

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Marburg
(Direktor: Prof. Dr. H. HAMPERL).

Zur Histochemie des Zentralapparates der Zelle *.

Von

PETER GEDIGK.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 9. Januar 1954.)

Jede Zelle besitzt außer Kern und Cytoplasma noch ein unscheinbares aber wichtiges Zellorganell, die Centrosomen (Centriolen). Sie sind gewöhnlich in der Zweizahl vorhanden und werden von einem kleinen hellen Hof umgeben, der Centrosphäre, welche gelegentlich eine radiäre Streifung erkennen läßt. Sphäre und Zentralkörperchen zusammen bilden den sog. Zentralapparat.

Seit O. HERTWIG werden diese Centrosomen als das kinetische Zentrum der Zelle angesehen. Bei der mitotischen Zellteilung bildet je eines den Pol der Spindel, von dem die Spindelfasern ausstrahlen. Da nach der Kern- und Protoplasmateilung beide Tochterzellen nur je ein Centrosom erhalten, ist anzunehmen, daß sich dieses wieder sehr schnell verdoppelt und so gewissermaßen die Zellen für die nächste mitotische Teilung bereit macht (s. auch TIMONEN). Aus den Centriolen, bzw. der Centrosphäre entwickeln sich auch die Flimmerhaare, und zwar zuerst im Zellinnern in Form einer Flimmerblase, die gegen die Oberfläche zu vorrückt und dort aufbricht [s. HAMPERL (3)].

Hinsichtlich der Pathologie des Zentralapparates sind uns nur sehr wenige Tatsachen bekannt. Wenn die erst nach der Mitose zu erwartende Verdoppelung des Centrosoms aus irgendwelchen Gründen verfrüht eintritt, z. B. bei Verzögerung der Anaphase, dann kann sich nach TIMONEN ein dritter Spindelpol entwickeln — es kommt zur dreipoligen Mitose. Ebenso wäre durch Verdoppelung auch des zweiten Centrosoms die vierpolige Mitose zu erklären.

Besonders ist aber immer wieder die Vergrößerung des Zentralapparates, also in erster Linie die Vergrößerung der Centrosphäre aufgefallen. Schon BORREL hat sie in Tumoren beobachtet. LEWIS beschreibt sie an Tumorzellen in der Gewebekultur. Eine solche Vergrößerung der Sphäre wurde aber vor allem an den Epitheloid- und Riesenzellen des tuberkulösen Granulationsgewebes beschrieben (HERXHEIMER und ROTH, ORSOS, sowie CASTRÉN), sie ist besonders deutlich

* Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

in den umfangreicheren Epitheloidzellen bei der großzelligen Tuberkulose, bzw. beim Morbus Boeck [HAMPERL (1)]. Den Centrosphären soll auch eine Bedeutung bei der Entstehung von vielkernigen Riesenzellen zukommen. Auch die partielle Nekrose und Verkalkung der Riesenzellen werden vielfach mit regressiven Veränderungen der Centrosphären in Zusammenhang gebracht.

Alle bisherigen Untersuchungen sind jedoch durch die Kleinheit und schlechte histologische Darstellbarkeit des Zentralapparates beeinträchtigt worden (vgl. auch CAMERON). Wie bereits G. HERTWIG hervorgehoben hat, stehen uns zur Identifizierung des Zentralapparates nur unspezifische Färbungen zur Verfügung, die überdies häufig gänzlich versagen. In vielen Fällen ist mit den üblichen Färbemethoden überhaupt keine sichere Abgrenzung der Centrosomen und der Centrosphären von dem übrigen Cytoplasma zu erreichen. Auch die älteren Versuche zu einer näheren cytochemischen Charakterisierung des Zentralapparates haben wegen der Unvollkommenheit des damals zur Verfügung stehenden methodischen Rüstzeuges nicht zu befriedigenden Resultaten geführt.

Erst in der jüngsten Zeit ist durch die Einführung moderner histochemischer Methoden die neue Bearbeitung des morphologischen und funktionellen Verhaltens des Zentralapparates ermöglicht worden. So haben MONNÉ und SLAUTTERBACK, sowie STICH (1), (2) darauf hingewiesen, daß die Centrosomen und Centrosphären im tierischen Gewebe eine positive Perjodsäure-Leukofuchsinreaktion (PAS-Reaktion) geben. Auch der vergrößerte Zentralapparat in den Epitheloid- und Riesenzellen läßt sich, wie unlängst HAMPERL (2) gezeigt hat, gut mit der PAS-Reaktion im histologischen Schnitt darstellen. Damit war nunmehr erstens eine sehr einfache histologische Anfärbung der Sphären gelungen und zweitens der Weg zu ihrer histochemischen Charakterisierung gewiesen.

Die vorliegenden Untersuchungen haben das Ziel, die cytochemischen Eigenschaften des Zentralapparates im tuberkulösen Granulationsgewebe mit modernen Methoden zu definieren, um so vielleicht zur Kenntnis der Pathologie und Orthologie dieses wichtigen Zellorganells beizutragen.

Material.

Die Untersuchungen wurden an mehreren Fällen von großzelliger Lymphknotentuberkulose durchgeführt. Das Material wurde in Formalin fixiert und in der üblichen Weise in Paraffin eingebettet.

