

Aus der Forschungsabteilung der Freien Universität Berlin am Institut für Mikromorphologie (Deutsche Forschungshochschule) Berlin (Leiter: Prof. Dr. H. RUSKA) und der Anatomischen Anstalt der Freien Universität Berlin (Leiter: Prof. Dr. E. v. HERRATH).

Elektronenmikroskopische Untersuchung des elastischen Gewebes in der Media der menschlichen Aorta.

Von

WILLY SCHWARZ und NORBERT DETTMER.

Mit 12 Textabbildungen.

(Eingegangen am 8. August 1952.)

Einleitung.

Die vorliegende Arbeit beschränkt sich auf die Untersuchung des elastischen Gewebes der normalen Aortenmedia. Sie ist gleichzeitig als ein Beitrag zum allgemeinen Strukturproblem des elastischen Gewebes gedacht. Altersveränderungen und atheromatöse Umwandlung der elastischen Elemente sind weiteren Untersuchungen vorbehalten. Wir glauben hier insofern neue Gesichtspunkte bringen zu können, als wir bestrebt sind, nicht nur die morphologischen *Unterschiede*, sondern auch morphologische *Beziehungen* des elastischen Gewebes zum übrigen Bindegewebe zu klären.

Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung der elastischen Elemente kann man keine morphologische Beziehung zwischen ihnen und den Fasern des übrigen Bindegewebes feststellen. Während die kollagenen Fasern immer einen fibrillären Aufbau erkennen lassen, bildet das „Elastin“ verzweigte lichtmikroskopisch amorphe Fasern und gefensterte Membranen. Auch Körnchen und homogene Platten sind beschrieben worden. Eine Innenstruktur der elastischen Fasern ließ sich lichtmikroskopisch nicht nachweisen. Nur EWALD (1890) äußerte die Vermutung, daß sie ein Stroma hätten, konnte es aber mit Sicherheit auch nicht darstellen.

Diese morphologischen Befunde am „Elastin“ verschaffen ihm eine Sonderstellung innerhalb des Bindegewebes, die einen Vergleich mit anderen Faserstrukturen unmöglich macht. Nun sind andererseits mit besonderen Methoden aber Befunde am „Elastin“ erhoben worden, die eine gewisse Verwandtschaft dieses Gewebes mit dem übrigen Bindegewebe vermuten lassen. Diese Verwandtschaft, die genetisch ja gegeben ist, kommt z. B. in den übereinstimmenden Molekülkettenabständen zum Ausdruck, die man im Röntgen-Beugungsbild nachgewiesen hat (FREY-WYSSLING 1948; ASTBURY 1940). Auch die schwache Doppelbrechung der ungedehnten elastischen Fasern, die bei

Dehnung zunimmt, sowie der Umkehreffekt der Doppelbrechung nach Einwirkung von Phenolen (SCHMIDT 1924) sprechen für diese Verwandtschaft.

Mit der Entwicklung der elektronenmikroskopischen Untersuchungsmethoden trat auch die Untersuchung des elastischen Gewebes in ein neues Stadium ein. Hier war unter Umständen die Möglichkeit gegeben, die oben angedeuteten Widersprüche zu beheben und die Struktur des „Elastins“ weiter zu klären. Mit Hilfe des Elektronenmikroskopes ist nun zuerst von WOLPERS (1944) und später von GROSS (1949) das elastische Gewebe untersucht worden. WOLPERS fand amorphe, verzweigte Fasern sehr unterschiedlicher Dicke. Nur in einigen Präparaten sah er eine feine *longitudinale Streifung* dieser Fasern, die er dem Einfluß der Fixierung zusprach. GROSS beschrieb das elastische Gewebe als aus zwei Komponenten zusammengesetzt, einem Stroma von Fibrillen, von denen jeweils zwei umeinander gedreht sind, und einer einhüllenden amorphen Substanz. Die zopfartig umeinander gedrehten Fibrillen sind aber später von GROSS selbst (1951) sowie von FRANCHI und DE ROBERTIS (1951) als Verunreinigung der verwendeten Trypsinlösungen erkannt worden, so daß sie als Strukturelemente des elastischen Gewebes nicht in Frage kommen.

Aus diesen Untersuchungen schien hervorzugehen, daß das Elektronenbild im wesentlichen nur eine Bestätigung der schon lichtmikroskopisch erhobenen Befunde ergibt. Dagegen fand DETTMER (1952), der die Fasern im elastischen Flügelband der Taube untersuchte, ein fibrilläres Grundgerüst dieser Fasern, das von einer reichlichen Menge Kittsubstanz eingehüllt ist. Durch seine Befunde wird die elastische Faser ihrer morphologischen Sonderstellung beraubt, da sie wie jede andere Bindegewebefaser aus Fibrillen und Kittsubstanz zusammengesetzt ist. In ihrem chemischen und physikalischen Verhalten unterscheiden sich Fibrillen und Kittsubstanzen der Binde- und Stützgewebsarten voneinander, das *Prinzip ihres morphologischen Aufbaus* ist jedoch immer gleich (SCHWARZ 1952).

Im folgenden seien einige Ergebnisse elektronenmikroskopischer Untersuchungen am Bindegewebe angeführt, die auch die Grundlage für unsere Arbeit sind.

Von SCHMITT, HALL und JAKUS (1942) sowie unabhängig davon von WOLPERS (1943) wurden zuerst an Fibrillen des Sehnenkollagens charakteristische Querstreifungsperioden beschrieben. Die Länge einer solchen Periode beträgt etwa 65 μ . Dieser Wert ist zu den Ergebnissen der Röntgen-Strukturanalyse in Beziehung zu setzen (BEAR 1942).

Nach den Untersuchungen am Sehnenkollagen war man allgemein der Ansicht, daß diese Querstreifungsperiode das kennzeichnende Merkmal der Kollagenfibrille sei. Neuere Untersuchungen an den Fibrillen der *Zonula Zinii* (RUSKA und SCHWARZ 1951), an den Gitterfasern (v. HERRATH und DETTMER 1951) und an

den Fibrillen der *Cornea* und *Sklera* (SCHWARZ 1952) zeigten aber, daß sich die kennzeichnende „Kollagenperiode“ auch bei den Fibrillen dieser Gewebe findet.

So different das histologische Bild der einzelnen Arten des Bindegewebes ist, im Elektronenmikroskop findet man bei allen diesen Arten Fibrillen, deren Aufbau weitgehend übereinstimmt. Damit ist das gemeinsame Strukturprinzip des ganzen Bindegewebes gegeben, nämlich die zuerst für Kollagen definierte Querstreifungsperiode. So stellte auch WASSERMANN (1951) die Übereinstimmung der Querstreifungsperioden von argyrophilen und kollagenen Fibrillen fest und konnte beide zwar im histologischen Bild, nicht aber im Elektronenmikroskop unterscheiden. Es ergab sich daher die Notwendigkeit, nach Kriterien und Methoden zu suchen, die eine aus der Histologie geläufige Differenzierung der einzelnen Bindegewebsformen auch im Elektronenmikroskop gestatten. Eine solche Differenzierung verschiedener Fibrillenarten ist in gewissem Sinne durch die aus der Histologie bekannte Bindegewebsversilberung nach GÖMÖRI (ROMEIS 1948) möglich. So versilbert sich Sehnenkollagen (DETTMER, NECKEL und RUSKA 1951) grundsätzlich anders als Retikulin (v. HERRATH und DETTMER 1951) oder Cornea-fibrillen (SCHWARZ 1952). Auch die Fibrillen des elastischen Gewebes im Flügelband der Taube (DETTMER 1952) lassen die charakteristische Querstreifung einer Bindegewebsfibrille erkennen. Nach Versilberung aber zeigen sie ein Verhalten, das ihre deutliche Abgrenzung vom Kollagen ermöglicht.

Material und Methoden.

Es wurde der *Bulbusteil* einer Reihe von Aorten von Kindern und Erwachsenen der mittleren Lebensalter untersucht. Die Aorten zeigten weder makroskopisch noch mikroskopisch Wandveränderungen. Von einem Teil des Materials wurden mit einem Dünnschnittmikrotom (nach DANON und KELLENBERGER) Schnitte von etwa $0,1 \mu$ angefertigt. Als Einbettungsmittel diente *Cremolan*¹ (SCHWARZ und VESTER 1952). Dieser Stoff ist wasserlöslich, chemisch indifferent und besitzt vorzügliche Schnitteigenschaften. Man hat die Möglichkeit, Cremolanschnitte mit Fermenten zu behandeln. Wir verwendeten *Elastase*. Die Elastase ist erst in letzter Zeit aus Pankreastrockensubstanz von BALO und BANGA (1950) dargestellt worden. Der Wirkungsmechanismus dieses Fermentes ist noch unbekannt. Es soll keine Aminosäuren freisetzen. Fest steht, daß Aortenpulver durch Elastase weitgehend gelöst wird. BANGA (1951) hat durch eine neue Darstellungsmethode eine verbesserte Elastase gewinnen können, die wir bei unseren Versuchen verwendeten².

¹ Für die freundliche Überlassung des Cremolans danken wir Herrn Prof. Dr. ÖTTEL von der B. A. S. F. Ludwigshafen.

² Für die Darstellung der Elastase danken wir Fr. Dr. I. NECKEL.

Zur Strukturanalyse der Aortenwand ist es nötig, das Gewebe stark zu zerkleinern, um die Einzelheiten beurteilen zu können. Diese Einzelheiten kommen im Schnittbild selten und nur unter gewissen Bedingungen zur Darstellung, die im Bindegewebe im allgemeinen nicht erfüllt sind. Auf diesen Punkt werden wir weiter unten noch zurückkommen. Zur Zerkleinerung des Materials diente uns die Schnitt-Schallpräparation nach WOLPERS (1943). Hierbei wird das Objekt auf dem Gefriermikrotom geschnitten und anschließend mit hochfrequentem Schall einige Minuten behandelt. Hierzu verwendeten wir das *Siemens-Beschallungsgerät*, das mit einer Frequenz von etwa 10 kHz arbeitet. Der Schall zerstört zunächst die Zellen, die interzelluläre Substanz erweist sich als widerstandsfähiger. Bei längerer Schalleinwirkung wird der Faserverband gelockert und zerzupft, dann folgt eine Aufsplitterung der Fasern in Fibrillen. Als letztes geht der Kittsubstanzmantel um die Fibrillen verloren. Die Fibrillen selbst bleiben auch nach langer Beschallungszeit (30 min) erhalten. Die Kittsubstanzen der verschiedenen Gewebe verhalten sich bei der Schalleinwirkung unterschiedlich.

