen, durch das Einbettungsverfahren vor Augen, die nach STAFFORD und AKTISON¹¹ 70—80% betragen kann. Sie läßt sich wohl im histologischen Bild durch eine etwa dreimal längere Bebrütungszeit bis zu einem ge-

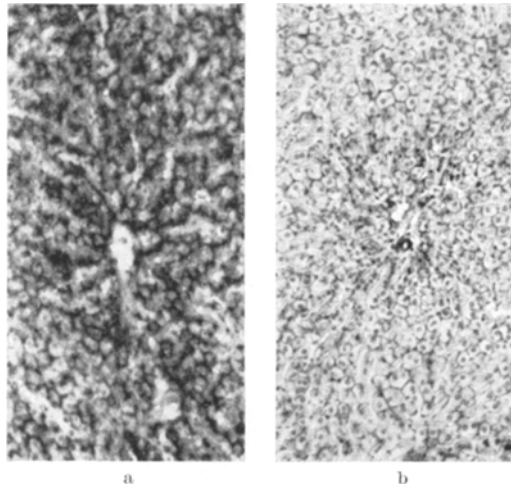


Abb. 3 a u. b. Rattenleber. Alkalische Phosphatase a) am nativen Gefrierschnitt nach Alkoholfixierung, b) am eingebetteten Material. Gleiche Bebrütungszeit. (Gleiche Vergrößerung und Belichtung der Aufnahmen und der Abzüge.)

wissen Grade ausgleichen. Es kam uns aber nicht darauf an, dies zu zeigen. Die Zeitersparnis durch den nativen Gefrierschnitt ist auch in diesem Punkt offensichtlich.

d) Einfluß der Temperatur und der Zeit bei der Fixierung.

Wir studierten weiterhin den Einfluß der Temperatur und der Fixierungsflüssigkeit, indem wir einen Schnitt bei Zimmertemperatur und den anderen bei 0° im 80%igen Alkohol stehenließen. Die Klärung dieser Frage hatte mehr praktische Bedeutung für den Umstand, daß eine geeignete Kühlung nicht zur Verfügung steht. Wir fanden keine Unterschiede im Ausfall der Reaktion.

Den Einfluß der Fixierungszeit prüften wir deshalb nach, weil uns bei der sauren Phosphatase beträchtliche Unterschiede aufgefallen waren. Wir stellten deshalb Gefrierschnitte nur 10 min und ansteigend bis 4 Std in Alkohol, ohne eine Änderung der Intensität der Schwärzung zu bemerken.

e) Der Einfluß postmortalen Veränderungen.

Mit Hinblick auf spätere in Aussicht genommene Untersuchungen am menschlichen Material prüften wir die Frage, wie weit postmortale Vorgänge auf den Ausfall der Reaktion Einfluß haben. Wir ließen dazu die getöteten Tiere nach

sofortiger Anfertigung eines lebensfrischen Schnittes bei Zimmertemperatur liegen, entnehmen ihnen nach 2 und 4 Std für den Gefrierschnitt ein weiteres Stück Leber. Gegenüber dem lebensfrischen Material nimmt nach 2 Std die Reaktion sowohl bei direkter Bebrütung wie nach Alkoholfixierung deutlich zu. Eine auffällige Änderung der Reaktionsorte bezogen auf das Läppchen wie auf die Zelle ist nicht zu sehen. Die Kerne zeigen bei Alkoholfixierung neben den positiven Nucleolen nicht eine homogene, sondern eine mehr körnige Chromatinmasse. Sonst ergeben sich dieselben Bilder, wie wir sie oben beschrieben haben.

Nach 4 Std ist die Reaktion wieder wesentlich abgeschwächt. Vor allem fehlt die Betonung einzelner Areale, im besonderen der Läppchenperipherie. Die Reaktion fällt überall schwach positiv aus. Bei Alkoholfixierung verhalten sich bemerkenswerterweise nur die Galleepillaren praktisch negativ. Für unsere Fragestellung genügt zunächst die Beobachtung, daß größere Verschiebungen der Fermente durch postmortale Vorgänge nicht auftreten, dagegen beträchtliche Veränderungen der Intensität.

f) Kontrollen.

Zu unserer Kontrolle setzen wir Schnitte nach Vorbehandlung mit heißem Formalin in eine Reaktionslösung oder nicht vorbehandelte Schnitte in eine Lösung, der kein Natriumglycerinphosphat zugesetzt war. Diese Reaktion fiel negativ aus.

