

Virchows Archiv, Bd. 324, S. 116—122 (1953).

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Hamburg
(Direktor: Prof. Dr. C. KRAUSPE).

Dichtemessungen an der isolierten Muskelfaser*.

Von

ERNST KECK.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 22. Januar 1953.)

Die histologische Untersuchung von Geschwülsten macht es häufig erforderlich, zwischen Muskel- und Nerven- oder Bindegewebe zu unterscheiden. Die Differenzierung ist in vielen Fällen schwer, in manchen gar nicht eindeutig möglich. Neben den neuerdings viel benutzten histochemischen Methoden lassen sich dazu auch histophysikalische Verfahren verwenden; sie haben den Vorteil, *praktisch überhaupt keine Schädigung* des Gewebes eintreten zu lassen. Als eine derartige physikalische Eigenschaft, die schon von vornherein im biologischen Substrat gelegen ist und demnach keiner besonderen Vorbehandlung bedarf, habe ich die *optische Dichte* — zunächst in der isolierten Muskelfaser — untersucht.

Unter optischer Dichte versteht man das Produkt aus Dicke und Refraktionsindex. Die optische Dichte eines mikroskopischen Präparates läßt sich sehr exakt untersuchen mit der Zylinderlinsenmethode, wie sie von PHILPOT und SVENSSON für die Elektrophorese angegeben und in modifizierter Form von MEYER-ARENDT in diesem Archiv 321, 390 beschrieben wurde (vgl. dazu auch WIEDEMANN). Die Anwendung dieser Methode in der Histologie eröffnet ihr ein neues und wichtiges Aufgabengebiet. Über ihr Prinzip und die praktische Anwendung, wie auch über die mathematische Auswertung der Ergebnisse kann in Z. wiss. Mikr. 1953 nachgelesen werden.

Untersucht man mit diesem Verfahren ein ungefärbtes histologisches Präparat, beispielsweise einen Schnitt aus einer Struma colloidæ nodosa, dann erhält man ein Diagramm, wie es die Abb. 1 zeigt. Aus der Gegenüberstellung von Mikrophotographie und Refraktionsdiagramm des gleichen Schnittes ersieht man, daß sich jeder Wechsel im Aufbau der Struktur und damit jede Änderung der optischen Dichte auf einer Achse, die man sich in das eingezeichnete Rechteck denken kann, als eine Auslenkung der Basislinie manifestiert. Diese Auslenkungen unterscheiden sich voneinander und sind in ihren Abständen zueinander genau an die örtliche Lage der Struktureinzelheiten gebunden. Wie man erlernen

* Dissertation unter Leitung von Dozent Dr. MEYER-ARENDT.

mußte, aus der Kurvenfigur des EKG Schluß auf den zugrunde liegenden Vorgang zu ziehen, so wird man sich jetzt bei diesem Verfahren damit befassen, die Schrift dieses Diagramms zu lesen, um auf seine anatomischen Grundlagen schließen zu können. Um zur Deutung eines komplizierten Diagramms, wie es die Abb. I zeigt, beizutragen, habe ich