Die Fixierung des Objektes spielt in der Elektronenmikroskopie eine ausschlaggebende Rolle, da Fixierungsartefakte im Elektronenbild natürlich stärker in Erscheinung treten als im histologischen Bild. Am besten hat sich hier die Fixierung mit Formalin oder Osmiumsäure bewährt. Auch Phosphorwolframsäure und Phosphormolybdänsäure werden verwendet. Die genannten schwermetallhaltigen Fixierungsmittel dienen gleichzeitig zur „Anfärbung“ des Objektes. Eine Färbung im histologischen Sinne ist für die Elektronenmikroskopie natürlich nicht möglich, weil ja nur Schwarz-Weiß-Kontraste auf dem Leuchtschirm gesehen und photographiert werden können. Entscheidend für den Kontrast ist die „Massendicke“ des Objektes, worunter man das Produkt aus seiner Dichte und Dicke versteht. Die „Elektronenfärbung“ beruht auf einer Erhöhung der Dichte des Objektes an den „angefärbten“ Stellen. Diese Kontrasterhöhung erreicht man durch Einlagerung von Schwermetallen ins Objekt. Eine histochemische Kennzeichnung ist damit aber leider bisher noch nicht gegeben, da die Schwermetalle Affinität zu verschiedenen chemischen Stoffklassen haben (GROSS 1950).

Unser Material wurde teils mit Formalin, teils mit 1%iger Osmiumsäure fixiert, sofern es nicht unfixiert untersucht wurde.

Eine Zuordnung der elastischen Elemente zum übrigen Bindegewebe wurde mit Hilfe der Bindegewebsversilberung nach GÖMÖR angestrebt.

Da die Elasticafärbung nach WEIGERT in der Histologie zur elektriven Darstellung elastischen Gewebes benutzt wird, verwendeten wir diese Methode ebenfalls.

Zur Reindarstellung des Elastins für analytische Zwecke wird häufig das Gewebe in einer Harnstofflösung gekocht. So vorbehandelte Fasern haben wir ebenfalls untersucht. Auch die in der Histologie angewendete Methode der Maceration des elastischen Gewebes wurde von uns elektronenmikroskopisch geprüft. Wir macerierten zu diesem Zweck einen Teil unseres Materials 4 Wochen bei 37° in Wasser.

Zur Untersuchung im Elektronenmikroskop wurde das Material auf die üblichen befilmten Objektblenden aufgetrocknet. Die beim Trocknen auftretende Schrumpfung ließe sich durch Gefriertrocknung vermeiden. Leider stand uns ein entsprechender Apparat nicht zur Verfügung.

Einige Präparate wurden mit Wolframoxyd schräg bedampft¹. Die Aufnahmen erfolgten im *Siemens-Übermikroskop* Typ 100 b bei einer Strahlspannung von 80 kV.

Histologische Kontrollen wurden außer mit der Weigert-Färbung auch mit 0,02%iger Toluidinblaulösung gefärbt, um das chromotrope Gewebe zu beurteilen.

Befunde.

Färbt man einen Querschnitt durch die Aortenmedia mit Resorcin-Fuchsins oder auch mit Orcein, dann sind bekanntlich die quergetroffenen gefensterten Membranen elektiv dargestellt. Das Gewebe zwischen den Membranen, das man als Zwischengewebe bezeichnet, färbt sich je nach der Differenzierung nur ganz schwach oder überhaupt nicht. Nach v. MÖLLENDORFF und DÖRLE (1923) ist der Ausfall der Elasticafärbung im wesentlichen von der *Dichte* des Gewebes abhängig, von einer besonderen Affinität des Resorcin-Fuchsins oder des Orceins kann danach nicht die Rede sein. Andere Farbstoffe, die chemisch weder mit Resorcin-Fuchsins noch mit Orcein verwandt sind, geben den gleichen Effekt, sofern sie nur den gleichen Dispersitätsgrad besitzen. Das elastische Gewebe färbt sich also infolge seiner hohen Dichte. Die Entfärbung des Gewebes zwischen den elastischen Membranen der Aortenmedia bei der Differenzierung der Färbung ist so zu erklären, daß dies Gewebe den Farbstoff infolge seiner geringeren Dichte nicht festhalten kann. Dieser histologische Befund ist für unsere elektronen-mikroskopischen Untersuchungen an der Aortenmedia von Bedeutung. Wir haben es hier mit einem Gewebe zu tun, dessen beide Bestandteile sehr unterschiedlich dicht sind. Daher werden wir uns im elektronen-mikroskopischen Schnittbild nur jeweils auf die Darstellung einer Gewebskomponente beschränken müssen. Entweder stellt man die Zwischensubstanz dar, dann werden die elastischen Elemente so dicht

¹ Für die technische Durchführung der Bedampfung danken wir Herrn BERGANSKY.

sein, daß sie im Bilde schwarz erscheinen; oder man versucht, die elastischen Membranen mit Elektronen zu durchstrahlen und optisch „aufzulösen“. Dann muß man aber so dünn schneiden, daß der Zusammenhang der Zwischensubstanz unter Umständen verlorengeht. Die optimale Schnittdicke wird also für die einzelnen Gewebskomponenten verschieden sein.

Diese Tatsache wird in Abb. 1 deutlich, die einen Schnitt durch eine unfixierte Aortenmedia zeigt. Die Schnittdicke beträgt etwa $0,1 \mu$.

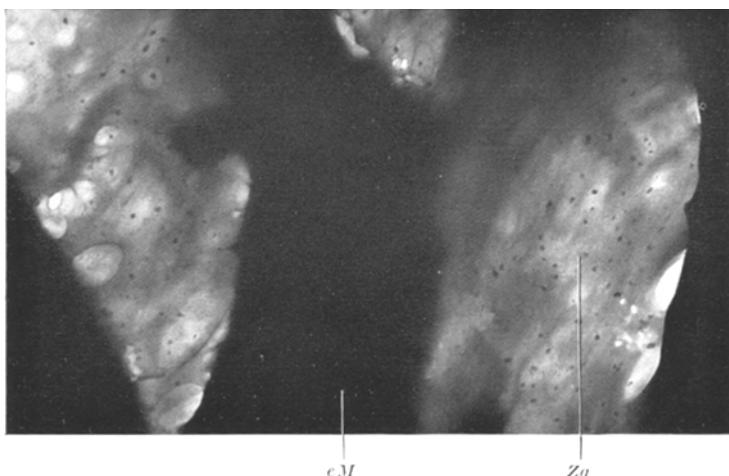


Abb. 1. Schnitt durch die unfixierte Aortenmedia eines 2 Monate alten Säuglings. Elastische Membranen schwarz. 10000:1. eM Elastische Membran, Zg Zwischengewebe.

Bei dieser Schnittdicke bleibt der Zusammenhalt der Zwischensubstanz einigermaßen erhalten. Die undurchstrahlbaren, schwarzen Gebilde sind quergetroffene elastische Membranen, wie man sich durch lichtmikroskopische Betrachtung der beschickten Objektblenden leicht überzeugen kann. Irgendeine Struktur ist in diesen Membranen infolge ihrer hohen Dichte nicht zu erkennen. Die Zwischensubstanz ist leidlich durchstrahlbar. Sie macht einen wolkigen Eindruck, der durch eine erhebliche Menge amorpher Substanz hervorgerufen wird. Nur an einigen Stellen kann man Fibrillen undeutlich erkennen. Von einer periodischen Querstreifung dieser Fibrillen ist nichts zu sehen. Kleine schatten-dichtere Teilchen sind in die Zwischensubstanz wie eingesprengelt. Vielleicht handelt es sich hier um Einlagerungen von Kalkstaub, der ja auch normalerweise in der Zwischensubstanz vorkommt, wie HINTZSCHE (1939) durch Veraschungsversuche nachgewiesen hat.

Das Gewebe zwischen den Membranen besitzt die Eigenschaft, sich mit Toluidinblau und ähnlichen Farbstoffen metachromatisch anzu-

färben. Diesen Befund erhab bereits v. EBNER (1870). TRETJAKOFF (1916) vergleicht das Zwischengewebe der Aorta mit dem von ihm beschriebenen „chondroiden Gewebe“ des Herzens. SCHULTZ (1923) weist ebenfalls auf die Metachromasie des Zwischengewebes hin und meint, daß sie durch Chondroitinschwefelsäure bedingt sei, die zum Aufbau des elastischen Gewebes benötigt würde. Auch SSOLOWJEW (1923, 1924) beschreibt die chromotrope Substanz im Zwischengewebe der normalen, nicht pathologisch veränderten Aorta und betont die topographischen Beziehungen zwischen chromotroper Substanz und elastischen Elementen. Er vermutet, daß die chromotrope Substanz an der Neubildung elastischer Fasern beteiligt ist. Auch vergleicht er die Aortenwand mit Knorpel und Cornea, die ebenfalls starke Metachromasie zeigen. Nach LISON (1935) geben nur hochpolymere Polysaccharide, die mit Schwefelsäure verestert sind, eine Metachromasie. Mit dem Grade ihrer Veresterung steigt die Metachromasie (HOLMGREN 1940). Alle bradytropen Gewebe enthalten solche Polysaccharide in relativ großer Menge, auch die Aortenwand. Von diesen Polysacchariden, die ein wesentlicher Bestandteil der Kittsubstanzen sind, sind zwei in ihrer Konstitution aufgeklärt; die *Chondroitinschwefelsäure*, deren Grundmolekül aus einem Molekül Acetylgalaktosamin und einem Molekül Glucuronsäure zusammengesetzt ist, und die *Hyaluronsäure* (MEYER 1947), die aus Acetylglucosamin und Glucuronsäure besteht. Ob noch andere Polysaccharide in den Kittsubstanzen vorkommen, ist bislang nicht bekannt, aber wahrscheinlich (GROSS 1950). Die hochpolymeren Polysaccharide liegen an Eiweiß gebunden im Gewebe vor und spielen unter anderem eine Rolle für den Wasserhaushalt des Gewebes. In Geweben, die sich stark metachromatisch färben, also einen relativ hohen Gehalt an Glykoproteiden aufweisen, müßten diese im Elektronenmikroskop morphologisch faßbar sein. In der Histologie ist das nicht gut möglich, da die Kittsubstanzmenge im Verhältnis zu den geformten Bestandteilen zu klein ist. Im Elektronenmikroskop fällt bei bradytropen Geweben wie der Cornea (SCHWARZ 1952) und dem Knorpel (SCHWARZ 1952) eine relativ große Menge amorpher Substanz auf, die die Fibrillen umgibt und verbindet. Teilweise werden die Fibrillen durch diese Substanz direkt maskiert. Hier handelt es sich um die Kittsubstanz. Baut man die in der Kittsubstanz enthaltenen Polysaccharide fermentativ — mit Hyaluronidase — ab, dann verschwindet der größte Teil der Kittsubstanz, während die Fibrillen unverändert bleiben.