Methoden.

I. Allgemeine Färbung.

Hämatoxylin-Eosin (vgl. ROULET).

II. Histochemische Reaktionen zur Darstellung von Proteinen.

Die sog. gekoppelte Tetrazoniumreaktion (LISON, DANIELLI) beruht auf der Kupplung der Phenolgruppe des Tyrosins, der Indolgruppe des Tryptophans und der Imidazolgruppe des Histidins mit tetrazotiertem Benzidin. Die freibleibende Diazogruppe des Benzidins wird anschließend mit H-Säure gekuppelt. Es entsteht eine tief rotbraun gefärbte, stabile, nicht diffundible Proteinfarbstoffverbindung. Außer den aromatischen Aminosäuren sollen unter Umständen auch purin- und pyrimidinhaltige Verbindungen mit der gekuppelten Tetrazoniumreaktion im histologischen Schnitt darstellbar sein (MITCHELL, DANIELLI). Die Methode wurde nach den Angaben von PEARSE (1) durchgeführt.

Benzoylierung der aromatischen Aminosäuren. Durch Behandlung mit Benzoylchlorid werden die aromatischen Aminosäuren in der Regel für die Kupplungsreaktion blockiert. Eine positive Tetrazoniumreaktion nach Benzoylierung spricht entweder für das Vorliegen von purin- oder pyrimidinhaltigen Verbindungen (MITCHELL, DANIELLI) oder ist als Hinweis auf eine besondere räumliche Anordnung, bzw. einen bestimmten Polymerisationsgrad der Proteine zu bewerten [PEARSE (2)]. Die Benzoylierung wurde nach den Angaben von PEARSE (2) durchgeführt.

Die MILLONSche Reaktion dient zum Nachweis des Tyrosins. Sie wurde nach den Richtlinien von BENSLEY und GERSH, sowie PEARSE (2) durchgeführt.

Der Nachweis von Sulfhydrylgruppen erfolgte nach der Methode von CHÈVREMONT und FRÉDÉRIC. Bei diesem Verfahren werden die Schnitte mit einer frisch bereiteten Mischung von Kaliumferricyanid und Ferrichlorid behandelt. Dabei wird das Ferricyanid durch die SH-Gruppen des Gewebes zum Ferrocyanid reduziert, das sich dann mit dem Ferriion zu Berlinerblau verbindet. Diese Reaktion ist für SH-Gruppen nicht streng spezifisch, da auch eine Reihe von anderen Stoffen, z.B. Äthylenverbindungen, Ascorbinsäure, Indolverbindungen, sowie Pyrrol- und Phenolderivate, das Ferricyanid reduzieren können. Die Durchführung dieses Reduktionstestes erfolgte nach den Angaben von LILLIE und BURTNER.

Blockierung der Sulfhydrylgruppen mit Quecksilber-II-Chlorid (vgl. LISON). Diese Reaktion beruht auf der Reaktion der SH-Gruppen mit $HgCl_2$, die dann für den Reduktionstest ausgeschaltet sind. Das Vorliegen von aktiven SH-Gruppen kann nur bei denjenigen Strukturen angenommen werden, die im nativen Schnitt eine positive und in dem mit Sublimat behandelten Schnitt eine negative Chèvremont-Frédéric-Reaktion geben. Zur Blockierung der SH-Gruppen wurden die Schnitte für 6 Std bei 60° C in eine wässrige, gesättigte Sublimatlösung gebracht. Von der Wirksamkeit der Quecksilberblockade haben wir uns stets an Kontrollschnitten von Geweben überzeugt, deren Strukturelemente reichlich aktive Sulfhydrylgruppen enthalten.

Reduktion der SS-Gruppen zu SH-Gruppen mit Kaliumcyanid [vgl. PEARSE (2)]. Läßt man eine 10%ige Lösung von Kaliumcyanid 5 min bei Zimmertemperatur auf einen Gewebeschnitt einwirken, so werden die reaktionsfähigen SS-Gruppen zu SH-Gruppen reduziert. Die Sulfhydrylgruppen können dann mit dem Test von CHÈVREMONT und FRÉDÉRIC sichtbar gemacht werden.

Nachweis von SS- (und SH-) Gruppen durch Oxydation mit Perameisensäure [PEARSE (1)]. Dieses Verfahren beruht auf der Oxydation von Cystin durch Perameisensäure zu Alanin- β -Sulfin- bzw. Alanin- β -Sulfonsäure. Die hierbei entstehenden SO_2H - und SO_3H -Gruppen können erstens mit dem SCHIFFSchen Reagens nachgewiesen werden. Sie lassen sich zweitens durch die Messung der Basophilie erkennen. Es kann angenommen werden, daß Gewebselemente, die im unbehandelten Schnitt nicht basophil sind und dann nach der Oxydation mit Perameisensäure

noch bei p_{H} 2,8 Methylenblau binden, reaktionsfähige SS- bzw. SH-Gruppen enthalten. Die Perameisensäureoxydation wurde nach den Angaben von LILLIE (2) vorgenommen. Die Basophilie ist nach der Arbeitsvorschrift von PEARSE (1) gemessen worden.

