

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Köln  
(Direktor: Prof. Dr. ERNST LEUPOLD).

## Untersuchungen zur Methodik der Darstellung der Succinodehydrase im histologischen Schnitt.

Von

**A. GOEBEL und H. PUCHTLER.**

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 7. Oktober 1954.)

Unter den Fermenten der biologischen Oxydation kommt den Dehydrasen eine große Bedeutung zu. Es handelt sich dabei um Fermente, die die Übertragung von Wasserstoff auf unmittelbare Acceptoren, aber nicht auf Sauerstoff katalysieren. Aus der Gruppe der Dehydrasen bewirkt die Succinodehydrase die Übertragung von Wasserstoff von der Bernsteinsäure auf Cytochrom c oder einen anderen geeigneten Acceptor (Methylenblau, Tetrazoliumverbindungen), wobei die Bernsteinsäure zu Fumarsäure oxydiert wird. Die Succinodehydrase ist ein Bestandteil eines der wichtigsten Oxydo-Reduktionssysteme der Zelle, des Succinoxidase-Systems. Die Hauptkomponenten dieses Systems sind Bernsteinsäure, Succinodehydrase, Cytochrom c und Cytochromoxydase. Es wird angenommen, daß diese Reaktionskette noch mehr Glieder enthält, doch konnte noch nicht endgültig geklärt werden, inwieweit Flavoproteine und andere Coenzyme hierbei eine Rolle spielen.

Die morphologische Darstellbarkeit dieses Ferments ist von großer Wichtigkeit, da sie gestatten würde, genauere histologische Angaben über die Lokalisation zu machen und eventuell bestimmte morphologische Zellveränderungen mit Störungen seiner Funktion in Zusammenhang zu bringen. Störungen des Stoffwechsels könnten eventuell schon vor Manifestation in der morphologischen Struktur der Zelle sichtbar werden. Bei diesem Bemühen sind in der Vergangenheit mehrfach Versuche mit unterschiedlichen Verfahren unternommen worden, die Succinodehydrase histochemisch darzustellen, im deutschen Schrifttum insbesondere durch DOERR (1950), BECKER (1949), BECKER und QUADBECK (1950), DOERR und BECKER (1951), DOERR und v. LÜTTICHAU (1949), NEUMANN und KOCH (1953), SCHÜMMELFEDER (1949). In neuerer Zeit sind diese Methoden vervollkommen worden, insbesondere durch Steigerung der Empfindlichkeit der Reaktion und die Möglichkeit, an dünnen Schnitten zu arbeiten.

1909 stellte THUNBERG die atmungssteigernde Wirkung von Bernsteinsäure auf den isolierten Froschmuskel fest. 1910 äußerten BATELLI und STERN die Vermutung, daß dieses Phänomen als Oxydation der Bernsteinsäure durch ein beson-

ders stark an der Gewebsstruktur haftendes, nicht mit Wasser extrahierbares Agens zu deuten sei. 1914 wies EINBECK die primäre Entstehung von Fumarsäure bei diesem Prozeß nach. 1916 verwendete THUNBERG erstmals Methylenblau als Wasserstoffacceptor. Dieses Verfahren fand in der Biochemie Verwendung zur Messung der Aktivität der Succinodehydrase.

1935 versuchte SEMENOFF die Succinodehydrase im histologischen Schnitt mit Methylenblau nachzuweisen. 1941 fanden KUHN und JERCHEL, daß farblose Tetrazoliumverbindungen durch pflanzliches Gewebe in rote Verbindungen umgewandelt werden. LAKON (1942) benützte Tritetrazoliumchlorid zur Prüfung der Keimfähigkeit von Saatgut. Wurden die Gewebe für kurze Zeit auf 80° C erhitzt, so verloren sie die Fähigkeit, Tetrazoliumverbindungen zu reduzieren. Diese Thermolabilität war ein Hinweis darauf, daß die beobachteten Effekte durch Fermente ausgelöst werden. Eine Reihe von Autoren untersuchte die Reduktion von Tetrazoliumverbindungen in tierischem Gewebe. Es wurden entweder dünne Scheiben von Geweben in Tetrazoliumlösungen eingebracht, oder bei intra vitam-Versuchen Triphenyltetrazoliumchlorid intravenös oder intraperitoneal injiziert. 1951 entwickelten SELIGMAN und RUTENBURG eine Methode zum Nachweis der Succinodehydrase im unfixierten Gefrierschnitt. 1953 gelang es RUTENBURG, WOLMAN und SELIGMAN durch Zusatz von Aktivatoren unter Einhaltung anaerober Bedingungen die Empfindlichkeit der Reaktion zu erhöhen. PEARSON und DEFENDI (1954) veröffentlichten weitere Verfahren, die auf dem gleichen Prinzip aufgebaut sind.