Auch in der Zwischensubstanz der Aorta findet sich reichlich amorphe Substanz, die die Fibrillen maskiert (Abb. 1). Diese Substanz bedingt auch die starke Metachromasie des Aortenzwischengewebes. Es handelt sich also auch hier um hochpolymere Polysaccharide, die, nach der Stärke der Metachromasie zu urteilen, relativ hoch verestert sein dürften.

Die Metachromasie des Zwischengewebes geht verloren, wenn man die Gefrierschnitte nur wenige Stunden in physiologischer Kochsalzlösung oder in Wasser bei Zimmertemperatur stehen läßt. Dabei quellen die Schnitte stark. Offenbar geht also ein großer Teil der Glykoproteide in Lösung. Dies steht in einem gewissen Gegensatz zum Verhalten der Kittsubstanzen bei Knorpel und Cornea, die weit weniger empfindlich gegen Wasser sind.

Das Schnittbild einer Aortenmedia, die 48 Std bei 37° in physiologischer Kochsalzlösung gelegen hat, läßt eine deutliche Abnahme der

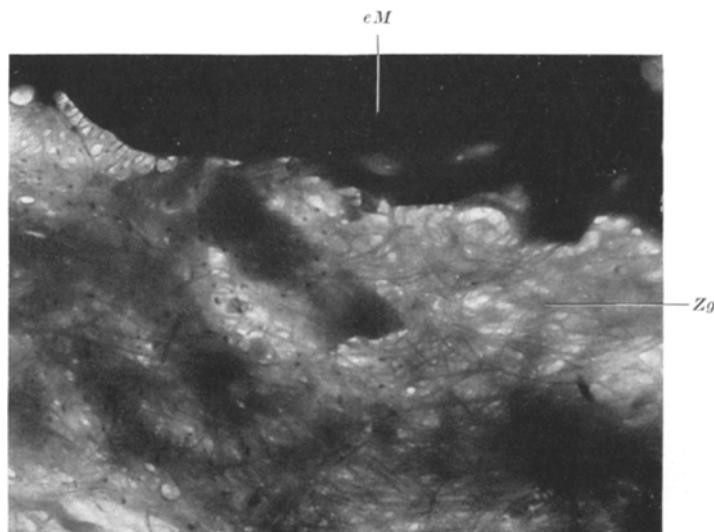


Abb. 2. Schnitt durch die Aortenmedia eines 45jährigen Mannes. 48 Std bei 37° in physiologischer Kochsalzlösung, unfixiert. 10800:1.
eM Elastische Membran, Zg Zwischengewebe.

amorphen Substanz erkennen (Abb. 2). Die in der Zwischensubstanz vorhandenen Fibrillen werden gewissermaßen demaskiert und sind nun gut zu sehen. Auch ihre periodische Querstreifung ist an einigen Stellen wahrnehmbar. Die Fibrillen sind relativ dünn und die Schwankungsbreite der Fibrillendicken ist gering. Dies und die große Menge der Kittsubstanz sprechen dafür, daß es sich um ein undifferenziertes Gewebe handelt, das im submikroskopischen Bau Ähnlichkeit mit embryonalem Gewebe besitzt (SCHWARZ 1952). Die elastischen Elemente haben durch die Behandlung mit Kochsalzlösung nicht merklich an Dichte verloren, sie sind nach wie vor undurchstrahlbar.

Zur Klärung der Struktur der *elastischen Fasern* sind nun theoretisch zwei Wege möglich. Einmal könnte man dünnerne Schnitte herstellen. Dies Vorgehen stößt aber auf erhebliche technische Schwierigkeiten, da

bei dünneren Schnitten die Kontinuität des Gewebes leicht verloren geht. Außerdem kann man praktisch die Schnittdicke von $0,1 \mu$ nur wenig oder überhaupt nicht unterschreiten. Die andere Möglichkeit einer Darstellung der Struktur des elastischen Gewebes liegt darin, daß man durch *Fermente* bestimmte Komponenten des Gewebes abbaut und damit seine Dichte verringert. Diesen zweiten Weg haben wir beschritten. Es hat sich nämlich gezeigt, daß *Elastase* mehr oder weniger vollständig die Kittsubstanz des elastischen Gewebes abbaut. Abb. 3 zeigt einen Schnitt, der auf der elektronenmikroskopischen Objekt-

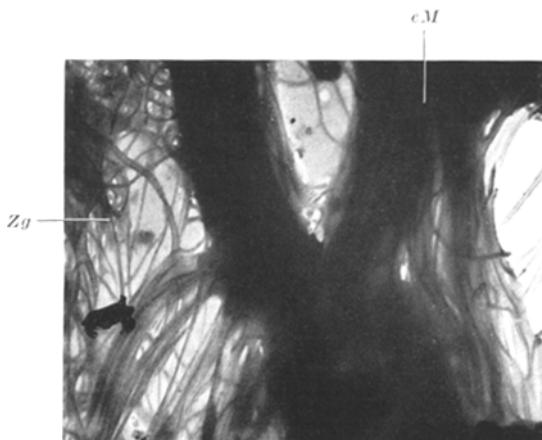


Abb. 3. Schnitt durch die unfixierte Aortenmedia einer 31jährigen Frau. Der Schnitt wurde 10 Std bei 37°C mit Elastase behandelt. Man erkennt den fibrillären Aufbau der elastischen Membranen. 10800:1. eM Elastische Membran, Zg Zwischengewebe.

blende nach dem Herauslösen des Cremolans 10 Std bei 37° und $\text{pH } 7$ mit Elastase behandelt worden ist. Die vorher völlig undurchstrahlbaren elastischen Fasern sind bedeutend heller geworden. Innerhalb der elastischen Fasern erkennt man nun Faserzüge von Fibrillen. Diese Fibrillen sind ebenfalls periodisch quergestreift, relativ dünn und alle gleichmäßig in ihrer Dicke. Damit ist der von DETTMER (1952) an den elastischen Fasern im Flügelband der Taube erhobene Befund an den elastischen Elementen der Aorta bestätigt. Man kann also weder von amorphen elastischen Fasern noch von einer „echten“ Verzweigung sprechen. Vielmehr besitzen auch die elastischen Fasern wie alle anderen Bindegewebfasern ein fibrilläres Stroma, das von Kittsubstanz zusammengehalten wird. Die morphologische Sonderstellung des „Elastins“ wird lediglich durch die Menge und besondere Beschaffenheit der elastischen Kittsubstanz vorgetäuscht. Im *Prinzip* des submikroskopischen Aufbaus ist kein Unterschied zwischen elastischem Gewebe und dem übrigen Bindegewebe.

Daß es sich bei den untersuchten Fasern wirklich um Querschnitte durch die elastischen Membranen handelt, ist durch mikroskopische Kontrolle der beschickten Objektblenden vor und nach der Behandlung mit Elastase zu sichern.

Wenn man eine Reihe von Schnittbildern auswertet, die mit Elastase aufgehellte elastische Fasern zeigen, dann ergibt sich, daß die Fibrillen innerhalb der elastischen Fasern den Fibrillen des chromotropen Zwischengewebes gleichen. Sowohl ihre Dicke als auch die geringe Schwankungsbreite der Fibrillendicken stimmen mit den entsprechenden Werten der Fibrillen des Zwischengewebes überein. Auch sieht man einzelne Fibrillen sich aus den elastischen Fasern abzweigen und in die Zwischensubstanz eintreten, wo sie an der Bildung des locker gefügten Raumnetzes beteiligt sind. Man kann also von einer Kontinuität des fibrillären Grundgerüstes der gesamten Aortenmedia sprechen, das fibrilläre Stroma der elastischen Fasern hebt sich lediglich als gerichteter Faserzug aus dem Fibrillenraumnetz der Zwischensubstanz heraus. Die Unterschiede zwischen elastischen Membranen und Zwischengewebe werden im wesentlichen durch die Unterschiede der Kittsubstanzen beider Gewebe bedingt.