Zur Darstellung *basischer Proteine* haben wir die Schnitte 30 min in einer 0,1%igen wäßrigen *Fastgreenlösung* bei p_{H} 2,1 gefärbt. Dann 24 Std mit tert. Butylalkohol differenzieren.

III. Histochemischer Nachweis von Nucleinsäuren.

Zum Nachweis von *Nucleinsäuren* haben wir außer der Färbung mit Toluidinblau die Färbung mit *Gallocyanin-Chromalaun* angewandt. Die Färbung haben wir nach den Angaben von SANDRITTER vorgenommen: Die Schnitte werden 48 Std mit der *Gallocyanin-Chromalaunlösung* bei Zimmertemperatur gefärbt. Kurz in Wasser waschen. Entwässern, Xylol, Balsam.

Herstellung der *Gallocyanin-Chromalaunlösung*: 5 g Chromalaun werden in 100 ml dest. Wasser gelöst. 0,15 g Gallocyanin hinzusetzen und schütteln. Langsam erwärmen und 20 min kochen. Nach dem Abkühlen filtrieren und mit dest. Wasser auf 100 ml auffüllen.

Wegen des negativen Ausfalles der *Gallocyanin-Chromalaun*- und der Toluidinblaufärbung haben wir bei den vorliegenden Untersuchungen die Schnitte nicht mit Nucleasen behandelt.

IV. Histochemische Reaktionen zur Darstellung von Polysacchariden.

Die *Perjodsäure-Leukoäpfchenreaktion* (PAS-Reaktion) [McMANUS, LILLIE (1), HOTCHKISS] dient zur histochemischen Erfassung von Kohlenhydraten. Die Methode wurde nach den Angaben von HOTCHKISS und PEARSE (2) durchgeführt.

Reversible Acetylierung nach McMANUS und CASON. Dieses Verfahren dient zur histochemischen Unterscheidung zwischen PAS-positiven α -Glykolen, α -Aminoalkoholen und Äthylenverbindungen. Es wurde nach den Angaben von McMANUS und CASON durchgeführt.

Histoenzymatische Analyse mit Diastase. Bei der Bebrütung der Schnitte mit Diastase wird das Glykogen aus dem Schnitt entfernt und somit von anderen Polysacchariden unterschieden.

Histoenzymatische Analyse mit Hyaluronidase. Bei der Einwirkung von Testes-hyaluronidase auf den histologischen Schnitt lassen sich die mesenchymalen sauren Mucopolysaccharide aus dem Schnitt entfernen und von den anderen Polysacchariden abgrenzen.

Die Messung der Basophilie (PISCHINGER) beruht auf einer bei verschiedenem p_{H} vorgenommenen Messung der Bindefähigkeit einzelner Gewebelemente für basische Farbstoffe. Als Maß für die Basophilie wird diejenige Wasserstoffionenkonzentration angesehen, bei der die sichtbare Bindefähigkeit für Methylenblau erlischt [PEARSE (2)].

Die Färbung mit Alcianblau (STEEDMAN, PEARSE) dient zur Darstellung von epithelialen und mesenchymalen sauren Mucopolysacchariden. Wir haben die Färbung im Wesentlichen nach den Angaben von PEARSE durchgeführt: Die Schnitte werden mit einer frisch filtrierten 2%igen wäßrigen Lösung von Alcianblau 60 sec gefärbt. Spülen in dest. Wasser. Färbung mit Kernechtrot. Entwässern, Xylol, Balsam.

Die *Toluidinblaufärbung* haben wir zum Nachweis von sauren Mucopolysacchariden und Nucleinsäuren verwandt. — Die Schnitte werden 6 Std mit einer 0,5%igen wäßrigen Toluidinblaulösung behandelt. — Kurzes Abspülen mit Wasser. Beurteilung der Metachromasie. Dann Einschließen in Glycerin-Gelatine.

Die Prüfung der Eisenbindung (HALE) beruht auf der Behandlung der Schnitte mit kolloidalem, dialysiertem Eisen. Das Eisenhydroxyd wird von den sauren Gruppen (im wesentlichen von den Carboxyl- und Schwefelsäuregruppen) der Gewebeelemente gebunden und dann mit der Berlinerblau-Reaktion nachgewiesen.

Eine zusammenfassende Darstellung der Methoden der Kohlenhydrathistochemie ist an anderer Stelle veröffentlicht worden [GEDIGK (1), (2)]. Genaue Angaben über die Durchführung dieser Methoden finden sich in einer Arbeit von GEDIGK und STRAUSS.

V. Methoden zum Nachweis von Lipiden.

Färbung mit einer gesättigten Sudan III- Sudan IV-Lösung. (KAY und WHITEHEAD.) Es wird eine gesättigte Lösung von gleichen Mengen von Sudan III und IV in der Alkohol-Acetonmischung nach HERXHEIMER hergestellt. Die Durchführung der Färbung erfolgt nach den Angaben von PEARSE (2).

Färbung mit Sudanschwarz (LISON). Die Schnitte werden 30 min in einer gesättigten Sudanschwarz B-Lösung in 70%igem Alkohol gefärbt. Kernfärbung mit Kernechtrot.