II. Saure Phosphatase.

a) Material und Methodik.

Dasselbe Tiermaterial benutzten wir auch zur Darstellung der sauren Phosphatase. Als Arbeitsmethode wählten wir auch hier den nativen unfixierten Gefrierschnitt. Die Schnitte wurden sofort in die Bebrütungsflüssigkeit, die wir ebenfalls nach Angaben von NEUMANN⁷ herstellten, gebracht. Wir mußten allerdings kleine Änderungen im Untersuchungsgang einschalten, da die Bilder durch Niederschläge zunächst unbrauchbar waren.

Bebrütungslösung	Ph 4,7
Bleinitrat 1/10 m	10 cm ³
Acetat-Puffer: 6 Teile n/Na Acetat . .	
4 Teile n/Essigsäure . .	12 cm ³
Aqua dest	74 cm ³
Natriumglycerinphosphat 3,2%ig . . .	4 cm ³

Der Puffer wurde am Ionometer gemessen. Die Bebrütungslösung ist etwas trübe, opaleszierend. Die Präparate wurden dann sechsmal in destilliertes Wasser für je 2 min gebracht, anschließend in Amoniumsulfid wie bei der alkalischen Phosphatase. Um die Niederschläge, die wir im Anfang unserer Untersuchung hatten, zu vermeiden, filtrierten wir die Bebrütungslösung klar, wuschen nach der Bebrütung die Präparate für 2—5 min in 5%iger Essigsäure aus. Am besten stellt man das Gefäß mit der Essigsäure zwischen die Gefäße mit Wasser, so daß vor und nach der Essigsäure 3mal gespült wird. Häufige Erneuerung des Wassers. Auf die Weise konnten wir die Niederschläge weitgehend beseitigen. Entwässerung und Eindecken wie üblich. Die saure Phosphatase liegt als dunkelbraune Anfärbung im Gewebe. Zum Vergleich wurden native Gefrierschnitte 3 Std in eiskaltem Aceton und in kaltem Alkohol fixiert. Daneben prüften wir wieder die Wirkung des Chloroforms und des Tetrachlorkohlenstoffs.

Es sei noch erwähnt, daß die Schnitte während des ganzen Untersuchungsganges auf dem Objektträger festhaften, allerdings müssen diese ganz sauber und fettfrei sein, was leicht durch konzentrierte Chromschwefelsäure zu erreichen

ist. Ebenso wichtig ist es, Glasgefäße und Geräte regelmäßig mit Chromschwefelsäure zu reinigen, um anhaftende Niederschläge usw. zu beseitigen und ein Optimum an chemischer Sauberkeit zu erreichen.

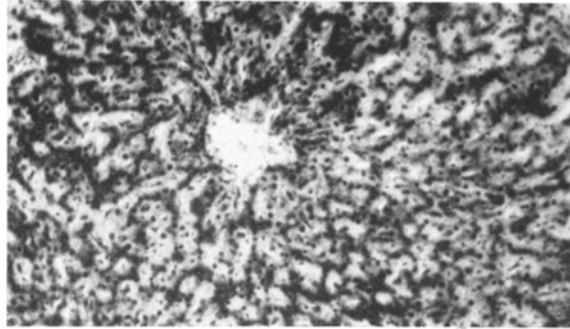
b) Einfluß der Bebrütungszeit und verschiedener Fixierungsmittel.

Bei der sauren Phosphatase gingen wir auch so vor, daß wir zunächst eine Bebrütungsreihe von 20, 40 und 60 min, 2, 3, 4, 6 und 8 Std aufstellten. Dabei tritt am frischen unvorbehandelten Schnitt die erste deutliche Reaktion wieder in der Nähe der periportalen Felder ähnlich wie bei der alkalischen Phosphatase auf. Die Reaktion wird nach etwa 1 Std deutlich und gibt die besten Bilder nach etwa 3—4 Std. Bis dahin haben sich die Reaktionsgebiete weiter ausgebreitet, indem sie zunächst die zentralen Partien des Läppchens aussparen, aber dann doch auf sie übergreifen. Allerdings ist eine so regelmäßige Anordnung und Abgrenzung der Aktivitätszonen bezogen auf das Läppchen wie bei der alkalischen Phosphatase nicht festzustellen. Es zeigt sich bei dieser Reaktion an den positiven Stellen nicht eine Schwärzung der Reaktionsorte, sondern eine Bräunung, die bei längerer Bebrütung in eine braun-schwarze Ballung übergeht. Bei der Acetonfixierung ergeben sich für die Ablagerungen innerhalb des Läppchens etwa dieselben Verhältnisse (Abb. 4a und b). *Die Bilder lassen sich von Schnitt zu Schnitt und von Tier zu Tier reproduzieren und fallen im ganzen Schnittareal gleichmäßig aus.*