Behandelt man einen histologischen Schnitt durch die Media der Aorta mit Elastase und anschließend mit Weigert-Farbstoff, dann stellt man fest, daß die elastischen Fasern sich nicht mehr färben¹. Da Elastase die elastische Kittsubstanz entfernt, liegt es nahe, daß das Resorcinfuchsin in diese eingelagert wird. Wir haben versucht, dies elektronenmikroskopisch nachzuweisen. WOLPERS (1944) beschrieb nach Anwendung der Elasticafärbung Flocken des Farbstoffes in den von ihm elektronenoptisch dargestellten elastischen Fasern. Wir färbten kurz beschalltes Material in Zentrifugenröhren mit Weigert-Farbstoff und differenzierten anschließend in salzaurem Alkohol. Im Parallelversuch wurde Kollagen ebenso behandelt. Sobald das Kollagen entfärbt war, brachen wir die Differenzierung ab, wuschen in Wasser und trockneten das Material auf die Objektblenden auf. Es zeigte sich folgendes Bild (Abb. 4): Durch die Beschallung ist das Objekt soweit zerzupft, daß die elastischen Fasern nur noch dünn sind und mitsamt der Kittsubstanz durchstrahlt werden können. Die Fibrillen sind dabei relativ kontrastarm, sie liegen sozusagen als „Negative“ in einer amorphen, fast schwarzen Kittsubstanz. Da diese bei unbehandelten elastischen Fasern nach Beschallung in keinem Falle einen derartigen Kontrast ergibt (Abb. 5), muß man die Kontrasterhöhung auf eine Einlagerung des Elastica-

¹ Anmerkung bei der Korrektur. Diese Feststellung haben BALO und BANGA ebenfalls gemacht in einer Arbeit über „Die Zerstörung der elastischen Fasern der Gefäßwand“ [Schweiz. Z. Pathol. u. Bakteriol. 12, 350 (1949)], die uns erst jetzt bekannt wurde.

farbstoffes in die Kittsubstanz zurückführen. Diese Einlagerung muß allerdings in einer ganz erheblichen Menge erfolgt sein, denn die Dichte

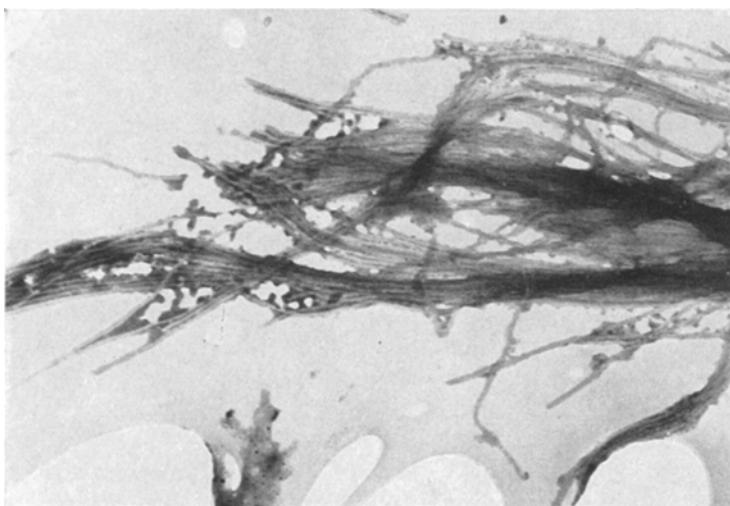


Abb. 4. Elastisches Gewebe aus der Media der Aorta. Formolfixiert, 3 min beschallt, nach WEIGERT gefärbt. 13500:1.

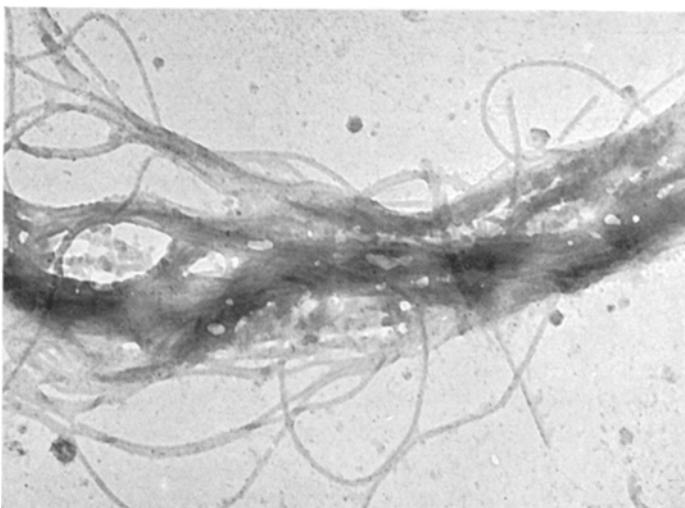


Abb. 5. Elastisches Gewebe aus der Aortenmedia. Formolfixiert, 3 min beschallt. 15000:1.

der Kittsubstanz ist wesentlich erhöht. Farbstoffflocken konnten wir nicht feststellen, die Kontrasterhöhung ist homogen. Diese homogene Einlagerung des Farbstoffs entspricht auch der von v. MÖLLENDORFF und DÖRLE ausgeführten Theorie.

Nach diesen Befunden ist es möglich, die Elasticafärbung auch in der Histologie mit der Einwirkung von Elastase zu verbinden und damit das elastische Gewebe nicht nur elektiv, sondern *spezifisch* zu färben. Man müßte also vor der Elasticafärbung jeweils einen Kontrollschnitt mit Elastase behandeln. Wenn die Strukturen sich nach Einwirkung der Elastase nicht mehr mit Weigert-Farbstoff darstellen lassen, handelt es sich um elastische Elemente. Färbt sich aber auch der Kontrollschnitt, den man mit Elastase behandelt hat, dann dürfte man es mit Strukturen zu tun haben, die wohl die gleiche Dichte wie elastische Fasern haben, nicht aber deren Konstitution.

Die eingehende Beurteilung der Fibrillen des elastischen Gewebes ist im Schnittbild nicht möglich. Nachdem wir die Topographie des Gewebes und den stufenweisen Abbau der Kittsubstanzen dargestellt haben, gehen wir nun zur Untersuchung beschallten Materials über. Hier sind die Fibrillen mehr oder weniger isoliert (je nach der Dauer der Beschallung und der Vorbehandlung des Materials) und werden damit einer näheren Betrachtung zugänglich.

Untersucht man Material, das unfixiert oder nach Fixierung in Formol beschallt worden ist, dann ergibt sich, daß die elastische Kittsubstanz ziemlich resistent gegen Schalleinwirkung ist. Während sich kollagenes Gewebe schon nach 2—3 min Beschallungsdauer in Einzelfibrillen aufgelöst hat, findet man beim elastischen Gewebe auch nach längerer Beschallung noch Fasern, in denen die Fibrillen durch Kittsubstanz festgehalten werden (Abb. 5). Auch sieht man meist noch Klumpen undurchstrahlbaren elastischen Gewebes. Daneben sind aber immer auch einzeln liegende Fibrillen zu erkennen, die aus dem Faserverband herausgezupft worden sind. Sie lassen sich aber nur schwer beurteilen, da sie von einem Mantel von Kittsubstanz umgeben sind. Durch verschiedene lange Beschallung kann man einen stufenweisen Abbau der elastischen Elemente ganz gut herbeiführen. Zuerst werden die Membranen in ziemlich dichte elastische Fasern zerlegt, die noch kaum durchstrahlbar sind. Diese Fasern werden dann weiter aufgesplittet, schließlich werden sie so dünn, daß man in ihnen die Fibrillen erkennen kann. Bei noch längerer Beschallung zerfallen die Fasern endlich in Fibrillen, die von einem Kittsubstanzmantel eingehüllt sind. Die den Fibrillen anhaftende Kittsubstanz kommt gut zur Darstellung, wenn man die Metallbedampfungsmethode verwendet. Dabei werden die beschickten Objektblenden im Vakuum mit Metalldampf im spitzen Winkel bedampft. Man gebraucht dazu Schwermetalloxyde und ähnliche Verbindungen. Der Dampfstrahl schwärzt das Objekt an den ihm zugewandten Stellen, während die „Schattenseite“ des Objektes frei von Metallniederschlag bleibt. Verwendet man nun das photographische Negativ als Abbildung, dann entsteht der Eindruck, als ob ein Licht-

strahl das Objekt von der Seite trifft. Die Oberfläche des Präparates wird auf diese Weise sehr plastisch dargestellt, Innenstrukturen lassen sich naturgemäß nicht beurteilen. Abb. 6 zeigt eine elastische Faser

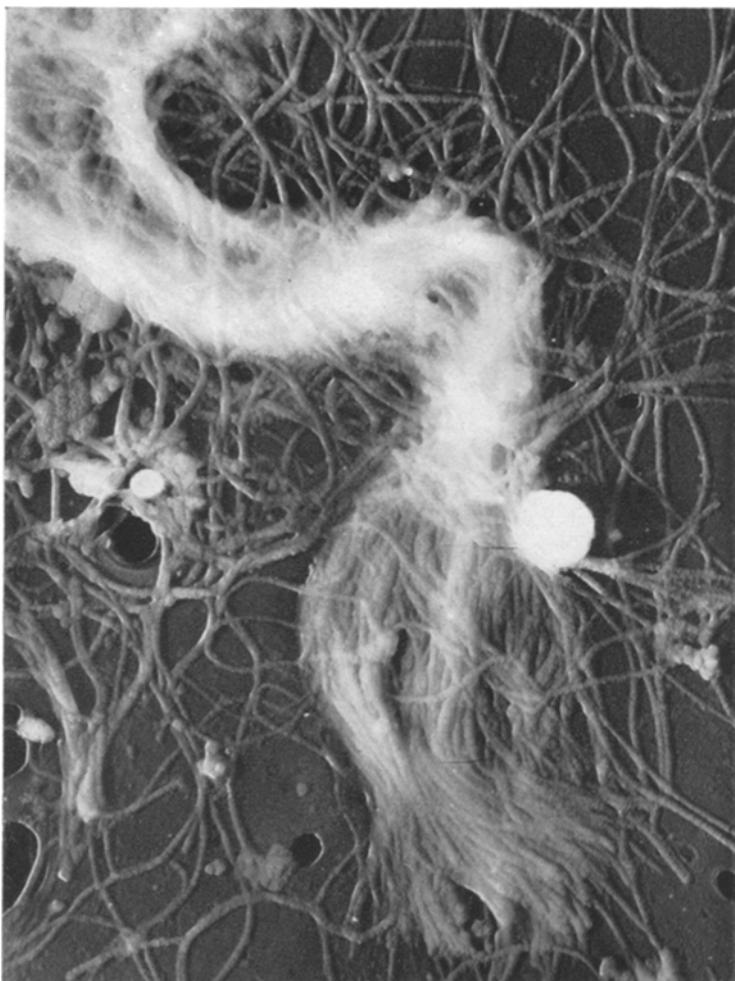


Abb. 6. Elastische Faser aus der Aortenmedia. Formolfixiert, 3 min beschallt, mit Wolframoxyd schräg bedampft. 16200:1.