Perameisensäure-Leukofuchsinreaktion [PEARSE (1), LILLIE (2)]. Diese Methode dient zur histochemischen Darstellung von Äthylenverbindungen. Die Äthylengruppen werden hierbei von der Perameisensäure zu Schiff-positiven Aldehyden oxydiert.

Durch die Untersuchungen von PEARSE (1) ist es — wie bereits oben erwähnt — bekannt, daß auch die Aminosäure Cystin von der Perameisensäure angegriffen und zu Alanin- β -Sulfonsäure und Alanin- β -Sulfinsäure oxydiert wird, die sich gleichfalls mit fuchsinschweifiger Säure darstellen lassen. Die oxydierten Schiff-positiven Schwefelverbindungen können jedoch auf Grund ihrer Basophilie leicht von den bei der Oxydation von Äthylengruppen entstandenen Aldehyden unterschieden werden. Die Grundlagen der Perameisensäure-Leukofuchsinreaktion sind an anderer Stelle diskutiert worden [GEDIGK (1)]; ihre Durchführung ist gleichfalls in einer früheren Mitteilung angegeben worden (GEDIGK und STRAUSS).

Nachweis von Carbonylgruppen mit dem SCHIFFSchen Reagens. Es wurde die von DE TOMASI angegebene Modifikation des SCHIFFSchen Reagens benutzt.

Untersuchungsergebnisse.

I. Färbung mit Hämatoxylin-Eosin.

Das Centroplasma erscheint blaß hellrot. Häufig bleibt es völlig ungefärbt (vgl. Abb. 1).

II. Ergebnis der Reaktionen für Proteine und Aminosäuren.

Bei der gekuppelten *Tetrazoniumreaktion* werden die Sphären in den Epitheloid- und Riesenzellen, ebenso wie das umliegende Protoplasma, stark angefärbt. Verhältnismäßig deutlich tritt der Zentralapparat in den Riesenzellen hervor. In den Epitheloidzellen reagiert dagegen der Zentralapparat häufig nicht stärker als das übrige Protoplasma. Läßt man auf die Schnitte 18 Std 10%iges Benzoylchlorid einwirken, so verlieren die Centrosphären völlig ihre Reaktionsfähigkeit mit tetrazotiertem Benzidin.

Mit der *MILLONSchen Reaktion* für Tyrosin lassen sich die Centrosphären nicht darstellen.

Behandelt man die Schnitte mit der Ferricyanid-Ferrichloridlösung nach CHÈVREMONT-FRÉDÉRIC, so wird an den Centrosphären Berliner-

blau niedergeschlagen. Die Sphären unterscheiden sich durch diesen Farbstoffniederschlag von dem umgebenden Protoplasma. Durch eine sechsstündige Einwirkung einer gesättigten, wäßrigen Sublimatlösung wird dieses Reduktionsvermögen des Centroplasmas nicht abgeschwächt.

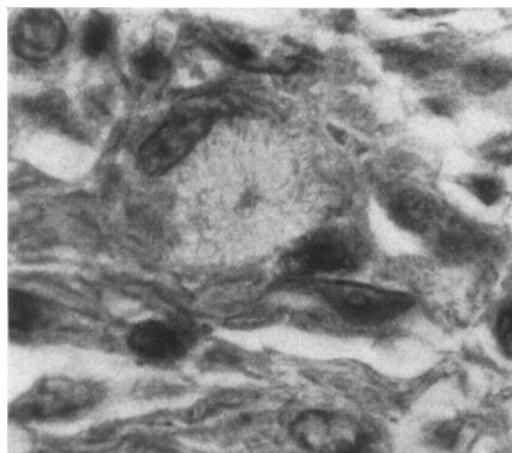


Abb. 1. Vergrößerter Zentralapparat in einer Epitheloidzelle. Hämatoxylin-Eosin.
Vergr.: 1200mal.

Tabelle 1.

Histochemische Reaktion	Zentralapparat in	
	Epitheloidzellen	Riesenzellen
Hämatoxylin-Eosin	blaß hellrot	blaß hellrot
Tetrazoniumreaktion	++	+++
Tetrazoniumreaktion nach Benzoylierung	—	—
MILLONSche Reaktion	—	—
Test nach CHÈVREMONT-FRÉDÉRIC	+	+
Chèvremont-Frédéric-Test nach Sublimatblockade	+	+
Chèvremont-Frédéric-Test nach Reduktion mit Kaliumpcyanid	+	+
Färbung mit Fastgreen	(+)	(+)
PAS-Reaktion	++	+++
PAS-Reaktion nach Acetylierung	—	—
PAS-Reaktion nach Acetylierung und Verseifung	++	+++
PAS-Reaktion nach Diastase	++	+++
PAS-Reaktion nach Hyaluronidase	++	+++
Methylenblaubindung bis p_H	4,3	4,3
Färbung mit Alcianblau	—	—
Färbung mit Toluidinblau	±	±
Metachromasie	—	—
Eisenbindung (HALE)	+	+
Färbung mit Gallocyanin-Chromalaun	—	—
Färbung mit Sudanschwarz (Gefrierschnitt)	(+)	+
Perameisensäure-Schiffreaktion	—	±
Schiffreaktion	—	—
Methylenblaubindung nach Perameisensäureoxydation bis p_H	3,6—3,8	3,6—3,8

Die Behandlung der Schnitte mit einer 10%igen Kaliumcyanidlösung führt nur zu einer geringfügigen Verstärkung der Reduktionsfähigkeit des Centroplasmas. Nach der Oxydation mit Perameisensäure nimmt die Basophilie des Zentralapparates nicht wesentlich zu (vgl. Tabelle 1).