Bei einem Vergleich der in der Literatur berichteten Ergebnisse von Untersuchungen der Succinodehydrase am Gewebsblock und an unfixierten Gefrierschnitten finden sich beträchtliche Unterschiede. Sie betreffen die Lokalisation der Fermentaktivität, die besonders bei Verwendung von Gewebsblöcken erheblich voneinander abweichende Bilder ergibt. Hierbei zeigen sich, unabhängig von der Gewebsstruktur, deutliche Intensitätsunterschiede der Reaktion in der Randzone und im Zentrum des Blocks, die Artefakte durch ungleichmäßiges Eindringen der Bebrütungslösung vermuten lassen. Die mit verschiedenen Methoden an unfixierten Gefrierschnitten gewonnenen Resultate lassen Unterschiede in der Menge des histochemisch nachweisbaren Ferments erkennen, vor allem in Geweben, die arm an Succinodehydrase sind. Es erschien daher zweckmäßig, diese Methoden in vergleichenden Untersuchungen an Serienschnitten zu überprüfen. Außerdem war es für andere Fragestellungen wünschenswert, eine Technik zu finden, die bei einfacher technischer Handhabung hohe Empfindlichkeit aufweist und somit die Untersuchung großer Serien gestattet.

#### **Prinzipien des histochemischen Nachweises der Succinodehydrase.**

Der histochemische Nachweis der Succinodehydrase besteht darin, daß durch die Succinodehydrase des Gewebes aus dem in der Bebrütungslösung vorhandenen Succinat Wasserstoff abgespalten und auf einen gleichfalls zugegebenen Acceptor übertragen wird. Durch die Reduktion kommt es entweder zu einem Farbumschlag des Acceptors (z. B. Methylenblau), oder er wird in eine wasserunlösliche, farbige Verbindung umgewandelt (Tetrazoliumverbindungen, Tellurit).

Bei der Technik nach SEMENOFF (1935) wird Methylenblau zu Leuko-methylenblau reduziert; Orte der Fermentaktivität zeigen also ein Verschwinden der Blaufärbung. Dieses negative Bild durch Bleichung des Farbstoffs gestattet keine genaue Lokalisation, da die Möglichkeit der Diffusion des nicht reduzierten Methylenblaus besteht (GLICK 1949, GOMORI 1952, PEARSE 1953). Außerdem ist das Verfahren für die Untersuchung größerer Schnittserien ungeeignet, da unter streng anaeroben Bedingungen gearbeitet werden muß, um eine Reoxydation des Leuko-methylenblaus durch atmosphärischen Sauerstoff zu vermeiden.

Kaliumtellurit wird durch die Succinodehydrase zu braun-schwarzem bis schwarzem Tellurium reduziert (GOMORI 1952). Diese Technik ergibt sehr schöne und scharfe Bilder. Da aber Telluriumverbindungen hemmend auf die Succinodehydrase wirken, ist diese Methode wenig empfindlich (COLLETT, RHEINBERGER und LITTLE 1933). Sie ist daher nur bei Geweben mit hoher Fermentaktivität anwendbar.

Bei Verwendung von Tetrazoliumsalzen als Wasserstoffacceptor werden wasserlösliche, farblose bis schwach gelbliche Tetrazoliumverbindungen zu wasserunlöslichen, roten oder blauen Formazanen reduziert. Die Tetrazoliummethode gestattet eine gute Lokalisierung der Fermentaktivität im Gewebe.

Da sich zur Darstellung demnach insbesondere die Tetrazoliumverbindungen eignen, werden in dieser Untersuchungsreihe nur die mit diesen Reagentien angestellten Versuche verglichen.

(Das von uns benutzte Tetrazol-Purpur ist laut Angabe der Herstellerfirma Bayer mit dem Neotetrazolium amerikanischer Autoren identisch.)