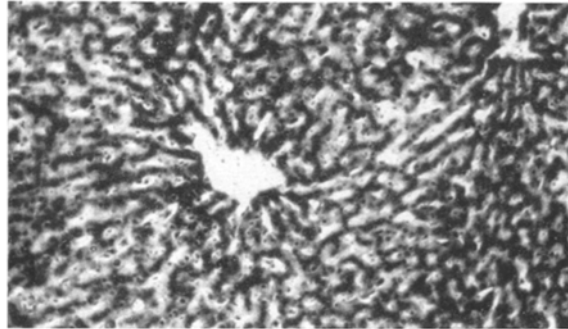
Im einzelnen zeigen schon nach kurzer Zeit am nativen unbehandelten Schnitt wieder die Nucleolen die erste deutliche Reaktion, die sich besonders hervorhebt. Der Kern ist dabei im ganzen homogen gelbbraun und läßt außerdem etwas stärker positive feine Granula erkennen, die aber nicht die Intensität der Nucleolen erreichen. Eine Kernmembran hebt sich nicht ab. Nach 4 Std Inkubation wird der Kern im ganzen tiefschwarzbraun und läßt dann Einzelheiten nicht mehr differenzieren. Diese Kernreaktion bleibt nicht auf die periportal und peripheren Läppchenfelder beschränkt, sondern *bildet sich ohne wesentliche merkbare Unterschiede über den ganzen Schnitt gleichzeitig und ziemlich gleichmäßig aus* (Abb. 4a und b).

Das Protoplasma der Zellen scheint nach der ersten Bebrütungszeit blaßgelblich tingiert auf. Zellgrenzen sind eben gerade zu erkennen. Diese Situation bleibt grundsätzlich während der ganzen Inkubationszeit. Nach etwa 1 Std tritt an den Reaktionsorten im Bereich der Gallicapillaren eine zunehmende Bräunung auf. Die Capillaren lassen sich in den Anfangsstadien zum Teil noch differenzieren, gehen aber mit zunehmender Reaktion in der auftretenden Schwärzung unter, die nicht streng auf die Gallicapillaren beschränkt bleibt, sondern die angrenzenden Zellbezirke mit einbezieht. Die zunehmende feine Bräunung fließt

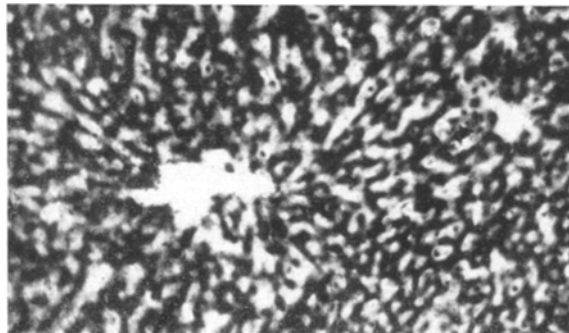
bei stärkerer Reaktion zu schwarzbraunen, wolkigen dichten Massen zusammen, lagert sich in einem ziemlich breiten Band um die Galle-