Mit *Fastgreen* wird das Centroplasma schwach grün gefärbt.

III. Ergebnis der Färbungen für Nucleinsäuren.

Mit *Gallocaynin-Chromalaun* oder *Toluidinblau* lässt sich der Zentralapparat nicht anfärben. Durch das Fehlen jeglicher Farbstoffaufnahme fällt er in den *Gallocyanin-Chromalaunschnitten* geradezu auf.

IV. Ergebnis der Reaktionen für Polysaccharide.

Wie bereits **HAMPERL** (2) hervorgehoben hatte, geben die Centrosphären eine sehr deutliche *PAS-Reaktion* (Abb. 2, 3 und 4). Läßt man

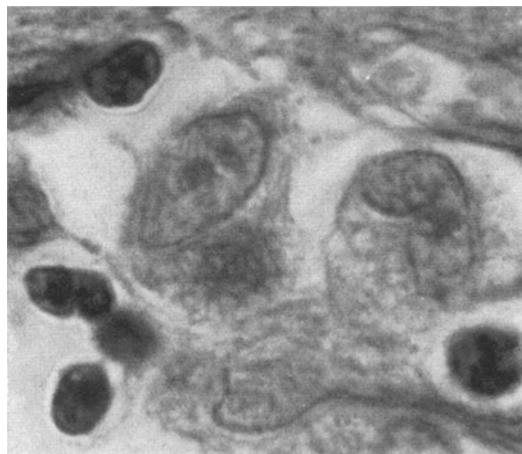


Abb. 2. Vergrößerte Centrosphäre in einer Epitheloidzelle. PAS-Reaktion. Vergr.: 1800mal.

die Essigsäureanhydrid-Pyridinlösung nach **McMANUS** und **CASON** 45 min auf den Schnitt einwirken, so verliert das Centroplasma seine Reaktionsfähigkeit mit Perjodsäure-Leukofuchsin. Durch schwaches Alkali können die Acetylgruppen ohne weiteres wieder entfernt werden: Der Zentralapparat ist wieder mit der Perjodsäure-Schifftechnik anfärbarbar.

Die Bebrütung der Schnitte mit *Diastase* oder *Hyaluronidase* ändert die PAS-Reaktion der Sphären nicht.

Bei der Messung der *Basophilie* lässt sich die Methylenblaubindefähigkeit des Centroplasmas bis p_H 4,3 verfolgen. Die Beurteilung der Methylenblaubindung ist insofern etwas schwierig, als die Sphären an nähernd die gleiche Affinität für basische Farbstoffe besitzen wie das übrige Protoplasma. Eine sichere Anfärbung des Zentralapparates

mit *Alcianblau* oder mit *Toluidinblau* ist uns nicht gelungen. Es war daher auch nicht möglich, mit den Thiazinfarbstoffen Thionin und Toluidinblau eine *Metachromasie* zu erzeugen.

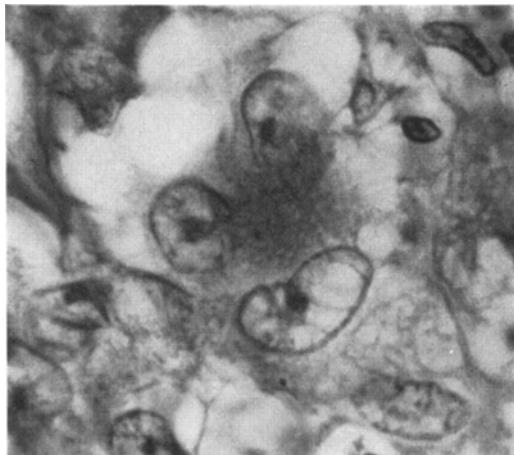


Abb. 3. Vergrößerte Centrosphäre in einer dreikernigen Zelle. PAS-Reaktion. Vergr.: 1800mal.

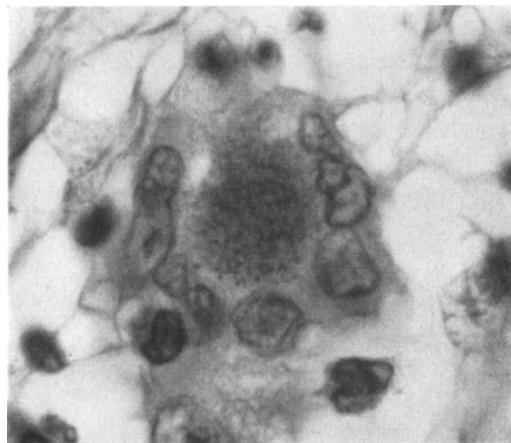


Abb. 4. Vergrößerte Centrosphäre in einer LANGHANSschen Riesenzelle. PAS-Reaktion. Vergr.: 1200mal.