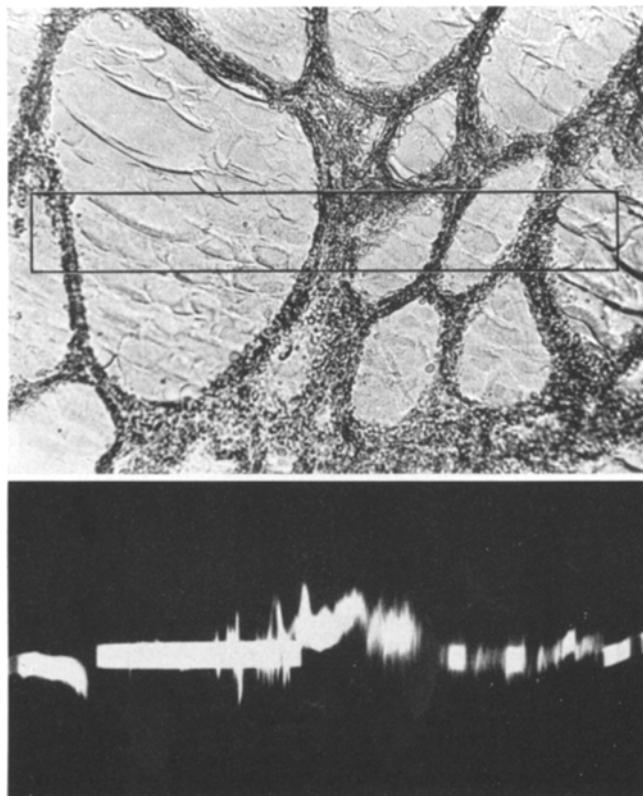


Abb. 1. Oben: Ungefärbtes Schnittpräparat einer Struma colloidosa. Das eingetragene Areal liegt der zylinderoptischen Analyse zugrunde. Unten: Zugehöriges zylinderoptisches Diagramm. Die Basislinie entspricht zugleich einer Leeraufnahme. Alle Auslenkungen der Basislinie zeigen örtlich und quantitativ die Änderungen der optischen Dichte auf der Längsachse des oben eingetragenen Rechtecks an.

Untersuchungen nach 2 Gesichtspunkten unternommen: 1. zylinderoptische Untersuchung der isolierten Muskelfaser, also eines Gewebeelementes, 2. zylinderoptische Untersuchung von Längsschnitten der Skelettmuskulatur und damit eines aus gleichen Elementen aufgebauten Gewebes.

Am einfachsten lassen sich Muskelfasern vom Frosch isolieren. Mit kleinen, aus 6 feinsten, eng mit ihren Öhrseiten nebeneinander in einen Flaschenkork gepreßten Nähnadeln kann man frische, lebende Muskulatur leicht auffasern. Eine

einzelne Faser wird aus ihrem Verbande gelöst und in die Objektkammer (Blutkörperchenzählkammer nach *Thoma-Zeiss*) gebracht. Nun werden einige Tropfen der jeweiligen Flüssigkeit unter das Deckglas der Objektkammer gebracht, d. h. die Faser wird imbibiert. Um zu vermeiden, daß sich eine feine Schicht physiologischer Kochsalzlösung, in der präpariert wird, zwischen Faser und Imbibitionsflüssigkeit legt, ist es zweckmäßig, die Faser rasch mit einem Mikrogebläse aufzutrocknen. Dann sieht man unter dem Präparationsmikroskop, wie sich die eingebrachte Flüssigkeit eng an die Faser schmiegt. Ganz ähnlich werden die im Verband liegenden Muskelfasern vorbereitet. Menschliche Muskulatur läßt sich leicht ohne Fixation auf dem Gefriermikrotom schneiden; der etwa 20μ dicke Schnitt wird in die Objektkammer gebracht und imbibiert. Zum Vergleich wurde Muskulatur

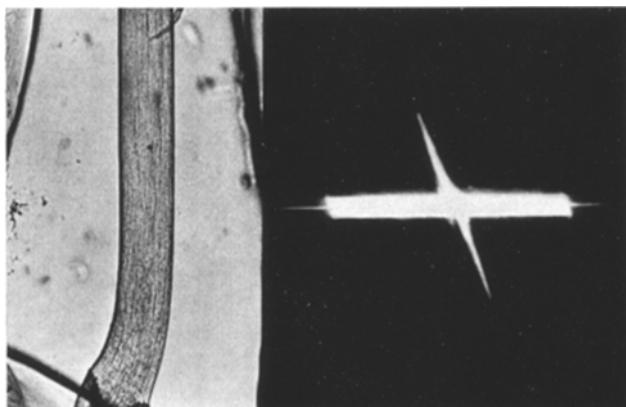


Abb. 2. Links: Unfixierte und ungefärbte Muskelfaser vom Frosch in physiologischer Kochsalzlösung. Rechts: Zylinderoptisches Äquivalentbild der gleichen Faser in physiologischer Kochsalzlösung imbibiert. Die optische Dichte ändert sich auf der Untersuchungsachse zweimal: auf der Basislinie erheben sich in nahem Abstand und charakteristischem Winkel zwei Auslenkungen.

auch nach Formolfixierung und Paraffineinbettung geschnitten, die dann in Caedax-„Imbibition“ untersucht wurde. — Um einen Vergleich mit den vorangegangenen Modellversuchen, bei denen ein feiner Glasfaden in Flüssigkeiten mit verschiedenen Brechungsindizes eingetaucht wurde, ziehen zu können, wurden auch die Muskelfasern nacheinander in 7 Flüssigkeiten mit verschiedenen Refraktionsindizes imbibiert. — Außerdem wurden Fasergewebe verschiedener Herkunft miteinander verglichen: glatte Muskelfasern des Uterus eines Uterusmyoms, Nervenfasern aus dem N. ischiadicus des Frosches, kollagene Faserbündel aus der Achillessehne und aus der Fascia lata des Frosches.