Bei den von uns benutzten Methoden wurde zunächst die „spontane“ Reduktion von Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) und Tetrazol-Purpur (TP) untersucht und im Anschluß daran Versuche an Rattenorganen, und zwar an ganzen Gewebsblöcken und an unfixierten Gefrierschnitten vorgenommen. Ferner wurde der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration, von Aktivatoren und die Diffusion und die diffuse Rotfärbung untersucht.

#### *I. Untersuchung der „spontanen“ Reduktion von TTC und TP.*

Phosphatpuffer	0,2 M pH 7,6	5 cm <sup>3</sup>
Natriumsuccinat	0,2 M	5 cm <sup>3</sup>
Aqua dest.		5 cm <sup>3</sup>
TTC bzw. TP	4 mg/cm <sup>3</sup>	5 cm <sup>3</sup>

Die Lösung wurde 24 Std bei 37° C stehen gelassen.

#### *II. Untersuchungen an Herz, Leber, Niere, Skelettmuskel und Fettgewebe von Ratten.*

a) *Untersuchungen am Gewebsblock.* Die Organe wurden unmittelbar nach dem Tode entnommen, in 1—2 mm dicke Scheiben geschnitten und sofort in eine der folgenden Bebrütungslösungen eingebracht:

1.	1% TTC in 0,1 M Phosphatpuffer	$p_{\text{H}}$ 7,6.
2.	Phosphatpuffer 0,1 M	$p_{\text{H}}$ 7,6 5 cm <sup>3</sup>
	Natriumsuccinat 0,2 M	5 cm <sup>3</sup>
	TP 4 mg/cm <sup>3</sup>	5 cm <sup>3</sup>
	Aqua dest.	5 cm <sup>3</sup>

Bebrütung 2 Std bei 37° C, Abspülen in Phosphatpuffer  $p_{\text{H}}$  7,6, Fixation in neutralem Formalin, Gefrierschnitte, Aufziehen aus Aqua dest., Eindecken in Glycerin-Gelatine.

b) *Untersuchungen an unfixierten Gefrierschnitten.* Die Organproben wurden unmittelbar nach der Tötung entnommen und sofort in einem Dewargefäß mit CO<sub>2</sub>-Schnee durchgefroren. Anfertigung von Serienschnitten mit dem Messertiefkühlverfahren nach SCHULZ-BRAUNS (10—15  $\mu$ ), die vom Messer direkt in die Bebrütungslösung gebracht wurden.

#### *Zusammensetzung der Bebrütungslösung.*

1. Methode nach SELIGMAN und RUTENBURG (1951):

Phosphatpuffer	0,1 M	$p_{\text{H}}$ 7,6	10 cm <sup>3</sup>
Natriumsuccinat	0,2 M		10 cm <sup>3</sup>
TP	1 mg/cm <sup>3</sup>		10 cm <sup>3</sup>
Aqua dest.			10 cm <sup>3</sup>

2 Std Bebrüten bei 37° C, Abspülen in Aqua dest. Fixation in neutralem Formalin, Eindecken in Glycerin-Gelatine.

2. Methode nach RUTENBURG, WOLMAN und SELIGMAN (1953):

Phosphatpuffer	0,2 M	$p_{\text{H}}$ 7,6	10,0 cm <sup>3</sup>
Natriumsuccinat	0,2 M		10,0 cm <sup>3</sup>
TP	2 mg/cm <sup>3</sup>		10,0 cm <sup>3</sup>
Calciumchlorid	0,33 M		0,2 cm <sup>3</sup>
Magnesiumsulfat	0,005 M		0,2 cm <sup>3</sup>
Na-Bicarbonat	0,6 M		2,0 cm <sup>3</sup>
Aluminiumchlorid	0,01 M		0,8 cm <sup>3</sup>
Aqua dest.			6,8 cm <sup>3</sup>

Bebrütung bei 37° C aerob in offenen Gefäßen und anaerob. Für die anaerobe Bebrütung wird die Lösung einige Minuten lang gekocht, in einem gut verschlossenen Gefäß auf 37° C abgekühlt und 1 Std lang Stickstoff durchgeleitet. Einbringen der Schnitte und weitere Stickstoffzufuhr während der ganzen Dauer der Bebrütung. (Bombenstickstoff mit weniger als 0,1% O<sub>2</sub>, durch 3 Waschflaschen mit alkalischer Pyrogallollösung geleitet.) Nach 2 Std Bebrütung Abspülen der Schnitte im Aqua dest. und Fixieren in 4—10%igem neutralen Formalin für 1—24 Std. Eindecken in Glycerin-Gelatine.