Dagegen haben wir gefunden, daß die Centrosphären kolloidales Eisen binden. Sie lassen sich mit der *Halemethode* anfärben und von dem umgebenden Protoplasma abgrenzen.

V. Ergebnis der Färbungen und Reaktionen für Lipide.

Im formalinfixierten Gefrierschnitt werden die Sphären sowohl in den Epitheloid- als auch in den Riesenzellen schwach mit *Sudanschwarz*

angefärbt. Mit Sudanrot gelingt nur in den Riesenzellen eine ganz schwache Darstellung des Zentralapparates. Im Paraffinschnitt läßt sich das Centroplasma weder mit Sudanrot noch mit Sudanschwarz anfärbten.

Die Centrosphären geben nur eine sehr schwache *Perameisensäure-Leukofuchsinreaktion*. Mit dem SCHIFFSchen Reagens allein werden sie nicht rot gefärbt.

Diskussion.

I.

Auf Grund unserer histochemischen Untersuchungen können wir zunächst zu der Frage Stellung nehmen, welche Substanzen an dem Aufbau der vergrößerten Centrosphären beteiligt sind.

In dem Centroplasma lassen sich mit der sog. gekuppelten Tetrazoniumreaktion Proteine nachweisen. Da sich die Kupplungsfähigkeit des Zentralapparates ohne weiteres mit Benzoylchlorid blockieren läßt, ist die Annahme berechtigt, daß bei der Tetrazoniumreaktion nur aromatische Aminosäuren (Proteine) und nicht darüber hinaus noch purin- oder pyrimidinhaltige Verbindungen (MITCHELL, DANIELLI) dargestellt werden. Auch das Vorliegen eines besonderen Polymerisationsgrades oder einer besonderen räumlichen Anordnung der Polypeptidketten im Sinne von PEARSE (2) ist auf Grund dieses Befundes unwahrscheinlich.

Mit Hilfe der Ferri-Ferricyanid-Methode von CHÈVREMONT und FRÉDÉRIC haben wir ein schwaches *Reduktionsvermögen* des Zentralapparates gefunden. Da der positive Ausfall dieses Testes durch die Behandlung der Schnitte mit einer gesättigten Sublimatlösung nicht beeinträchtigt wird und auch die Basophilie des Centroplasmas nach der Perameisensäureoxydation nicht wesentlich zunimmt, ist es unwahrscheinlich, daß diese reduzierende Eigenschaft der Sphäre auf dem Vorhandensein aktiver Sulfhydrilgruppen beruht. Wegen des sehr schwachen Ausfalls der Perameisensäure-Leukofuchsinreaktion können auch Äthylenverbindungen nicht für das Reduktionsvermögen der Sphären verantwortlich gemacht werden. Es ist daher anzunehmen, daß andere organische Substanzen, wie Phenol-, Indol-, Pyrrol-, Arylaminderivate usw. (LILLIE und BURNTNER) die positive CHÈVREMONT-FRÉDÉRIC-Reaktion verursachen.

Da sich das Reduktionsvermögen durch Kaliumcyanid nicht wesentlich verstärken läßt, ist es wahrscheinlich, daß in den Centrosphären keine (oder nur außerordentlich wenige) aktive SS-Gruppen vorkommen.

Basische Proteine können mit der Fastgreen-Färbung nur in geringem Umfang nachgewiesen werden. Es muß allerdings berücksichtigt werden, daß bei der Formalinfixierung (alle Untersuchungen mußten am Ein-

sendungsmaterial des Institutes vorgenommen werden) sicher ein Teil der ursprünglich vorhandenen basischen Gruppen blockiert, bzw. zerstört worden ist. Wir können daher vorerst noch nicht abschließend zu der Frage Stellung nehmen, in welchem Maße basische Eiweißkörper am Aufbau des Centroplasmas beteiligt sind.

Das Centroplasma enthält PAS-positive Substanzen. Auf Grund der weiteren histochemischen Untersuchungen (vgl. Tabelle 1), wie des Nachweises der reversiblen Acetylierung, der Resistenz gegen Diastase und Hyaluronidase, des Fehlens der Basophilie und Metachromasie, sowie der deutlichen Tetrazoniumreaktion, muß der Schluß gezogen werden, daß es sich bei diesen PAS-positiven Stoffen um *Muco-* oder *Glykoproteide* handelt.

Die Anfärbbarkeit des Centroplasmas bei der *Hale-Methode* darf wegen des Fehlens der Basophilie und Metachromasie nicht als Hinweis auf das Vorliegen saurer Mucopolysaccharide gewertet werden. Da es bekannt ist, daß außer den sauren Polysacchariden im geringen Maße auch Eiweißkörper im histologischen Schnitt Eisen binden können, ist es wahrscheinlich, daß die Eisenaffinität der Centrosphären an die Proteinkomponente gebunden ist.

Im formalinfixierten Gefrierschnitt konnte in den Centrosphären der Epitheloid- und Riesenzellen mit Sudanschwarz eine *Lipidkomponente* dargestellt werden. Diese Sudanophilie des Zentralapparates ist außerordentlich gering und kann z. B. mit der kräftigen PAS-Reaktion überhaupt nicht auf eine Ebene gestellt werden.