nach Bedämpfung. Schon der geschlängelte Verlauf ist kennzeichnend für elastische Elemente. Kollagen trocknet viel „starrer“ auf der Objektblende auf. An einem Ende der Faser ist der Verband etwas gelockert, so daß man den Aufbau der Faser aus Fibrillen erkennen kann. Diese Fibrillen werden durch eine reichliche Menge Kittsubstanz

zusammengehalten, dadurch ist der fibrilläre Aufbau an den dichteren Stellen der Faser kaum zu erkennen. Aber nicht nur die Fibrillen innerhalb der Faser sind von der Kittsubstanz eingehüllt, auch die neben



Abb. 7. Fibrillen des elastischen Gewebes. 3 min beschallt, formolfixiert, mit Wolframoxyd schräg bedampft. 21600:1.

der Faser isoliert liegenden Fibrillen weisen einen Kittsubstanzmantel auf. Diese Tatsache wird in Abb. 7 deutlich, die elastische Fibrillen bei stärkerer Vergrößerung zeigt. Die Fibrillenoberfläche ist völlig unregelmäßig. Kittsubstanz, die hier einen etwas körnigen Eindruck macht,

umgibt die Fibrillen vollständig. Auch neben den Fibrillen ist Kittsubstanz frei aufgetrocknet. Durch den Kittsubstanzmantel werden Fibrillendicken vorgetäuscht, die den Fibrillen des elastischen Gewebes nicht zukommen. Die Messung der Fibrillendicke ist erst möglich, wenn man die Fibrillen von der umgebenden Kittsubstanz befreit. Kriterium für die von Kittsubstanz befreite Fibrille ist das Hervortreten der allen Bindegewebsfibrillen eigenen, charakteristischen periodischen Querstreifung, die in Abb. 7 nicht zu sehen ist.

Um die Fibrillen nackt zu erhalten, läßt man zweckmäßig auf das beschallte Material *Elastase* einwirken. Etwa vorhandene Reste an Kittsubstanz werden nach Behandlung mit Elastase durch nochmaliges kurzes Beschallen und anschließendes Auswaschen des Materials leicht entfernt. Isolierte Fibrillen, die auf diese Weise gewonnen sind, zeigt die Abb. 8. Ihre Dicke schwankt zwischen 25 und 60 m μ , der häufigste Wert liegt bei etwa 35 m μ . Die periodische Querstreifung dieser Fibrillen tritt klar hervor. Schattendichte D-Teile wechseln mit helleren H-Teilen. Diese Bezeichnungen sind von WOLPERS für die beiden Hauptabschnitte der Kollagenperiode geprägt worden. Man kann sie für alle Bindegewebsfibrillen gebrauchen, auch für die Fibrillen des elastischen Gewebes. Die Länge einer Periode entspricht etwa der einer Kollagenperiode, die mit einem Mittelwert von 65 m μ angegeben wird. Dieser Wert stimmt mit dem aus Röntgendiagrammen ermittelten Wert der Kollagenperiode überein. Die Länge der Perioden schwankt allerdings bei den Fibrillen unseres Objektes mehr als beim Kollagen. Viele Fibrillen machen den Eindruck, als ob sie gedehnt sind, und zwar auch ohne daß in der Nähe ein Riß im Trägerfilm zu sehen ist, der die Dehnung verursacht haben könnte. Am Rande solcher Folienrisse erkennt man maximal gedehnte Fibrillen. Dabei ist der H-Teil mehr gedehnt als der D-Teil der Fibrillen, aber auch dieser ist wesentlich länger geworden. Über die Dehnung der Fibrillen des elastischen Gewebes wird an anderer Stelle ausführlich berichtet werden. Hier sei zunächst nur festgestellt, daß die Fibrillen des elastischen Gewebes in diesem Punkte offenbar ein vom Kollagen abweichendes Verhalten zeigen.

Auch der häufigste Wert der Fibrillendicke und ihre geringe Schwankungsbreite bei den Fibrillen des elastischen Gewebes weichen von den Werten des „reifen“ Kollagens erheblich ab. So findet man beim Sehnenkollagen oder beim Kollagen der Sklera des Erwachsenen nicht selten Werte bis zu 250 m μ , die häufigsten Werte liegen bei diesen Objekten immer über 100 m μ . Im elastischen Gewebe findet man dagegen keine Fibrillen, die eine derartige Dicke aufweisen. Ein Vergleich der Fibrillen dieses Objektes ist aber möglich mit den Fibrillen anderer *bradytropher Gewebe*, wie z. B. der Cornea oder des Knorpels. Die Fibrillendicken und deren Schwankungsbreite entsprechen bei den

letztgenannten Objekten denen der Fibrillen des elastischen Gewebes. Auch dort sind die Fibrillen von einem ausgeprägten Kittsubstanzmantel umgeben im Gegensatz zum „reifen“ Kollagen, bei dem man kaum Kittsubstanz findet.

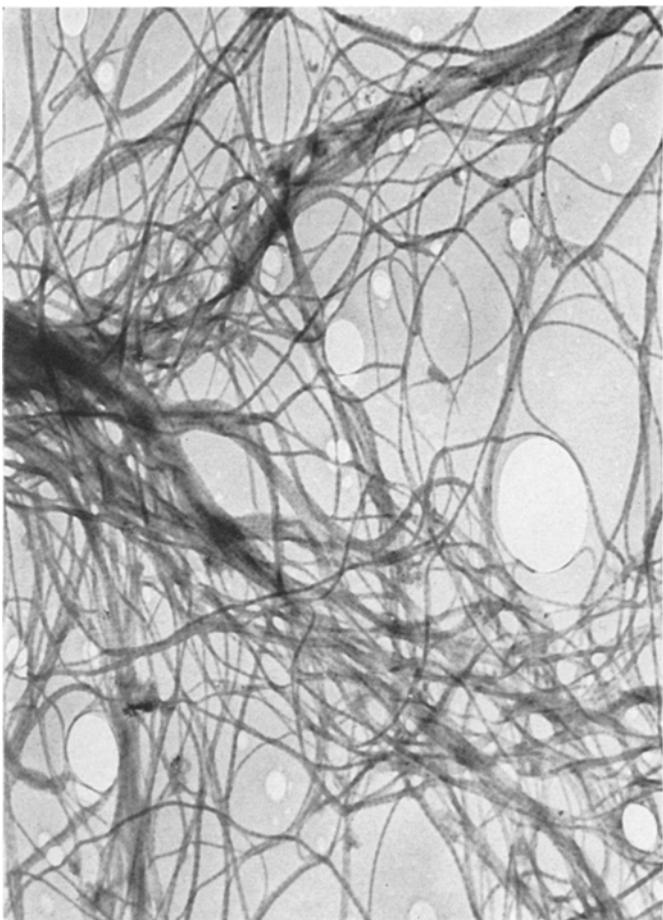


Abb. 8. Fibrillen des elastischen Gewebes. Unfixiert, 3 min beschallt, 48 Std bei 37° mit Elastase behandelt. Die Kittsubstanz ist verschwunden. 15000:1.

In Abb. 9 sind Fibrillen zu sehen, die durch Beschallung einer in Wasser macerierten Aortenmedia isoliert worden sind. Durch die Maceration geht der weitaus größte Teil der Kittsubstanz des elastischen Gewebes verloren. Man erhält schon nach kurzer Einwirkung des hochfrequenten Schalles sehr saubere Fibrillen, im Gegensatz zum frischen Gewebe. Die Fibrillen der Abb. 9 sind nach der Beschallung

in 1%iger Osmiumsäure fixiert worden. Durch die Behandlung mit Osmiumsäure werden die D-Teile von Kollagenfibrillen kontrastreich dargestellt, eine Methode, die schon WOLPERS benutzte. Behandelt man aber frisches elastisches Gewebe mit Osmiumsäure, dann zeigt sich, daß auch und vor allen Dingen die elastische Kittsubstanz Affinität zu diesem Fixierungsmittel besitzt. Sie lagert erhebliche Mengen Osmiumtetroxyd ein und wird dadurch noch dichter, als sie ohnehin schon ist. In einem solchen, mit Osmiumsäure behandelten Präparat

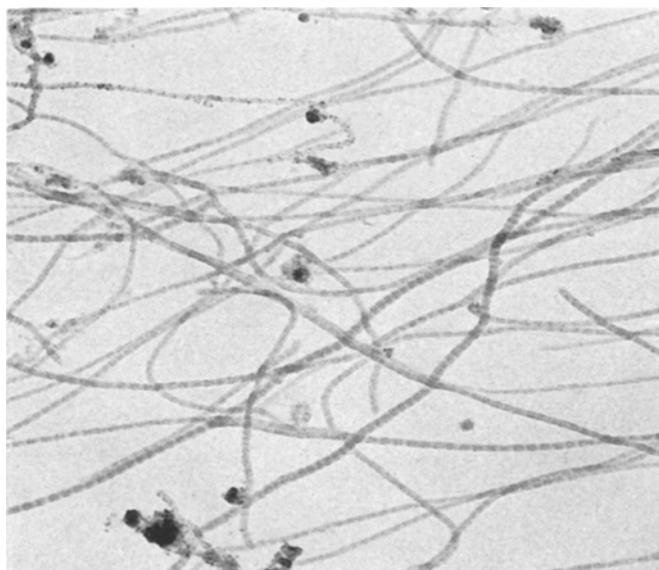


Abb. 9. Elastisches Gewebe nach 4 Wochen Maceration bei 37° in Wasser. Nach der Maceration 5 min beschalt und in 1%iger Osmiumsäure fixiert. 16200:1.

sind dann meist die Fibrillen innerhalb der Kittsubstanz nicht zu sehen. Manchmal treten sie sogar als „Negative“ undeutlich hervor. Zur Klärung der Struktur des elastischen Gewebes ist es also unzweckmäßig, *frisches* Gewebe mit Osmiumsäure zu fixieren. Wohl aber kann man Osmiumtetroxyd verwenden, wenn man die elastische Kittsubstanz vorher durch Elastase oder, wie hier, durch Maceration entfernt hat. Dann eignet sie sich zur Darstellung der Querstreifungsperiode der Fibrillen des elastischen Gewebes genau so gut wie für Kollagen. Hier und da kann man an osmiumfixierten Fibrillen des elastischen Gewebes auch eine Unterteilung des D-Teiles in zwei dunklere und einen in der Mitte liegenden helleren Abschnitt erkennen. Analog zum Kollagen wären die dunkleren Teile dann als δ -Scheiben und der hellere Streifen als γ -Stück (nach WOLPERS) zu bezeichnen. Die Kontrastunterschiede

dieser Abschnitte treten aber bei den Fibrillen des elastischen Gewebes bei weitem nicht so deutlich hervor, wie es beim Kollagen im allgemeinen der Fall ist. Überhaupt scheint der D-Teil weniger dicht zu sein als beim Kollagen. Vielleicht ist dieser Befund mit dem unterschiedlichen Verhalten beider Fibrillenarten bei mechanischen Anforderungen in Beziehung zu bringen.