3. Methode nach ROSA und VELARDO (1954):

0,1% KCN in Phosphatpuffer	$p_{\text{H}}$ 8,2	0,1 M	30 cm <sup>3</sup>
Natriumsuccinat	0,5 M		4 cm <sup>3</sup>
TP	0,4%		4 cm <sup>3</sup>

4. Modifikation der Methode von RUTENBURG, WOLMAN und SELIGMAN:

Bebrütungslösung wie unter 2. Verwendung von 0,2 M Phosphatpuffer mit Zusatz von 0,2% KCN,  $p_{\text{H}}$  7,6.

Bei Methode 3 und 4 Bebrütung in gut verschlossenen Gefäßen bei 37° C für 2 Std. Abspülen der Schnitte in Aqua dest., Fixieren in neutralem Formalin, eindecken in Glycerin-Gelatine.

### *III. Untersuchung des Einflusses der Wasserstoffionenkonzentration.*

Zur Untersuchung des Einflusses der Wasserstoffionenkonzentration auf die Aktivität der Succindehydrase im histologischen Bild wurden die Bebrütungslösungen der Methoden 3 und 4 mit Phosphatpuffer von  $p_{\text{H}}$  7,6 und 8,2 verwandt.

### *IV. Untersuchung des Einflusses von Aktivatoren.*

Zur Untersuchung des Einflusses von Aktivatoren wurden der Bebrütungslösung nach ROSA und VELARDO (1954) bei  $p_{\text{H}}$  7,6 und 8,2 Calcium, Magnesium, Aluminium und Bicarbonat zugesetzt:

Phosphatpuffer	0,1 M, 0,1% KCN, $p_{\text{H}}$ 7,6 bzw. 8,2	30,0 cm <sup>3</sup>
TP	0,4%	4,0 cm <sup>3</sup>
Natriumsuccinat	0,5 M	4,0 cm <sup>3</sup>
Calciumchlorid	0,33 M	0,2 cm <sup>3</sup>
Na-Bicarbonat	0,6 M	2,0 cm <sup>3</sup>
Magnesiumsulfat	0,005 M	0,2 cm <sup>3</sup>
Aluminiumchlorid	0,01 M	0,8 cm <sup>3</sup>

### *V. Untersuchung der Diffusion.*

Die Diffusion wurde an Schnitten von Herzmuskel und von Fettgewebe untersucht. Herzmuskelschnitte wurden durch Einlegen in 90° C heißes Wasser inaktiviert, Schnitte von Fettgewebe durch 12—24 Std Trocknen bei Zimmertemperatur. Anschließend wurden unbehandelte Schnitte von Herzmuskelgewebe unter teilweiser Überdeckung der inaktivierte Schnitte aufgezogen (DANIELLI 1953, GOEBEL und PUCHTLER 1954). Bebrütung und Weiterbehandlung nach Methode b 4. Um sicher zu sein, daß in den behandelten Schnitten die Aktivität der Succindehydrase völlig aufgehoben war, wurden zur Kontrolle inaktivierte Schnitte im gleichen Arbeitsgang mitgeführt.

### *VI. Untersuchung der Rotfärbung.*

Zur Untersuchung der Bedeutung der Rotfärbung verschiedener Strukturen wurden Serienschnitte nach Methode b 4 behandelt. Die Bebrütungszeit betrug 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 und 60 min. Die eingedeckten Schnitte wurden über einige Wochen wiederholt kontrolliert.

In allen Versuchen unter II—IV dienten als Kontrollen Serienschnitte, die unter Weglassung des Substrats bebrütet wurden, sowie Serien mit Zusatz von Malonat zur Bebrütungslösung.

Eine von PEARSON und DEFENDI (1954) angegebene Methode konnte leider nicht in die vergleichenden Untersuchungen mit einbezogen werden, da die von ihnen verwandte Tetrazoliumverbindung, ein 2-(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyl-tetrazoliumchlorid, nicht zur Verfügung stand.

## Ergebnisse.

### *I. „Spontane“ Reduktion von TTC und TP.*

Bebrütungslösungen mit Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) bzw. Tetrazol-Purpur (TP) als Wasserstoffacceptor wurden ohne Zugabe von Schnitten in den Wärmeschrank bei 37° C gebracht. Nach 2—24 Std war keine Reduktion der Tetrazoliumverbindungen zu farbigen Stufen (Monoformazan, Diformazan) nachweisbar.