Wir müssen jedoch mit der Möglichkeit rechnen, daß bei der wenig schonenden Behandlung des Gewebes während der Fixierung in nicht neutralisiertem Formalin Lipide in die Fixierungslösung diffundiert und somit dem histologischen Nachweis entgangen sind. Wir wollen uns daher auf die Feststellung beschränken, daß der Zentralapparat eine geringe, schwach mit Sudan färbbare Lipidkomponente enthält, und daß diese Fettstoffe bei der Paraffineinbettung extrahiert werden können. Über den tatsächlichen Lipidgehalt des Centroplasmas und über die chemischen Eigenschaften dieser Fettstoffe können wir an Hand unseres Materials vorerst keine sichere Aussage machen.

In den Centrosphären des von uns untersuchten Materials haben wir mit der Gallocyanin-Chromalaun- und mit der Toluidinblaufärbung *keine Nucleinsäuren* nachweisen können.

II.

Wir haben *keinen grundsätzlichen Unterschied zwischen dem Zentralapparat der Epitheloid- und Riesenzellen* feststellen können. Die Centrosphären der Riesenzellen geben zwar eine stärkere PAS-Reaktion, ihre Sudanophilie ist etwas ausgeprägter, sie binden etwas mehr Eisen und

zeigen auch ein etwas deutlicheres Reduktionsvermögen als die Sphären in den Epitheloidzellen. Der Unterschied zwischen dem Zentralapparat der Riesenzellen und der Epitheloidzellen ist jedoch ein rein quantitativer. Eine qualitative Verschiedenheit besteht nach unseren Untersuchungen nicht.

III.

Bei der Bewertung dieser Ergebnisse muß von vornherein in Rechnung gestellt werden, daß die *Befunde an krankhaft veränderten Geweben* erhoben worden sind, und daß sich die von uns untersuchten Sphären in einer Reihe von Eigenschaften von dem normalen Zentralapparat unterscheiden.

Es wurde bereits hervorgehoben, daß die Sphären im tuberkulösen Granulationsgewebe in ihrer *Größe* erheblich von dem normalen Zentralapparat abweichen. Während man normalerweise in den Zellen nur die beiden Centriolen findet und die Sphäre überhaupt kaum in Erscheinung tritt, erreicht der Zentralapparat bei der großzelligen Tuberkulose die Größe von 10—15 μ . In manchen LANGHANSSchen Riesenzellen nimmt er fast den ganzen Zelleib ein.

Darüber hinaus unterscheiden sich die vergrößerten Centrosphären anscheinend auch in ihrer *chemischen Zusammensetzung* von dem normalen Zentralapparat. Es ist uns in den Zellen von gesunden menschlichen Geweben bisher nicht gelungen, den Zentralapparat mit der PAS-Technik oder mit der Hale-Methode anzufärben. Wir halten es daher für wahrscheinlich, daß das Vorhandensein des Kohlenhydratbausteins, die Eisenbindungsfähigkeit und das Reduktionsvermögen als Zeichen für eine qualitative Veränderung, d. h. für eine abartige chemische Zusammensetzung der Sphären zu bewerten sind.

Gegen die Vermutung, daß die vergrößerten Sphären auch eine veränderte chemische Struktur besitzen, sprechen jedoch die Beobachtungen von MONNÉ und SLAUTTERBACK, sowie STICH (1), (2). Sie haben in gesunden tierischen Zellen (*Paracentrotus lividus*, *Cyclops strenuus*, usw.) den normalen Zentralapparat genau so deutlich mit der PAS-Technik darstellen können, wie uns das im tuberkulösen Granulationsgewebe gelungen ist. Da in den letztgenannten Arbeiten keine weitere histochemische Charakterisierung des Centroplasmas vorgenommen worden ist, muß die endgültige Beantwortung dieser Frage weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Unsere Befunde gestatten uns noch keine Aussage darüber, ob die vergrößerten Sphären in anderen pathologisch veränderten Geweben, z. B. in Tumoren, die gleichen histochemischen Eigenschaften besitzen wie im tuberkulösen Granulationsgewebe.

IV.

Wie ist nun diese quantitative und qualitative Veränderung des Zentralapparates zu deuten? Bereits LEWIS und HAMPERL (1) haben die Veränderung des Zentralapparates als Zeichen für eine Zellschädigung, also als einen regressiven Vorgang aufgefaßt. Diese Deutung läßt sich unseres Erachtens durch die Beobachtung stützen, daß der pathologisch veränderte Zentralapparat offenbar nicht mehr zur Einleitung und Steuerung einer mitotischen Zellteilung imstande ist.

Diese Veränderungen des Zentralapparates sind ferner mit anderen regressiven Erscheinungen der Epitheloid- und Riesenzellen, wie partiellen Verkalkungen, Kristalleinschlüssen und schließlich dem Zelltod in Verbindung gebracht worden. Wir haben jedoch bei unseren Untersuchungen keinen *sicheren* Zusammenhang zwischen diesen regressiven Veränderungen und dem Vorkommen vergrößerter, abartiger Centrosphären gefunden. Dagegen ist es uns aufgefallen, daß die nekrobiotischen LANGHANSschen Riesenzellen sehr reichlich PAS-positive Substanzen enthalten. Das Protoplasma dieser zugrunde gehenden Zellen zeigt ferner eine noch ausgeprägtere Eisenaffinität und ein noch deutlicheres Reduktionsvermögen als die Sphären. Es ist auch im Paraffinschnitt schwach mit Sudanschwarz anfärbbar und leicht basophil. Da jedoch diese PAS-positiven Stoffe in den absterbenden Zellen nicht einmal die Andeutung einer strahligen Struktur erkennen lassen, scheint es uns noch durchaus fraglich zu sein, ob sie aus den pathologisch veränderten Sphären hergeleitet werden dürfen.