a



b

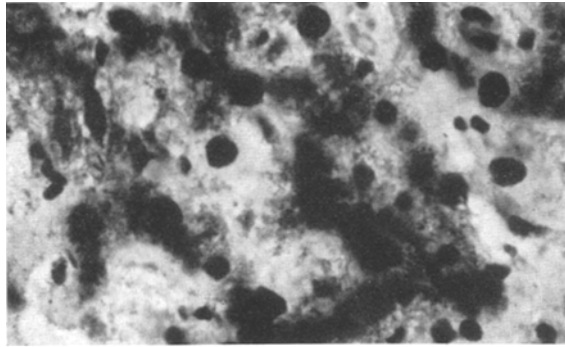


c

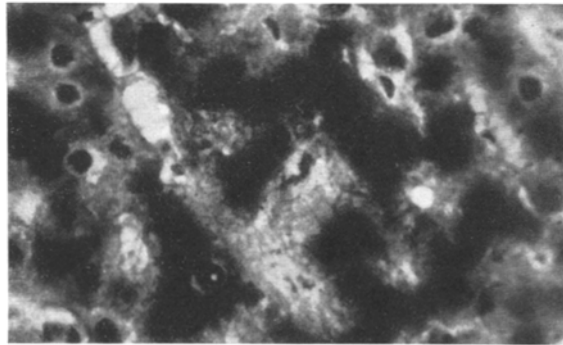
Abb. 4 a—c. Rattenleber. Saure Phosphatase am nativen Gefrierschnitt a) bei direkter Bebrütung, b) nach Acetonfixierung, c) nach 4 Std Autolyse des Lebergewebes und Acetonfixierung.

capillaren ab und greift unter feinkörniger Auflockerung auf die angrenzenden Zellen über, nimmt sie aber im allgemeinen nicht vollständig ein und läßt zumindest einen schmalen Raum um den Kern

frei (Abb. 5a). Man sieht dann bei ausgebildeter Reaktion dieses eigentümlich verästelte Netzwerk nach Anordnung der Galleepillaren, wie es bei der alkalischen Phosphatase nach Alkoholfixierung so deutlich in Erscheinung tritt. Das Bild und die Zeichnung des Netzwerkes wirkt aber durch die breiten Bänder viel plumper. Dabei reagieren die Kerne



a



b

Abb. 5 a u. b. Rattenleber. Starke Vergrößerung. Saure Phosphatase am nativen Gefrierschnitt a) nach direkter Bebrütung, b) nach Acetonfixierung. Vorwiegend peribiliäre Verankerung der Phosphatasen.

des Reticuloendothels ebenso wie die Leberzellkerne. Das Endothel selbst hebt sich nicht besonders hervor.

Nach Azetonfixierung verhält sich das Gewebe etwa in derselben Weise. Als erstes sieht man wieder die Nucleolen positiv. Sie reagieren aber in der Zeiteinheit schwächer und heben sich dadurch gegenüber den Chromatingranulas des Zellkerns nicht hervor. Eine Kernmembran zeichnet sich auch hier nicht ab. Der abgeschwächten Reaktion der Nucleolen ist es wohl zuzuschreiben, daß die Kernreaktion im ganzen nach Acetonfixierung im Vergleich zur direkten Bebrütung etwas schwächer ausfällt.

Dagegen werden die peribilären Reaktionsorte durch Aceton nicht beeinträchtigt. Die Bänder erscheinen sogar dichter, breiter und geballt, als ob das Ferment auseinandergeflossen und in die Umgebung diffundiert wäre. Das Netzwerk ist noch plumper und massiver, die Einzelheiten der Ablagerung, die Verhältnisse zur Zelle und zum Kern sind verwaschen (Abb. 5b).

c) Einfluß der Alkoholfixierung.

Beträchtliche Unterschiede ergeben sich bei der Alkoholfixierung. Solche Schnitte zeigen im gesamten eine deutliche Hemmung der Aktivität. Am Kern ist die Reaktion der Nucleolen aufgehoben, nur das feine Chromatingerüst gebräunt. Die Reaktion bleibt aber in der Zeiteinheit weit hinter der nach direkter Bebrütung und Acetonfixierung. Die peribilären Reaktionsorte weisen nach entsprechend langer Inkubation eine feinkörnige Bräunung auf, die aber in der Intensität weit gegenüber den vorhergehenden Methoden zurückbleibt.

Merkwürdig erscheint unsere Beobachtung, daß nach kurz dauernder Fixierung von 10 min die Reaktion noch wesentlich schwächer ausfällt als nach Fixierung von 2 oder 4 Std. Mit der Fixierungsdauer in Alkohol nimmt die Reaktion wieder an Stärke zu, erreicht aber nicht die Grade, die wir bei direkter Bebrütung oder Acetonfixierung sehen. In einer jetzt erschienenen Arbeit hat NEUMANN²⁰ die hemmende Wirkung des Alkohols auf die saure Phosphatase festgestellt und besonders untersucht.

Fixierung mit Aceton-Chloroform oder Aceton-Tetrachlorkohlenstoff hemmt fast vollständig die Kern- und peribiläre Reaktion. Diese Einwirkung geht noch über die vom reinen Alkohol gesetzte Hemmung hinaus.

d) Einfluß der Temperatur bei der Fixierung.