## *II. Untersuchungen an Organen.*

*a) Untersuchungen am Gewebsblock.* Die Oberfläche der Gewebsblöcke war nach einer Bebrütungszeit von 2 Std tief purpurrot, bei Verwendung von TP als Wasserstoffacceptor dunkelblau gefärbt. In Schnittserien zeigten die oberflächennahen Schnitte eine gleichmäßige Reaktion im Bereich des ganzen Schnittes. In etwa 0,3—0,4 mm Tiefe fand sich eine mehr fleckförmige Verteilung des Formazans. In 0,5 mm Tiefe war nur eine schmale Randzone mit positiver Reaktion vorhanden, weiter zentral im Schnitt fanden sich herdförmige Formazanablagerungen um einzelne größere Gefäße. Die Verteilung des Formazans im Gewebsblock war bei den beiden untersuchten Bebrütungslösungen gleich. Längere Bebrütung bis zu 6 Std führte zu keiner Änderung des histochemischen Bildes.

*b) An unfixierten Gefrierschnitten.* Serienschnitte wurden nach den Methoden von SELIGMAN und RUTENBURG (1951) (b 1), RUTENBURG, WOLMAN und SELIGMAN (1953) (b 2), ROSA und VELARDO (1954) (b 3) und mit einer Modifikation (b 4) der von RUTENBURG, WOLMAN und SELIGMAN (1953) angegebenen Technik behandelt. Bei einem Vergleich der Schnitte ergaben diese Methoden übereinstimmende Bilder hinsichtlich der Lokalisation der Fermentaktivität im Gewebe, die den in der Literatur beschriebenen Befunden entsprechen.

Formazanablagerungen sind in der Leber vorwiegend in der Peripherie der Leberläppchen, besonders periportal, in der Niere in den Epithelen der Tubuli und der HENLESCHEN Schleifen vorhanden, die Glomeruli und die Sammelröhren bleiben frei. Im Herzmuskel finden sich sehr dichte Ablagerungen entlang den Herzmuskelfasern, im Skelettmuskel unterschiedlich intensive Reaktionen der einzelnen Muskelfasern.

Dagegen fanden sich sehr deutliche Unterschiede in der Intensität der Reaktion, d. h. in der Menge des abgelagerten Formazans. Die mit der Methode nach SELIGMAN und RUTENBURG (1951) behandelten Schnitte zeigten nur geringe Formazanablagerung und diffuse Rosafärbung des Gewebes. Die stärkste Reaktion fand sich in den entsprechend den Methoden b 2 und b 4 behandelten Schnitten. Die mit diesen beiden Verfahren erhaltenen Bilder waren völlig identisch. Mit der Technik nach ROSA und VELARDO zeigten sich nur geringe Unterschiede gegenüber den Ergebnissen mit den Methoden b 2 und b 4, die Formazanablagerungen waren bei der erstgenannten Methode etwas geringer. Auffallend war das Auftreten von vereinzelten Formazangranula in den Glomeruli der Niere; bei den anderen Methoden blieben die Glomeruli frei.

## *III. Untersuchung des Einflusses der Wasserstoffionenkonzentration.*

Serienschnitte wurden mit der Methode nach ROSA und VELARDO (1954) und mit der Modifikation der Technik nach RUTENBURG, WOLMAN und SELIGMAN (1953) behandelt. Der  $p_{\text{H}}$  der Bebrütungslösung wurde