Abb. 2 zeigt nebeneinander das Mikrophotogramm und das zylinderoptische Diagramm einer lebenden Froschmuskelfaser. Man sieht, daß der isolierten Muskelfaser ein charakteristisches Diagramm zu eigen ist. Untersucht man nun statt der einzelnen Muskelfaser einen histologischen Schnitt des Skeletmuskelgewebes, dann bleibt die charakteristische Form dieses Diagramms prinzipiell erhalten: Abb. 3 zeigt, daß sich das Diagramm vom unfixierten, lebensfrischen Muskelgewebe aus zahlreichen, der Abb. 2 ähnlichen Diagrammen zusammensetzt. Jede der entstehen-

den Auslenkungen in Abb. 3 entspricht einer Änderung der optischen Dichte auf der Längsachse des eingeziehenen Rechtecks. Ihr Abstand

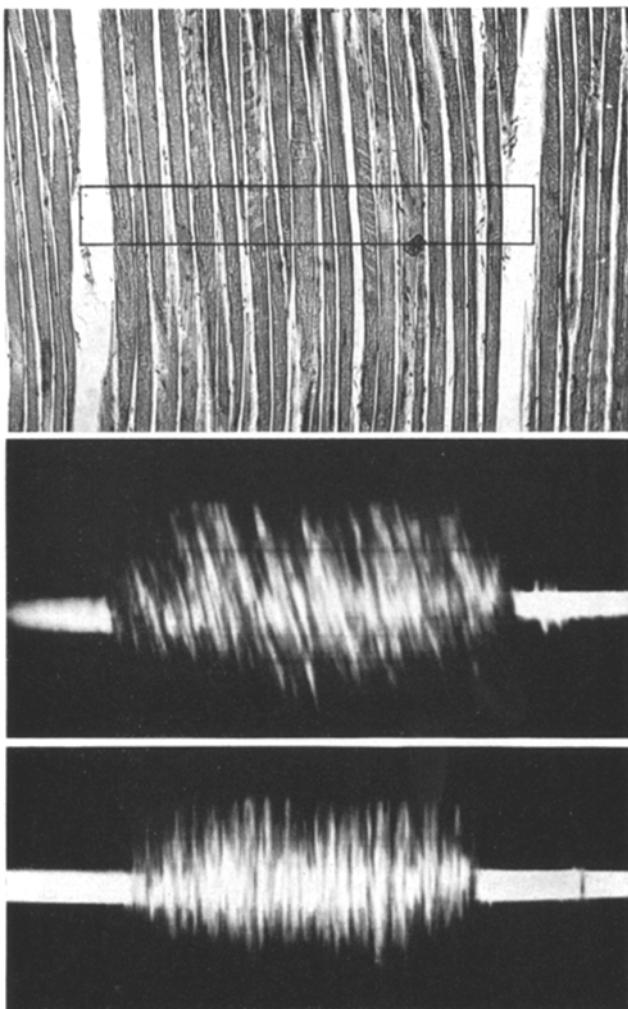


Abb. 3. Vergleichsbild eines üblichen histologischen Präparates menschlicher Skelettmuskulatur. Das senkrecht zur Faserrichtung eingetragene Rechteck bezeichnet den untersuchten Teil; seine Längsachse und die Änderungen der optischen Dichte auf ihr liegen der zylinderoptischen Analyse zugrunde. Mitte: Diagramm eines unfixierten und ungefärbten Gefrierschnittes menschlicher Skelettmuskulatur. Unten: Diagramm eines ebenso hergestellten Schnittes der Froschmuskulatur. Die Winkelbildung wurde durch Focussierung des Gerätes ausgeschaltet.

voneinander entspricht dem Abstand der Muskelfasern voneinander. Die Neigung der einzelnen Auslenkung zur Basislinie ist abhängig von der Focussierung des Gerätes, vom Brechungsindex der Imbibitionsflüssigkeit

und von einer Konstanten, die offenbar für die imbibierte organische Substanz typisch ist.