Nachdem nun schon gewisse Unterschiede zwischen Kollagenfibrillen und Fibrillen des elastischen Gewebes beschrieben worden sind, erscheint es ratsam, eine Methode anzuwenden, die bei der Differenzierung von Bindegewebsfibrillen schon gute Dienste geleistet hat. Dies ist die Bindegewebsversilberung nach GÖMÖRI. Aus der Histologie ist bekannt, daß mit dieser Methode kollagene und argyrophile Fasern different dargestellt werden können. Kollagen färbt sich dabei rotbraun, argyrophile Fasern erscheinen schwarz. Der Versuch, diese Versilberung auch im Elektronenbild zur Differenzierung von Kollagen und Retikulin heranzuziehen, ergab ein überraschendes Resultat. Es zeigte sich nämlich, daß sich Kollagenfibrillen nicht nur quantitativ, sondern vor allem *qualitativ* anders versilbern als Reticulumfibrillen. Beide haben einen verschiedenen *Versilberungsmodus*. Kollagenfibrillen lagern das Silber feinkörnig in das Innere ihrer D-Teile ein, während ihre Oberfläche und die H-Teile fast frei von Silberpartikeln bleiben. Dadurch entsteht eine außerordentlich kontrastreiche Querstreifungsperiode (DETTMER, NECKEL und RUSKA). Das Retikulin lagert überhaupt kein Silber ein, die Silberteilchen setzen sich vielmehr an der Fibrillenoberfläche ab. Meist ist diese Ablagerung völlig ungeordnet, manchmal ist angedeutet eine gewisse Periodizität der Oberflächenversilberung erkennbar, die aber nicht mit der Versilberung der Kollagenfibrille verwechselt werden kann. Von der eigentlichen Querstreifung der Reticulumfibrillen ist nichts mehr zu sehen (v. HERRATH und DETTMER). Durch diesen Unterschied in der Versilberung ist die Möglichkeit einer Differenzierung von Bindegewebsfibrillen im *Elektronenbild* gegeben, die bislang nicht oder nur schwer möglich war. Da der Ausfall der Versilberung an vielen Objekten geprüft wurde, wobei sich nie eine Abweichung vom oben beschriebenen Bild ergab, darf diese Methode als gesichert angesehen werden. Über die Faktoren, die den Unterschied im Versilberungsmodus bedingen, können wir noch nichts aussagen. Auch im Elektronenbild ist also die Versilberung genau so empirisch zu werten wie im histologischen Präparat.

Die Abb. 10 und 11 stellen elastische Fasern und Fibrillen nach Versilberung dar. Abb. 10 gibt eine Übersicht über eine elastische Faser. Sie ist relativ dünn und zweigt sich am Ende in eine Reihe von Fibrillen auf. Innerhalb der Faser wird durch die Anordnung der Silberteilchen eine gewisse longitudinale Streifung hervorgerufen, die

den Verlauf der einzelnen Fibrillen kennzeichnet. Auch hier fällt wieder der geschlängelte Verlauf der Faser auf. Abb. 11 zeigt einige versilberte elastische Fibrillen bei stärkerer Vergrößerung. Man sieht, wie die Silberpartikel der Fibrillenoberfläche aufsitzen. Eine periodische Ordnung der oberflächlich sitzenden Silberteilchen ist nur an wenigen

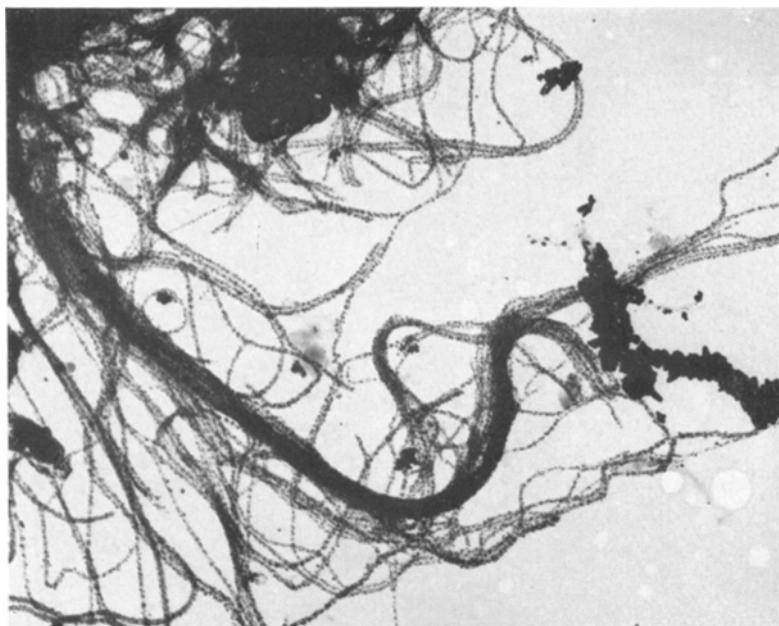


Abb. 10. Elastische Faser und Fibrillen, formolfixiert, 10 min beschallt und nach GÖMÖRI versilbert. 16 200:1.

Stellen angedeutet vorhanden. An einzelnen Stellen sieht man Fibrillen durch Kittsubstanz hindurchlaufen, die praktisch frei von Silberkörnern ist. Das Silber lagert sich an der Phasengrenze zwischen Fibrillen und Kittsubstanz ab, wie das für das elastische Flügelband der Taube schon beschrieben worden ist (DETTMER 1952). Die „genuine“ periodische Querstreifung der Fibrillen ist nicht mehr zu erkennen, sie geht offenbar bei der Versilberung verloren. Neben den elastischen Elementen sind in Abb. 11 einige versilberte Kollagenfibrillen aus einer menschlichen Sehne zum Vergleich dargestellt. Sie zeigen ausgeprägte Innenversilberung mit Hervorhebung ihrer „genuine“ Querstreifung durch die Silberpartikel. Der Unterschied zwischen Kollagen und elastischem Gewebe kommt bei Anwendung der Silbermethode klar zum Ausdruck.

Man könnte vielleicht annehmen, daß die Innenversilberung der elastischen Fibrillen durch die Anwesenheit der Kittsubstanz verhindert

wird. Das ist aber nicht der Fall, denn auch von Kittsubstanz befreite Fibrillen ändern ihren Versilberungsmodus nicht. Auch sie zeigen eine deutliche, wenn auch etwas schwächere Oberflächenversilberung. Übrigens sind die in Abb. 10 und 11 dargestellten Fibrillen

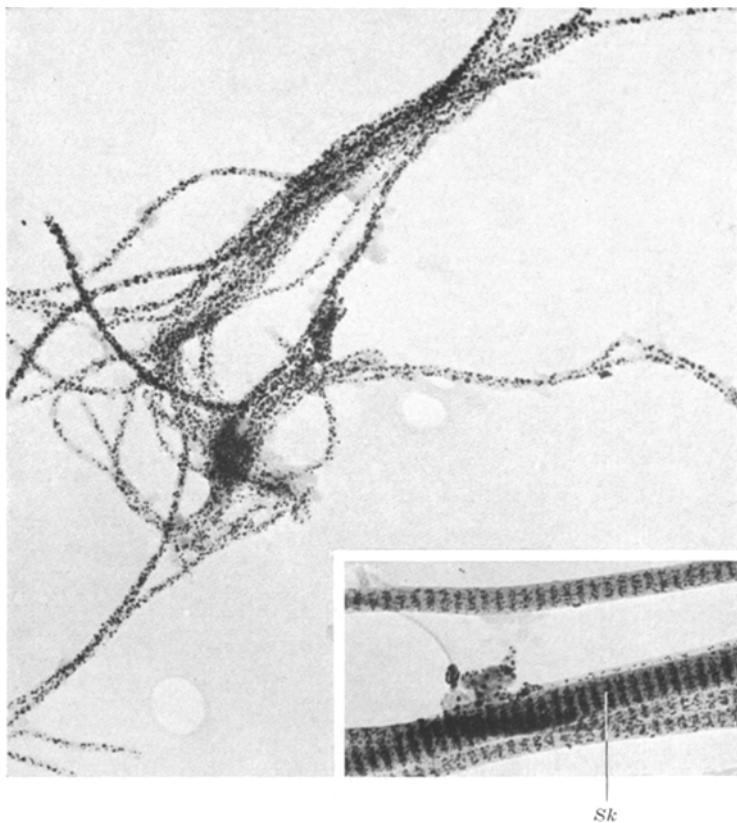


Abb. 11. Fibrillen des elastischen Gewebes der Aortenmedia, formolfixiert, 5 min beschallt und nach GÖMÖRI versilbert. Im Ausschnitt einige versilberte Kollagenfibrillen aus einer menschlichen Sehne. 21600:1. Sk Sehnenkollagen.

von ihrem Kittsubstanzmantel durch längere Beschallung vor der Ver Silberung weitgehend befreit worden.