Dazu wurde ein Präparat in kaltem Aceton, das andere bei Zimmertemperatur fixiert. Es zeigte sich, daß die kalte Fixierung die Aktivität besser erhält, die Reaktion also deutlich stärker ausfällt.

e) Einfluß postmortaler Vorgänge.

Zum Studium autolytischer postmortaler Vorgänge ließen wir wieder ein frisch getötetes Tier bei Zimmertemperatur liegen und entnahmen nach 2 und 4 Std Leberstücke, von denen wir native Gefrierschnitte anfertigten und sie mit dem Ergebnis des lebensfrischen, unmittelbar nach dem Tod entnommenen Materials verglichen.

Bei der direkten Bebrütung traten an der autolytisch veränderten Leber massive Niederschläge auf, die das Präparat völlig überdecken, auch mit Essigsäure nicht auszuwaschen sind und deshalb keine Beurteilung zulassen. Diese Niederschlagsbildung hängt wahrscheinlich mit den postmortalen Vorgängen zusammen, insofern als die im Abbau befindlichen Eiweißsubstanzen eine besondere Affinität zum Bleinitrat besitzen und mit ihm anscheinend feste Bleiverbindungen

eingehen. Bei Probeschnitten am menschlichen Material hatten wir übrigens dasselbe Ergebnis.

Nach Acetonfixierung ist die Niederschlagsbildung wesentlich geringer, so daß die Präparate zu beurteilen sind. Offenbar hebt die Eiweißfällung durch Aceton die Affinität des Bleinitrats weitgehend auf. An diesem Material ist die Kernreaktion teilweise ganz verschwunden,

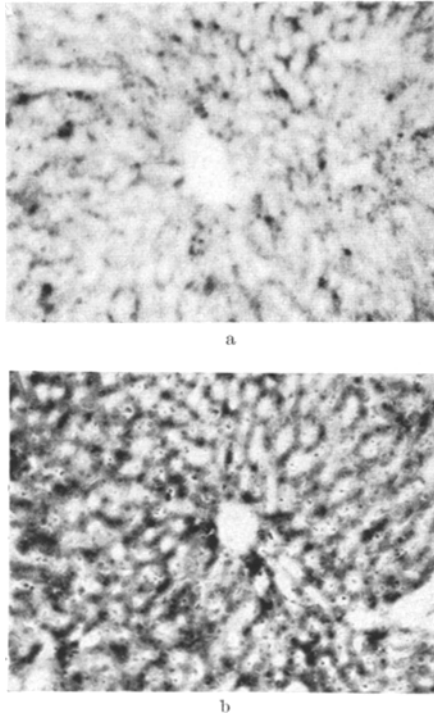


Abb. 6 a u. b. Rattenleber. Saure Phosphatase am nativen Gefrierschnitt a) nach 10 min Alkoholfixierung, b) nach 2 Std Alkoholfixierung. Gleiche Bebrütungszeit (4 Std) wie in Abb. 4. (Gleiche Vergrößerung. Gleiche Belichtung der Aufnahmen und der Abzüge.)

teilweise schwach, teils noch gut erhalten, geht aber meist verschwimmend in die peribiliäre Schwärzung über (Abb. 4c). Die Intensität der Reaktion ist durch die postmortalen Vorgänge nicht beeinträchtigt. Die Bänder sind aber homogenisiert, fließen ineinander und verschwimmen. Es scheint also eine Diffusion der Phosphatase in die umgebenden Gebiete einzusetzen, so daß eine exakte Lokalisation der Fermentwirkung nicht mehr möglich ist.

f) Kontrollen.

Fixierung im heißen Formalin und Leerversuche, d. h. Bebrütung ohne Natriumglycerinphosphat gaben uns die Kontrollen und völlig negative Befunde.

g) *Vergleich des eingebetteten Materials mit dem nativen Gefrierschnitt.*

Die in Paraffin eingebetteten Stücke für die Bestimmung der sauren Phosphatase wurden folgendermaßen behandelt. Fixierung in eiskaltem Alkohol 24 Std. Am 2. Tag bei Zimmertemperatur zweimaliges Wechseln des Acetons. Dann kommen die Gewebsstücke über Methylbenzoat und Benzol ins Paraffin, wobei die gleichen Vorsichtsmaßnahmen wie bei der alkalischen Phosphatase zu berücksichtigen sind. Anfertigung der Schnitte, Entparaffinieren über Aceton und Behandlung wie an nativen Gefrierschnitten.