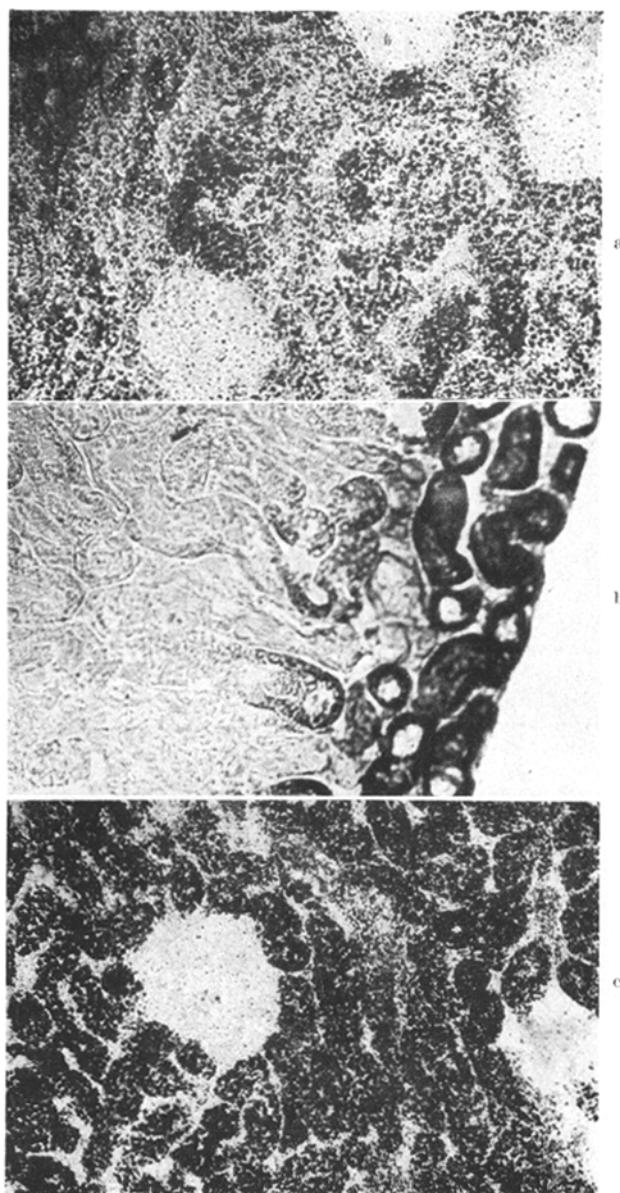


Abb. 1a—c. Niere, Vergr. 120fach, a und b Reaktion am Gewebsblock. a Aus oberflächlicher Schicht. b Aus 0,4—0,5 mm unter der Oberfläche. c Reaktion am unfixierten Gefrierschnitt.

bei beiden Methoden auf 7,6 und 8,2 eingestellt. Ein Vergleich der Schnitte ließ bei der Methode b4 keinen sicheren Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Intensität der Reaktion erkennen. Da-

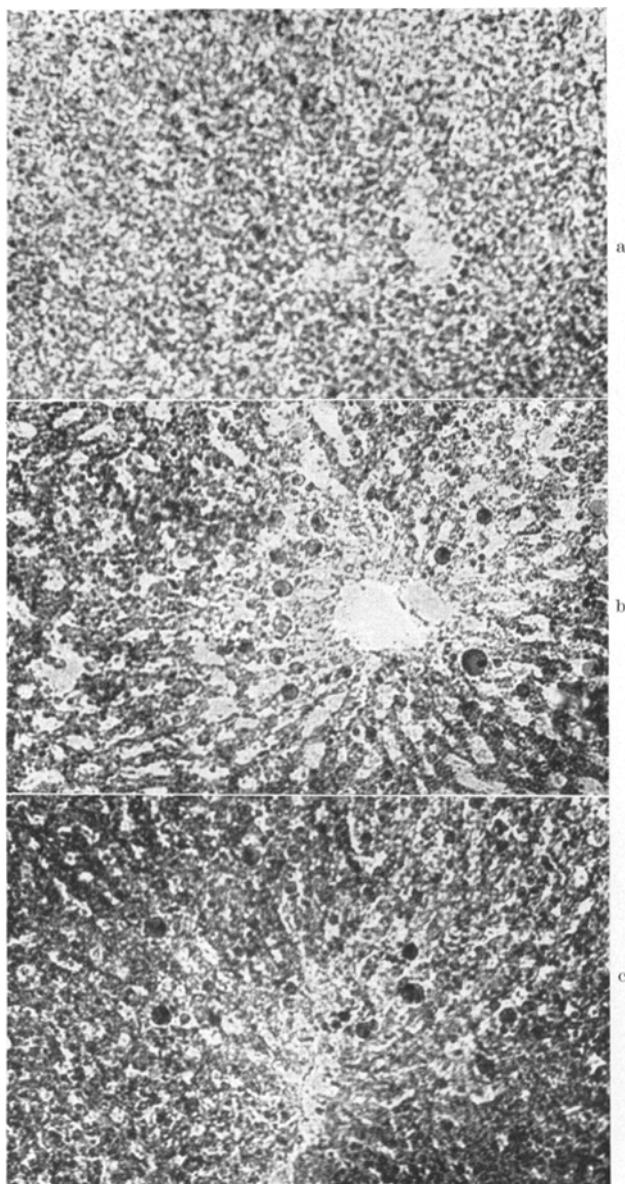


Abb. 2 a—c. Leber. Vergr. 120fach. a Methode nach SELIGMAN und RUTENBURG (b1 des Textes). b Methode nach ROSA und VELARDO (b3 des Textes). c Modifikation der Methode nach RUTENBURG, WOLMAN und SELIGMAN (b4 des Textes). In b und c positive Reaktion an Fetttropfen.