Zur „Reindarstellung“ des Elastins für analytische Zwecke wird häufig das Gewebe in einer Harnstofflösung einige Tage auf dem Ölbad gekocht. Dabei soll alles Kollagen aufgelöst werden. So behandeltes Material haben wir nach kurzer Beschallung und anschließendem Waschen auf Objektblenden aufgetrocknet und mikroskopiert (Abb. 12). Es resultieren verzweigte Stränge, die keinerlei Struktur mehr erkennen lassen. Man hat den Eindruck, daß die elastischen Gewebselemente

„zusammengesintert“ sind, wobei die Struktur der Fibrillen verloren gegangen ist. Das elastische Gewebe ist gewissermaßen homogenisiert, und diese homogene Masse wird der Analyse unterworfen.

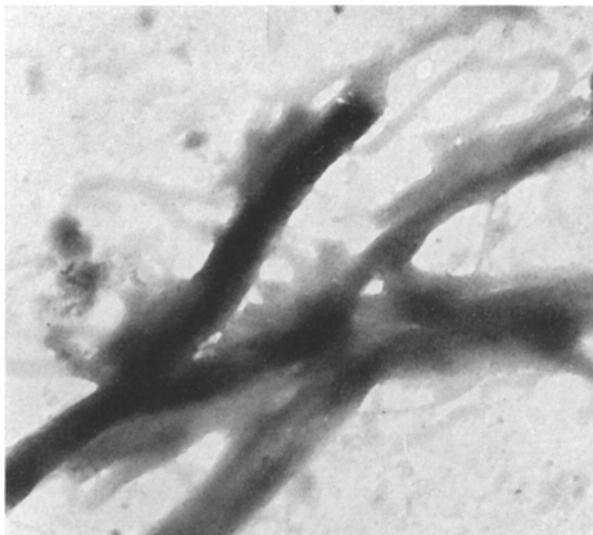


Abb. 12. Elastisches Gewebe der Aortenmedia, 3 Tage in einer 40%igen Harnstofflösung auf dem Ölbad gekocht. 15000:1.

Diskussion.

Aus den histologischen Befunden hat man geschlossen, daß die elastische Faser aus einem einheitlichen Stoff besteht, den man als *Elastin* bezeichnet hat. Man hat diesen Stoff nicht nur in seinen Eigenschaften, sondern auch in seinem Aufbau mit Gummi verglichen. Schon die geringe Doppelbrechung einer *ungedehnten* elastischen Faser spricht aber gegen diese Annahme. Nach unseren Befunden bestehen die elastischen Fasern aus zwei Komponenten, nämlich aus Fibrillen und Kittsubstanz. Damit haben wir in der elastischen Faser ein heterogenes System vor uns. Es erhebt sich nun die Frage, was man nach diesen Befunden unter Elastin zu verstehen hat. Da man unter Elastin doch offenbar eine chemisch homogene Substanz verstehen muß, scheidet von vornherein die Möglichkeit aus, die Gesamtheit beider Komponenten als Elastin zu bezeichnen. Diese Bezeichnung käme nur für *eine* Komponente in Frage, entweder für die Fibrillen oder für die Kittsubstanz. Unseres Erachtens können aber die Fibrillen nicht unter dem Begriff Elastin gefaßt werden, da sie nicht unbedingt für das elastische Gewebe spezifisch sind. Sie zeigen den gleichen Aufbau wie alle anderen Bindegewebsfibrillen. Man kann daher annehmen, daß

sie auch in ihrer chemischen Konstitution den übrigen Bindegewebsfibrillen ähneln. Damit ist natürlich nicht gesagt, daß sich alle Bindegewebsfibrillen in ihrer chemischen Zusammensetzung gleichen. Denn abgesehen von den verschiedenen physikalischen Eigenschaften der Fibrillen dürfte auch die umgebende Kittsubstanz für die stoffliche Zusammensetzung der Fibrillen nicht gleichgültig sein. Auch die Konstitution der Fibrillen des elastischen Gewebes könnte durch die elastische Kittsubstanz beeinflußt werden. Die Fibrillen des elastischen Gewebes als Kollagenfibrillen zu bezeichnen, halten wir nicht für angängig, denn sie verhalten sich trotz ihrer ähnlichen Struktur sowohl physikalisch als auch histologisch (Versilberung) völlig anders.

Wir möchten die Kittsubstanz für die *spezifische Komponente* des elastischen Gewebes halten, zumal alle bekannten Elasticafärbungen auf den besonderen Eigenschaften dieser Kittsubstanz beruhen. Daher scheint es uns auch ratsam, unter der Bezeichnung *Elastin* die elastische Kittsubstanz zu verstehen.

Für die Reindarstellung des Elastins gibt es zwei Möglichkeiten. Einmal kann man versuchen, die Struktur der Fibrillen zu zerstören und die Strukturelemente dieser Fibrillen vollständig aus dem elastischen Gewebe zu entfernen. Diesen Weg hat man beschritten, ohne sich über die Struktur des elastischen Gewebes im klaren zu sein. Es ist nämlich bekannt, daß kollagene Texturen durch langes Kochen in Harnstofflösung zerstört werden können (STEIN und MILLER 1938). Um das „Begleitkollagen“ des elastischen Gewebes zu entfernen, ist dieses Verfahren angewendet worden. Dabei hat man auch die Struktur der Fibrillen *innerhalb* der elastischen Fasern zerstört. Es scheint uns aber zweifelhaft, daß sämtliche Fibrillenbausteine dabei in Lösung gegangen sind; denn bei der besonders hohen Dichte der elastischen Kittsubstanz dürfte es kaum möglich sein, die Fibrilleneiweiße durch diese Kittsubstanz hindurch vollkommen in Lösung zu bringen. Daraus dürften sich auch die Differenzen der verschiedenen in der Literatur angegebenen Elastinanalysen ergeben. In diesem Zusammenhang hat HALL (1951) auf den „vagen“ Elastinbegriff hingewiesen.

Die zweite Möglichkeit einer Reindarstellung von Elastin ist das fermentative Herauslösen der Kittsubstanz durch *Elastase*. Als Rückstand bleiben bei dieser Methode die Fibrillen des elastischen Gewebes übrig, die man elektronenmikroskopisch erfassen und beurteilen kann. Dabei kann man sich von dem Fortgang des fermentativen Abbaus überzeugen. Das Filtrat wäre dann auf Elastin zu untersuchen. Fräulein Dr. NECKEL führt zur Zeit solche Untersuchungen durch, über die sie an anderer Stelle berichten wird.

Nach dieser allgemeinen Betrachtung des elastischen Gewebes wollen wir nun dazu übergehen, die speziellen Verhältnisse der Aortenmedia

zu erörtern. Hier sind die gefensterten Membranen aus Faserzügen von Fibrillen aufgebaut, die in einer reichlichen Menge elastischer Kittsubstanz eingebettet sind. Zum Teil verlassen die Fibrillen den Verband der betreffenden elastischen Membran und durchziehen das Gewebe zwischen den Membranen. In diesem Bereich sind aber die Fibrillen auch nicht nackt, sondern von einer Kittsubstanz maskiert, die sich von der elastischen Kittsubstanz unterscheidet. Dieser Unterschied kommt unter anderem im färberischen Verhalten zum Ausdruck. Während die elastische Kittsubstanz sich mit Weigert-Farbstoff anfärben läßt, kann man die Kittsubstanz zwischen den Membranen des elastischen Gewebes mit dieser Methode nicht darstellen. Dagegen zeigt sie eine *Chromotropie*. Wir haben hier die eigenartige Tatsache vor uns, daß dieselben Fibrillen einmal von elastischer, zum anderen von chromotroper Kittsubstanz umgeben sind. Die elastischen Membranen und das Zwischengewebe werden also durch ein in sich zusammenhängendes fibrilläres Stroma verbunden. Ein Teil der Fibrillen liegt in der Zwischensubstanz und bildet hier das Grundgerüst, die Hauptmasse ist jedoch an der Bildung der elastischen Membranen beteiligt. Damit ist auch die genetische Beziehung beider Gewebe gegeben, die schon SCHULTZ und SSOLOWJEW angenommen haben.

Die Zwischensubstanz der Aortenmedia läßt sich mit Cornea und Knorpel vergleichen. Allen diesen Geweben ist ein Stroma gemeinsam, das aus sehr dünnen Fibrillen besteht. Darüber hinaus haben auch die Kittsubstanzen dieser Gewebe ein gemeinsames Merkmal, nämlich ihre Chromotropie. Diese Chromotropie deutet auf einen hohen Gehalt an hochpolymeren Polysacchariden hin. Für die Cornea hat SCHWARZ (1952) nachgewiesen, daß der prinzipielle Aufbau der zwischenzelligen Substanz von den frühen embryonalen Entwicklungsstufen an gleichbleibt. Die Fibrillen bleiben während des gesamten Lebens sehr dünn, und die Menge der Kittsubstanz ist relativ groß. Aus diesen und anderen Befunden wurde geschlossen, daß das Corneagewebe zeitlebens einen gewissen embryonalen Status beibehält. Es liegt die Vermutung nahe, daß die Verhältnisse in Knorpel und Aortenmedia entsprechend sind. Dafür spricht auch die Tatsache, daß hochpolymere Polysaccharide dort auftreten, wo ein vermehrter glykolytischer Stoffwechsel vorhanden ist (ALTSCHULER und ANGEVINE 1951). Dies ist bekanntlich im embryonalen Gewebe der Fall. Man rechnet die drei genannten Gewebe zu den bradytropen Geweben, die unter diesem Gesichtspunkt an Interesse gewinnen. Die bradytropen Gewebe werden durch Diffusion ernährt, Blutgefäße fehlen normalerweise. Das Einsprossen von Blutgefäßen kann in allen drei Geweben aber unter „pathologischen“ Bedingungen erfolgen. Man könnte es als ein Zeichen dafür werten, daß sich die Stoffwechsellage des Gewebes geändert hat. Wir haben

Grund zu der Annahme, daß mit der Änderung des Stoffwechsels eine *Differenzierung* des Gewebes einhergeht. Die von SCHWARZ (1952) an Corneanarben erhobenen Befunde legen diese Vermutung nahe. Vielleicht ist es zweckmäßig, auch das Problem der Arteriosklerose in diesem Zusammenhang zu betrachten. Als Vorbedingung für die Untersuchung pathologischer Wandveränderungen der Aorta ist es allerdings zunächst notwendig, daß elektronenmikroskopische und chemische Untersuchungen von Aorten aller Lebensalter einschließlich des Greisenalters vorgenommen werden. Dabei müßte natürlich auch die Intima der Aorta berücksichtigt werden. In diesem Zusammenhang möchten wir auf einen Befund hinweisen, den wir an der Aorta eines Achtzigjährigen erhoben haben. Die elastische Kittsubstanz dieser Aorta konnte durch Elastase weit weniger abgebaut werden als die der von uns sonst untersuchten Aorten.