Der Vergleich mit eingebettetem Material derselben Leber zeigt auch hier die Überlegenheit des nativen Gefrierschnittes. Am eingebetteten Schnitt ist nach 4 Std die Reaktion noch fast negativ. Am Kern reagieren die Nucleolen fast überhaupt nicht, die Chromatingranula nur schwach, so daß sich etwa ein Bild wie nach der Alkoholfixierung des nativen Gefrierschnittes ergibt. Von einer deutlichen und betonten Bräunung der peribiliären Reaktionsorte ist nichts festzustellen. Wenn eine etwas stärkere Anfärbung an einzelnen Stellen auftritt, ist sie mehr diffus in der Zelle verteilt. Überhaupt fällt die an sich schon geringe Reaktion innerhalb des Schnittes in den einzelnen Arealen noch recht unterschiedlich aus. So kann auch der Schnitttrand völlig negativ sein. Aber auch von Schnitt zu Schnitt desselben Materials sind Unterschiede der Intensität zu bemerken.

Besprechung.

Das Ergebnis der Untersuchung rechtfertigt unsere Erwartung, die wir in den nativen Gefrierschnitt zum Nachweis der Fermente in der Leber setzten. Der Vorteil der Arbeits- und Zeitersparnis liegt auf der Hand und braucht keine weitere Erörterung. Er besteht im wesentlichen im Fortfall der Einbettung und der beträchtlichen Abkürzung der Bebrütungszeit.

Weit wichtiger erscheint die Tatsache, daß man *allein mit dieser Methode reproduzierbare und im Ausfall gleiche Bilder erhält*, so daß es möglich ist, Reihenuntersuchungen mit einwandfreien Vergleichen durchzuführen. Die Methode gestattet es weiterhin, *einzelne Stoffe direkt auf den frischen Schnitt wirken zu lassen und ihren Einfluß auf die Fermentreaktion zu studieren und abzulesen, ohne daß vorher schon unkontrollierbare Einwirkungen durch den Prozeß der Fixierung und Einbettung stattgefunden haben*. Sie eröffnet damit im Sinne FEYRTERS ein weites noch unüberschaubares Arbeitsfeld.

Den einzigen Nachteil der Methode sehen wir in der leichten Bildung von Niederschlägen, die sich aber bei sorgfältigem Arbeiten und bei Beachtung der von uns gegebenen Anweisung weitgehend vermeiden und zurückdrängen lassen, so daß sie die Beurteilung und Auswertung nicht stören oder gar verhindern. Dieser Nachteil wird durch die oben geschilderten Vorteile weitgehend aufgehoben, so daß man diese Methode mit FEYRTER als *die Methode der Wahl* bezeichnen muß und für derartige Untersuchungen überall dort anwenden sollte, wo sie technisch durchführbar ist.

Die Bilder, die wir im besonderen bei der alkalischen Phosphatase nach Alkoholfixierung des nativen Gefrierschnittes erhielten, stimmen im wesentlichen mit den Beschreibungen amerikanischer Untersucher²⁻⁶ überein. Den Bildern nach unserer direkten Bebrütung sind wir in der Literatur noch nicht begegnet. Die Unterschiede, die sich hier ergeben, wollen wir nicht noch einmal wiederholen. Wir verweisen dazu auf die Abbildungen und unsere obige ausführliche Beschreibung.

Bei der Frage, welches histologische Bild uns den tatsächlichen Verhältnissen am nächsten bringt, wird man sich für die Veränderungen nach direkter Bebrütung entscheiden müssen. Unsere Erörterungen zum Einfluß des Alkohols, die wir weiter unten anführen, unterstreichen diese Entscheidung.

Als Besonderheit möchten wir *die Verteilung der Fermentintensität bezogen auf das Leberläppchen* hervorheben. Sie ist bei der alkalischen Phosphatase ausgeprägt, bei der sauren weniger deutlich und betrifft *ganz besonders die Läppchenperipherie*. Aus früheren menschlichen und experimentellen Untersuchungen der Leber und aus der Ablagerung des Glykogens und Fettes innerhalb des Leberläppchens hatten wir auf Funktionsunterschiede des peripheren und zentralen Areals geschlossen¹⁴. Nur mit Hilfe dieser Annahme ließ sich die verschiedene zentrale und periphere Ablagerung dieser Stoffe hinreichend erklären. Die vorwiegende Verankerung der alkalischen Phosphatase in der Läppchenperipherie *bestätigt unsere Annahme solcher Funktionsunterschiede innerhalb des Leberläppchens* und rechtfertigt *die Unterscheidung eines peripheren und zentralen Funktionsfeldes*¹⁵.