Ein Vergleich mit den Modellversuchen (1953) ergibt, daß sich die biologische Faser bei der zylinderoptischen Untersuchung allerdings anders darstellt als ein Glasfaden gleicher Abmessung. So lassen sich auch die Meßwerte der Neigungswinkel von biologischen Fasern (zwischen Auslenkung und Basislinie am Diagramm) nicht als Hyperbel graphisch darstellen, sondern ergeben eine ein wenig gegen die Abszisse ansteigende Linie. — Das dürfte seinen Grund darin haben, daß ein optisch hoch komplizierter Körper wie eine Muskelfaser nicht nur durch *einen* Refraktionsindex gekennzeichnet werden kann. Demnach ist die optische Dichte eines solchen biologischen Objekts offenbar nicht einfach das Produkt aus Faserdicke und Brechungsindex, sondern vermutlich das Produkt aus Faserdicke und einer Resultante vieler Brechungsindices und ihrer Überschneidungen.

Ein Vergleich zwischen den in Abb. 1 und 3 wiedergegebenen Diagrammen von Schnittpräparaten einer Schilddrüse und von Muskelgewebe ergibt, daß ein Gewebe, das einen Verband gleichartiger Elemente darstellt, auch ein einheitliches Diagramm liefert, während ein kompliziert zusammengesetztes Gewebe ein sehr mannigfaltiges Diagramm aufweist.

Es interessiert nun die Frage, ob für das Zustandekommen eines derartigen zylinderoptischen Diagramms mehr die chemischen Eigenschaften des Substrates oder mehr die physikalischen — also statisch-mechanischen — Feinheiten seiner Struktur von Bedeutung sind. Zur Klärung dieser Frage habe ich an reinem, experimentell aus Froschmuskulatur hergestelltem Actomyosin zylinderoptische Dichtemessungen durchgeführt. Es ergibt sich aus diesen Versuchen mit Wahrscheinlichkeit, daß der *chemische* Aufbau eine größere Bedeutung für das Diagramm hat, als der strukturelle.

Actomyosin wurde in Anlehnung an eine Vorschrift von H. H. WEBER gewonnen und zu Fäden verarbeitet¹: 50 g sorgfältig in der Kälte abpräparierte Froschmuskulatur werden nach Zusatz von 150 ml Extraktionslösung im Starmix zu Creme verarbeitet. Die Extraktionslösung setzt sich zusammen aus 44,5 g KCl p. a.; 3,4 g NaHCO₃; 2,9 g Na₂CO₃ · 10H₂O; Aqua dest. ad 1000 und 0,5 g Trilon B als Schwermetallfänger. Nach einstündigem Stehen im Eisbad wird 1 Std zentrifugiert, wobei die unlöslichen Anteile, wie das Sarkolemm, sedimentieren. Das Obere enthält dann Myosin in Salzlösung, aus der es mit 8fachem Volumen Aqua dest. bei 0°—3° ausgefällt wird. Nach 12ständigem Abstehen bei 0° wird 20 min zentrifugiert. Das Obere wird verworfen, das Sediment in 1/3 Volumen 12%iger KCl-Lösung gelöst; der unlösliche Rest wird abzentrifugiert. Das Obere, eine leicht viscose, schwach trübe Flüssigkeit, wird zur weiteren Reinigung noch einmal wie vorher umgefäßt und nach 12ständigem Stehenlassen bei 0° zentrifugiert. Das entstehende

¹ Für freundlichen Rat danke ich Herrn Doz. Dr. BÜCHER und Herrn Dr. BEISENHERZ vom Phys.-Chem. Inst. der Universität Hamburg.

Sediment ist annähernd reines Actomyosin; es wird in $\frac{1}{3}$ Vol. 12%iger KCl-Lösung gelöst und kann nun mit einer feinen Kanüle in Wasser gespritzt werden. Die entstehenden, 100—200 μ starken Fäden werden wie Muskelfasern in verschiedene Flüssigkeiten eingebettet und mit dem Zylinderlinsenmikroskop untersucht.