gegen war bei der Technik nach ROSA und VELARDO (1954) bei  $p_H$  7,6 der Bebrütungslösung die Formazanablagerung deutlich vermindert gegenüber den Ergebnissen bei  $p_H$  8,2.

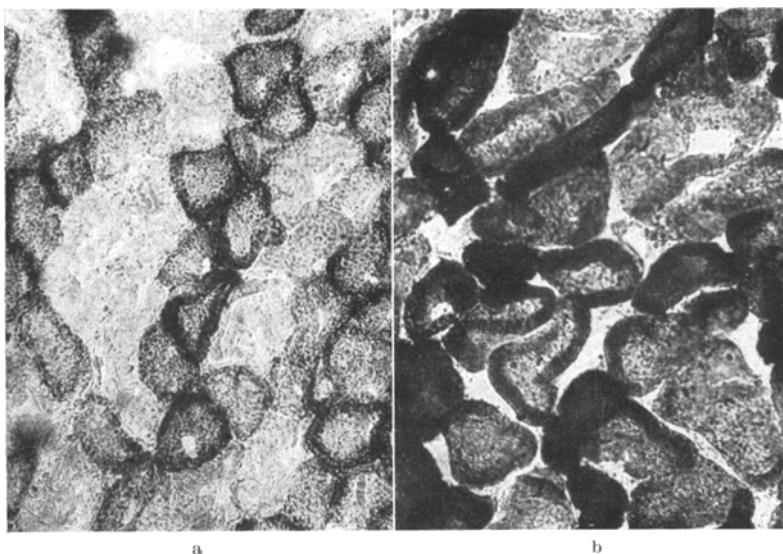


Abb. 3 a u. b. Skeletmuskel. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Reaktion Vergr. 120fach. a Methode nach ROSA und VELARDO, pH 7,6. b Methode nach ROSA und VELARDO, pH 8,2.

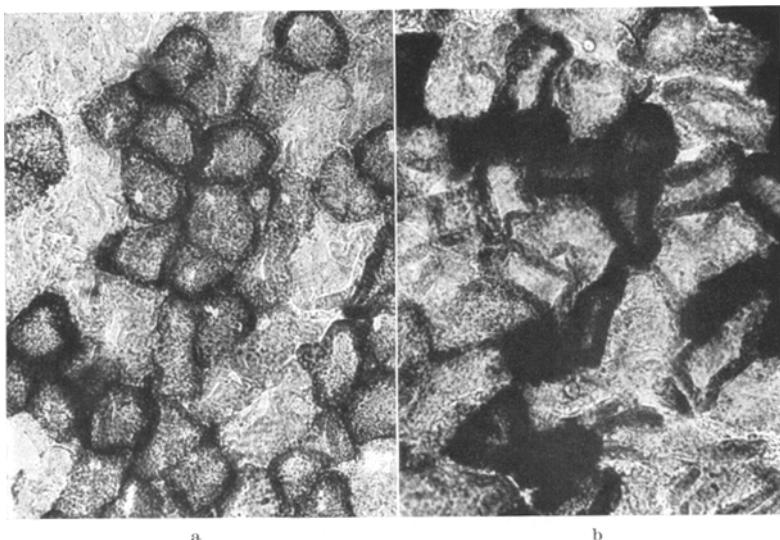


Abb. 4 a u. b. Skeletmuskel. Einfluß von Aktivatoren auf die Reaktion. Vergr. 120fach  
a Modifikation der Methode nach RUTENBURG, WOLMAN und SELIGMAN ohne Zusatz von Aktivatoren. b Modifikation der Methode nach RUTENBURG, WOLMAN und SELIGMAN mit Aktivatoren.