Die besondere Aktivität des Zellkernes und hier wieder die der Nucleolen bei beiden Phosphatasen ist keineswegs überraschend. Wird doch heute ein großer Teil des Zellstoffwechsels, insbesondere der synthetischen Leistung der Zelle in den Kern verlegt. Der Reichtum der Kerne an Fermenten, auch an Phosphatasen ist chemisch nachgewiesen¹⁶.

Bemerkenswert erscheint uns die besondere biliäre und peribiliäre Lokalisation der Phosphatasen. Wir betonten in unseren früheren Arbeiten¹⁷ zur Leberverfettung, daß *die peribiliäre Ablagerung des Fettes die Verarbeitungsphase* darstellt, die perivaskuläre Ablagerung dagegen als Speicherungsphase zu bezeichnen ist. Die Verarbeitung des Fettes in der Leber geht über Phosphatide. Daß die Phosphatasen eine maßgebliche Rolle dabei spielen und sich diese Umsetzung in enger Beziehung zu den Galleepillaren und zu den phosphatasereichen Räumen vollzieht, scheint nach diesen histologischen Bildern nahezu liegen. *Unsere frühere Annahme, in der peribiliären Verfettung und Fettablagerung die Verarbeitungsphase zu sehen, wird also durch diese Fermentuntersuchungen weitgehend gestützt.*

Beachtenswert erscheint uns der unterschiedliche Einfluß der einzelnen angewandten Fixierungsmittel auf die Fermentaktivität. Wir gehen bei dem Vergleich von den Ergebnissen der direkten Inkubation der nativen Gefrierschnitte aus. Bei der Reaktion auf alkalische Phosphatase tritt nach Alkoholfixierung eine gewisse, aber nicht völlige Hemmung im Kern und im Plasma auf. Dagegen wird die Schwärzung an den Gallecapillaren verstärkt. Unter dem Einfluß von Chloroform ist die Hemmung am Kern und im Plasma vollständig, der positive Befund an den Gallecapillaren so stark wie bei reinem Alkohol. Bei der sauren Phosphatase sehen wir auch derartige Unterschiede. Aceton bewirkt eine leichte Hemmung an den Kernen, insbesondere an den Nucleolen, dagegen anscheinend eine Verstärkung der Aktivität im peribiliären Raum, Alkohol wiederum eine weitgehende Hemmung am Kern und den peribiliären Reaktionsorten. Für Alkohol ist dabei noch besonders merkwürdig, daß die Länge der Fixierungszeit die Reaktion wieder verstärkt.

Aus dem unterschiedlichen Verhalten der Kerne, des Plasmas und der peribiliären Bezirke auf dasselbe Fixierungsmittel ist zu schließen, daß die *Phosphatasen des Kernes nicht ohne weiteres mit denen der Gallecapillaren gleichzusetzen* sind. Das ist verständlich; denn es handelt sich bekanntlich um ein ganzes System von Phosphatasen, das sich auch histologisch durch Änderung des p_H -Milieus und des Substrates bis zu einem gewissen Grade differenzieren läßt³. In dieses System greifen die Fixierungsmittel als Fermentgifte ein. Das eine wirkt sich stärker am Kern, das andere mehr am Plasmaleib aus, nicht immer im Sinne einer Hemmung, sondern auch in Richtung einer überschießenden Aktivität. Diese Befunde scheinen unsere früher entwickelten Vorstellungen¹⁸ zu bestätigen, daß *solche Gifte an ganz bestimmter Stelle in ein Fermentsystem eingreifen*, durch Hemmung, durch reversible und irreversible Inaktivierung, andererseits durch Verstärkung der Aktivität des einen oder anderen Enzyms *das Fermentsystem aus dem Gleichgewicht bringen und zu einer Dysenzymie*, zu entsprechenden Veränderungen des Stoffwechsels und schließlich auch der groben morphologischen Struktur der Zellen *führen können*, sobald durch diesen Prozeß auch die im Zelleiweiß verankerten proteolytischen Fermente frei werden.

Die hemmende Wirkung des Alkohols auf die saure Phosphatase läßt an Zusammenhänge mit der Prostata denken, deren Phosphatase im Blut durch Alkohol inaktiviert werden kann, dadurch methodisch bestimmt und gegenüber der Restphosphatase abgegrenzt wird.