Das Diagramm der Untersuchung am Actomyosinfaden gibt die Abb. 4 wieder. Auslenkung und Neigungswinkel entsprechen den Verhältnissen am Diagramm der isolierten Muskelfaser. Obwohl also ein anderer struktureller Aufbau vorliegt, entsteht bei annähernd gleicher chemischer Zusammensetzung ein fast gleiches zylinderoptisches Diagramm.

Die Verbindung einer einfachen Technik, die eine größtmögliche Schonung des zu untersuchenden Gewebes zuläßt, mit der Möglichkeit

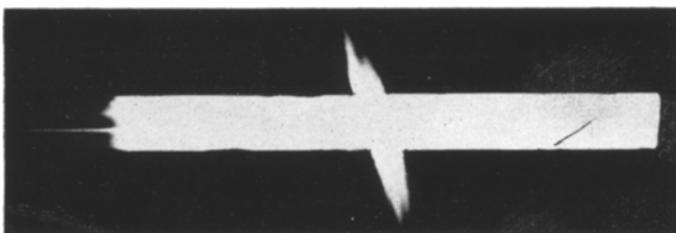


Abb. 4. Der Abb. 2 entsprechendes Diagramm eines experimentell gesponnenen Actomyosinfadens aus Froschmuskulatur. Die Unschärfe der Auslenkung wird durch die tropfige Konsistenz des Fadens bedingt. Der Neigungswinkel zur Basislinie hat den gleichen Wert wie das Muskelfaserdiagramm in Abb. 2.

einer subtilen Untersuchung machen diese Methode zu einer brauchbaren Ergänzung der üblichen histologischen Verfahren. Auch das normale histologische Präparat ist nur ein Äquivalentbild, wenn auch ein leichter deutbares, als das Diagrammäquivalentbild der zylinderoptischen Methode. Da die Entstehung beider Bilder auf 2 grundsätzlich verschiedenen Methoden beruht — einmal Eingriff am Gewebe selbst, beim zweiten Beeinflussung eines vom Gewebe entworfenen Bildes durch optische Einrichtung — werden sie sich nicht verdrängen, sondern wertvoll ergänzen.

Das gilt vor allem, wenn es möglich wird, dieses Verfahren auch auf kleinere mikroskopische Dimensionen anzuwenden, so daß unbekannte histophysikalische Qualitäten des mikroskopischen Präparates zur Ausdeutung und Kenntnis des Feinbaues der Gewebe beitragen werden.

Zusammenfassung.

Mit Hilfe der zylinderoptischen Methode nach PHILPOT-SVENSSON läßt sich die optische Dichte, eine optische Eigenschaft, die jedem biologischen Substrat auch ohne Fixierung und Färbung innewohnt, als direktes Diagramm aufzeichnen. Modellversuche an Imbibitionen

eines Glasfadens und das Diagramm eines zusammengesetzten Gewebes (Struma coll. nod.) lagen bereits vor.

In dieser Arbeit werden die Modellversuche und ihre Ergebnisse auf die Abmessung der quergestreiften Muskelfaser übertragen. Zu diesem Zweck werden isolierte Fasern *lebender* Froschmuskulatur untersucht. Die graphische Darstellung der erhaltenen Werte zeigt, daß sich die rechnerische Auswertung der Modellversuche nicht ohne weiteres auf die Ergebnisse der organischen Faseruntersuchungen übertragen läßt. Vergleichsdiagramme von glatten Muskelfasern, kollagenen Bündeln und Actomyosinfäden machen den Schluß wahrscheinlich, daß der chemische Aufbau und nicht so sehr die statische Struktur dieser organischen Fasern das Bild der Auslenkungslinie im Diagramm bestimmt.

Das Diagramm der Muskulatur, eines Gewebes aus vorwiegend gleichen Elementen, gibt Aufschluß über den Weg einer Ausdeutung von zylinderoptischen Gewebsdiagrammen im allgemeinen.

Literatur.

- MEYER-ARENDE, J.: Virchows Arch. **321**, 378 (1952). — Science (Lancaster, Pa.) (im Druck). — MEYER-ARENDE, J., u. E. KECK: Verh. dtsch. Ges. Path. **37**. — MEYER-ARENDE, J., u. E. MEYER-ARENDE: Z. wiss. Mikrosk. **61**, 354 (1953). — WIEDEMANN, E.: Chimia **2**, 25 (1948).

cand. med. ERNST KECK, Hamburg 20, Alsterkrugchaussee 226.