Bisher haben wir die *Zellen* in der Media der Aorta nicht in die Untersuchung mit einbezogen. Hierzu sind andere Methoden nötig, die zum Teil erst entwickelt werden müssen. Wieweit die Differenzierung der Intercellularsubstanz von übergeordnet wirkenden Fermenten und Hormonen ausgeht oder von den Zellen beeinflußt wird, können wir daher nicht sagen.

Zusammenfassung.

Der *Bulbusteil* der *Aortenmedia* von Kindern und Erwachsenen mittleren Lebensalters wurde elektronenmikroskopisch untersucht. Um die Topographie des Gewebes zu erhalten und Beziehungen zum histologischen Schnitt herzustellen, mußten *Dünnschnitte* angefertigt werden. Die Einbettung der Objekte erfolgte in einem wasserlöslichen Einbettungsmittel (*Cremolan*).

Unbehandelte Dünnschnitte lassen nur die dichten, undurchstrahlbaren elastischen Elemente in der wolkigen, helleren *Zwischensubstanz* erkennen, Struktureinzelheiten sind nicht wahrnehmbar. Behandelt man die Aortenmedia einige Stunden mit Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung, dann hellt sich die Zwischensubstanz weiter auf und es wird ein Raumnetz quergestreifter Bindegewebsfibrillen sichtbar. Die aus der Histologie bekannte *Metachromasie* des Zwischengewebes bei Färbung mit Toluidinblau geht in dem Maße verloren, wie die amorphe Kittsubstanz verschwindet, die die Maschen des Fibrillennetzes ausfüllt. Die „chromotrope“ Substanz des Zwischengewebes ist also in der *Kittsubstanz* zu suchen. Die *elastischen Fasern* und *Membranen* bleiben bei der Behandlung mit Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung unverändert dicht und undurchstrahlbar. Sie lassen sich aber aufhellen, wenn man auf den Schnitt *Elastase* einwirken läßt. Elastase löst die Kittsubstanz aus den elastischen Elementen

heraus; es resultiert ein *fibrilläres Stroma* der elastischen Fasern und Membranen. Die Fibrillen der elastischen Fasern gleichen den Fibrillen der Zwischensubstanz, auch sie sind periodisch quergestreift. Das Stroma der elastischen Membranen hängt mit dem Fibrillenraumnetz des Zwischengewebes zusammen, es hebt sich lediglich als gerichteter Faserzug aus dem Zwischengewebe heraus. Der Unterschied zwischen elastischen Membranen und Zwischengewebe ist im wesentlichen durch die Verschiedenheit der Kittsubstanzen bedingt.

Es wird nachgewiesen, daß die Anfärbung der elastischen Fasern mit *Resorcin-Fuchsin* durch Einlagerung des Farbstoffes in die elastische Kittsubstanz zustande kommt. Mit Elastase behandeltes elastisches Gewebe färbt sich nicht mehr nach WEIGERT. Aus diesem Befund ergibt sich die Möglichkeit, die Weigert-Färbung zu einer wirklich spezifischen *Elastica*-Färbung zu machen, indem man sie mit der Anwendung von Elastase koppelt. Diese Färbung ist auch für die Elektronenmikroskopie als Nachweis elastischer Strukturen verwendbar.

Weitere Untersuchungen wurden an beschalltem Material durchgeführt. Auch die durch hochfrequenten Schall isolierten Fibrillen des elastischen Gewebes sind von einem Kittsubstanzmantel umgeben, der ihre Querstreifung maskiert. Wie im Schnitt kann aber auch bei diesem Verfahren die Kittsubstanz durch Elastase entfernt werden. Die von Kittsubstanz befreiten Fibrillen zeigen eine deutliche *periodische Querstreifung*, die der Querstreifung aller anderen Bindegewebsfibrillen entspricht. Sie sind 25—60 μ dick, der Mittelwert beträgt etwa 35 μ .

Die Bindegewebsversilberung nach GÖMÖRI am beschallten Material ergibt eine *Oberflächenversilberung* der Fibrillen des elastischen Gewebes. Die Silberkörner lagern sich an der Phasengrenze zwischen Fibrillen und Kittsubstanz ab, die ursprüngliche Querstreifung der Fibrillen geht dabei verloren. Kollagenfibrillen aus Sehne oder Sklera zeigen einen völlig anderen Versilberungsmodus, sie lagern die Silberpartikel *feinkörnig* ein, wobei ihre Querstreifung hervorgehoben wird. Die Versilberung erlaubt also eine Differenzierung der Fibrillen im Elektronenbild.

In Harnstofflösung gekochtes elastisches Gewebe, das man häufig als Ausgangsprodukt für Elastinanalysen verwendet, erscheint im elektronenmikroskopischen Bild homogenisiert. Es kann nicht festgestellt werden, ob die Fibrillenbausteine dabei in Lösung gegangen oder im homogenisierten Material verblieben sind. Hier wird die Frage erhoben, was man unter *Elastin* verstehen soll. Es wird vorgeschlagen, unter diesem Begriff die *Kittsubstanz* des elastischen Gewebes zu fassen, da sie die spezifische Komponente des elastischen Gewebes ist. Der

zweite Bestandteil elastischer Fasern, das fibrilläre Stroma, weist Beziehungen zu den Fibrillen des übrigen Bindegewebes auf.

Literatur.

- ALTSCHULER, CH. H., and D. M. ANGEVINE: Amer. J. Path. **27**, 141 (1951). — ASTBURY, W. T.: J. Internat. Leather Trades Chem. **24**, 69 (1940). — BALO, J., and I. BANGA: Biochemic. J. **46**, 384 (1950). — BANGA, I.: Z. Vitamin-, Hormon- u. Fermentforsch. **4**, 49 (1951). — BEAR, S.: J. Amer. Chem. Soc. **64**, 727 (1942). — DANON, D., et E. KELLENBERGER: Arch. des Sciences **3**, 171 (1950). — DETTMER, N.: Z. Zellforsch. **37**, 89 (1952). — DETTMER, N., I. NECKEL u. H. RUSKA: Z. Mikrosk. **60**, 290 (1951). — EBNER, V.: Zit. nach SSOLOWJEW. — EWALD, A.: Z. Biol. **26** (1890). — FRANCHI, C. M., and E. DE ROBERTIS: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **76**, 515 (1951). — FREY-WYSSLING, A.: Submicroscopic morphology of protoplasm and its derivatives. New York: Elsevier Publishing Co. 1948. — GÖMÖRI, G.: Amer. J. Path. **13**, 993 (1937). — GROSS, J.: J. of Exper. Med. **89**, 699 (1949). — Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **78**, 241 (1951). — J. of Gerontol. **5**, 343 (1950). — HALL, D. A.: Nature (Lond.) **168**, 513 (1951). — HERRATH, E. v., u. N. DETTMER: Z. Mikrosk. **60**, 282 (1951). — HINTZSCHE, E.: Z. mikrosk.-anat. Forsch. **45**, 531 (1939). — HOLMGREN, H.: Z. mikrosk.-anat. Forsch. **47**, 489 (1940). — LISON, L.: Archives de Biol. **46**, 599 (1935). — MEYER, K.: Physiologic. Rev. **27**, No 3 (1947). — MÖLLENDORFF, W. v., u. M. DÖRLE: ROUX' Arch. **100**, 61 (1923). — ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik. München: Leibnitz 1948. — RUSKA, H., u. W. SCHWARZ: Z. Mikrosk. **60**, 181 (1951). — SCHMIDT, W. J.: Die Bausteine des Tierkörpers in polarisiertem Lichte. Bonn: Friedrich Cohen 1924. — 1952 mündliche Mitteilung auf dem Anatomenkongr. — SCHMITT, F. O., C. E. HALL, and M. A. JAKUS: J. Cellul. a. Comp. Physiol. **20**, 11 (1942). — SCHULTZ, A.: Virchows Arch. **239**, 415 (1922). — SCHWARZ, W.: Physik. Verh. **3**, 123 (1952). — Elektronenmikroskopische Untersuchung über den Aufbau von Sklera und Cornea des Menschen. Z. Zellforsch. (im Druck). — Elektronenmikroskopische Untersuchung über die Differenzierung der Cornea- und Sklerafibrillen des Menschen. Z. Zellforsch. (im Druck). — SCHWARZ, W., u. G. VESTER: Cremolan, ein wasserlösliches Einbettungsmittel für histologische und elektronenmikroskopische Schnittpräparate. Z. Mikrosk. (im Druck). — SSOLOWJEW, A.: Virchows Arch. **241**, 1 (1923); **250**, 359 (1924). — STEIN, W. H., and E. G. MILLER: J. of Biol. Chem. **125**, 599 (1938). — TRETJAKOFF: Russ. Arch. Anat. i pr. **1**, H. 2 (1916). — WASSERMANN, F.: Anat. Rec. **111**, 145 (1951). — WEIGERT, C.: Zbl. Path. **9**, 289 (1898). — WOLPERS, C.: Klin. Wschr. **1943**, 624; **1944**, 169. — Virchows Arch. **312**, 292 (1944).

Prof. Dr. W. SCHWARZ, Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Str. 19.