Schließlich wollen wir noch einmal die Veränderungen der Fermentreaktionen erwähnen, die sich durch postmortale Vorgänge einstellen. Wenn sich unsere Ergebnisse am Tier überhaupt auf den Menschen übertragen lassen, so wäre es wünschenswert zu wissen, innerhalb welcher

Zeit nach dem Tode z. B. die alkalische Phosphatase in der Leber an Aktivität zunimmt, um dann wieder abzufallen und ganz zu verschwinden, und die saure Phosphatase so weit diffundiert, daß eine Beurteilung der histologischen Bilder unmöglich wird. Beachtenswert ist zunächst allein die Feststellung, daß postmortale Veränderungen der Fermentreaktion auftreten. Es wird deshalb noch besonders ausgedehnter Arbeit bedürfen, um am menschlichen Leichenmaterial zu Ergebnissen zu kommen, die überschaubar sind.

Zusammenfassung.

1. Vergleichende Untersuchungen am nativen Gefrierschnitt und am eingebetteten Material von Lebern zeigten, daß der Nachweis der alkalischen und sauren Phosphatasen am nativen Gefrierschnitt die Methode der Wahl ist.

2. Die alkalischen und sauren Phosphatasen sind besonders in der Peripherie des Leberläppchens verankert. Der Befund weist auf einen Funktionsunterschied der Läppchenperipherie und des Zentrums hin und unterstützt die Annahme eines zentralen und peripheren Funktionsfeldes des Leberläppchens.

3. Beide Phosphatasegruppen sind im Bereich der Zelle vorwiegend biliär und peribiliär lokalisiert. Es wird angenommen, daß die peribiliäre Verfettung in funktioneller Beziehung zu diesen Reaktionsorten der Phosphatase steht und man diese Verfettungsform wohl mit Recht als Verarbeitungsphase bezeichnen kann.

4. Die verschiedenen Fixierungsmittel üben einen unterschiedlichen Einfluß auf die Phosphataseaktivität der einzelnen Zellanteile aus.

5. Auf postmortale Änderungen des Phosphatasebildes wird hingewiesen.

Literatur.

- ¹ GÖMÖRI, G.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **42**, 23 (1939). — Amer. J. Clin. Path. **16**, 347, (1946). — ² WACHSTEIN, M.: Arch. of Path. **40**, 57 (1945). — ³ WENDLER-DEANE, H.: Amer. J. Anat. **1947**, 80. — ⁴ DONALD, D. M.: Arch. of Path. **49**, 545 (1951). — ⁵ FRANK, P., F. DANIEL, A. EDWARD and L. SCHIFF: Arch. of Path. **49**, 333 (1951). — ⁶ JAKOBY, F.: J. of Physiol. **105**, 19P (1946). — ⁷ NEUMANN, K.: Persönliche Mitteilung. — ⁸ NEUMANN, K.: Verh. anat. Ges. **1951**, 165. — ⁹ MAYNO, G., u. CH. ROUILLER: Virchows Arch. **321**, 1 (1951). — ¹⁰ DANIELLI: Zit. nach MAYNO u. ROUILLER. — ¹¹ STAFFORD, R. O., and W. B. AKTISON: Science (Lancaster, Pa.) **107**, 279 (1948). — ¹² FEYRTER, F.: Über die Pathologie der vegetativen nervösen Peripherie und der ganglionären Regulationsstätten, S. 183 bis 185. Wien: Wilhelm Maudrich 1951. — ¹³ ARNOLD: Verh. dtsh. Ges. Path. **1948**, 125. — ¹⁴ EGER, W.: Virchows Arch. **315**, 135 (1948). — ¹⁵ EGER, W.: Med. Mschr. (im Erscheinen). — ¹⁶ LANG, K.: Mikroskopische und Chemische Organisation der Zelle. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1952. — ¹⁷ EGER, W.: Virchows Arch. **315**, 147 (1948). — ¹⁸ EGER, W.: Frank. Z. Path. **62**, 551 (1951). — ¹⁹ LISON, L.: Bull. Histol. appl. **25**, 23 (1948). — ²⁰ NEUMANN, K.: Z. wiss. Mikrosk. **60**, 449 (1952).

Doz. Dr. W. EGER, Göttingen, Pathologisches Institut der Universität.