Zusammenfassung.

1. Die vergrößerten Centrosphären in tuberkulösen Epitheloid- und Riesenzellen lassen sich mit der *Perjodsäure-Leukofuchsinreaktion* (PAS-Reaktion) und der *Hale-Methode* im histologischen Schnitt gut darstellen.
2. Auf Grund der Ergebnisse weiterer histochemischer Untersuchungen wird der Schluß gezogen, daß es sich bei der PAS-positiven Komponente des Zentralapparates um ein *Muco- oder Glykoproteid* handelt.
3. Mit Hilfe des Testes nach CHÈVREMONT und FRÉDÉRIC konnte ein schwaches *Reduktionsvermögen* des Centroplasmas festgestellt werden, das wahrscheinlich an den Proteinbaustein gebunden ist.
4. Im Gefrierschnitt läßt sich in den Centrosphären eine leicht extrahierbare *Lipidkomponente* nachweisen.
5. Es bestehen *keine histochemischen Unterschiede* zwischen dem Zentralapparat der Epitheloid- und Riesenzellen.

Literatur.

- BENSLEY, R. R., and J. GERSH: Anat. Rec. **57**, 217 (1933). — BORREL, A.: Ann. Inst. Pasteur **15**, 49 (1901). — CAMERON, G. R.: Pathology of the cell, S. 70 u. 221 ff. London: Oliver a. Boyd 1952. — CASTRÉN, O.: Arb. path. Inst. Helsingfors

- N. F. **3**, 191 (1925). — CHÈVREMONT, M., u. J. FRÉDÉRIC: Arch. Biol. **54**, 589 (1943). — DANIELLI, J. F.: Symposia Soc. f. Exper. Biol. **1**, 101 (1947). — GEDIGK, P.: (1) Klin. Wschr. **1952**, 1057. — (2) Verh. dtsch. Ges. Path. **1952**, 416. — GEDIGK, P., u. G. STRAUSS: Virchows Arch. **324**, 373 (1953). — HALE, C. W.: Nature (Lond.) **157**, 802 (1946). — HAMPERL, H.: (1) Med. Welt **14**, 702 (1940). — (2) Disk.-Bem. zum Vortrag GEDIGK, Verh. dtsch. Ges. Path. **1952**, 427. — (3) Virchows Arch. **319**, 265 (1950). — HERTWIG, O.: Morph. Jb. **1** (1875). — HERTWIG, G.: Im Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Bd. I/1, S. 218ff. Berlin: Springer 1929. — HERXHEIMER, G., u. W. ROTH: Beitr. path. Anat. **61**, 1 (1916). — HOTCHKISS, R. D.: Arch. of Biochem. **16**, 131 (1948). — KAY, W. W., and R. WHITEHEAD: J. of Path. **53**, 279 (1941). — LEWIS, M. R.: J. of Exper. Med. **31**, 275 (1920). — LILLIE, R. D.: (1) J. Labor. a. Clin. Med. **32**, 910 (1947). — (2) Stain Technol. **27**, 37 (1952). — LILLIE, R. D., and H. J. BURTNER: J. of Histochem. a. Cytochem. **1**, 87 (1953). — LISON, L.: Histo chimie et Cytochimie animales. Paris: Gauthier-Villars 1953. — LISON, L., et J. DAGNELIE: Bull. Histol. appl. **12**, 85 (1935). — McMANUS, J. F. A.: Nature (Lond.) **158**, 202 (1946). — McMANUS, J. F. A., and J. E. CASON: J. of Exper. Med. **91**, 651 (1950). — MITCHELL, J. S.: J. of Exper. Path. **23**, 296 (1942). — MONNÉ, L., and D. SLAUTTERBACK: Exper. Cell. Res. **1**, 477 (1950). — ORSOS, F.: Verh. dtsch. Ges. Path. **1935**, 95. — PEARSE, A. G. E.: (1) Quart. J. Microsc. Sci. **92**, 393 (1951). — (2) Histochemistry, Theoretical and Applied. London: J. a. A. Churchill Ltd. 1953. — PISCHINGER, A.: Z. Zellforsch. **3**, 169 (1926). — ROULET, F.: Methoden der Pathologischen Histologie. Wien: Springer 1948. — SANDRITTER, W.: Persönl. Mitteilung. — STEEDMAN, H. F.: Quart. J. microsc. Sci. **91**, 477 (1950). — STICH, H.: (1) Chromosoma **4**, 429 (1951). — (2) Verh. dtsch. Ges. Zool. **1951**, 256. — TIMONEN, S.: Acta obstetr. scand. (Stockh.) **31**, Suppl. 2.

Dr. PETER GEDIGK, Pathologisches Institut der Universität Bonn.