#### *IV. Untersuchung des Einflusses von Aktivatoren.*

Ein Vergleich von Serienschnitten, die nach der Methode von ROSA und VELARDO (1954) mit Bebrütungslösungen von  $p_H$  7,6 und  $p_H$  8,2

mit und ohne Zusatz von Aktivatoren behandelt wurden, zeigte bei  $p_{\text{H}}$  8,2 der Bebrütungslösung nur einen geringen Einfluß der Aktivatoren auf die Intensität der Reaktion. Bei  $p_{\text{H}}$  7,6 der Bebrütungslösung fand sich nach Zusatz von Aktivatoren eine erheblich stärkere Ablagerung von Formazan. Bei Zusatz von Aktivatoren zur Bebrütungslösung waren die bei  $p_{\text{H}}$  7,6 und 8,2 erhaltenen Bilder identisch. Serienschnitte, die mit diesen Bebrütungslösungen und nach der Methode von RUTENBURG, WOLMAN und SELIGMAN (1953) sowie nach der oben beschriebenen Modifikation dieser Technik (b4) behandelt wurden, ließen keine Unterschiede erkennen.

#### *V. Untersuchung der Diffusion.*

Bei teilweiser Überdeckung eines inaktivierten Herzmuskel schnittes mit einem unbehandelten war nach 2 Std Bebrütung noch keine Diffusion nachweisbar. Bei teilweiser Überdeckung eines inaktivierten Schnittes von Fettgewebe mit einem unbehandelten Herzmuskel schnitt fand sich eine 1—2 Zelldurchmesser breite Zone mit rötlich gefärbten Fetttropfen. Bei Verlängerung der Bebrütungszeit auf 12 Std blieb die Reaktion auf diesen schmalen Saum beschränkt (Methode b4).

#### *VI. Untersuchung der Rotfärbung.*

Serienschnitte wurden 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 und 60 min bebrütet (Methode b4). Nach 2 min fand sich eine diffuse rosa Färbung des ganzen Schnittes, mit wenigen blauen Granula. Mit zunehmender Dauer der Bebrütungszeit wurde mehr und mehr Formazan abgelagert. Die diffuse Rosafärbung des Gewebes trat zurück, nur Lipoidtropfen waren deutlich rot gefärbt. Wiederholte Kontrollen der kurz (2—10 min) bebrüteten, in Glycerin-Gelatine eingedeckten Schnitte über mehrere Tage und Wochen zeigten ein allmähliches Verschwinden der diffusen rötlichen Färbung, während Lipoidtropfen keine Verminderung der Farbintensität erkennen ließen.

#### **Besprechung.**

Diese Ergebnisse lassen deutliche Unterschiede in der Lokalisation der Fermentaktivität bei Bebrütung von Gewebsblöcken (1—2 mm dick) und von unfixierten Gefrierschnitten ( $10-15 \mu$ ) erkennen. Bei Vergleich der mit verschiedenen Methoden an Gefrierschnitten gewonnenen Resultate zeigen sich Unterschiede in der Intensität der Reaktion.

Über die unterschiedlichen Bilder bei Untersuchung der Succinodehydrase an Gewebsblöcken ist in der Literatur wiederholt berichtet worden (RUTENBURG, GOFSTEIN und SELIGMAN 1950, SHELTON und SCHNEIDER 1952, NEUMANN und KOCH 1953). Eine Ablagerung von Formazan erfolgt nur in den oberflächennahen Anteilen. SHELTON und SCHNEIDER (1952) fanden, daß dieser Randsaum breiter war, wenn die

Gewebe während der Dauer der Bebrütung im Warburg-Apparat geschüttelt wurden. Es kann mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß die Begrenzung der positiven Reaktion auf die Randgebiete auf einem mangelhaften Eindringen der Bebrütungslösung, besonders des Tetrazols, in das Gewebe beruht. Dafür spricht auch das herdförmige Auftreten von Formazanablagerungen um Gefäße in den tieferen Schichten der Blöcke. Auf die Frage der Spezifität des Succinodehydrase-nachweises an Gewebsblöcken soll später eingegangen werden.

Versuche zum Succinodehydrasenachweis an unfixierten Gefrierschnitten ergaben mit verschiedenen Methoden identische Lokalisation der Fermentaktivität im Gewebe. Die Intensität der Reaktion, d. h. die Menge des gebildeten Formazans war dagegen sehr unterschiedlich. Es schien daher zweckmäßig, an Hand der Literatur und experimenteller Untersuchungen nachzuprüfen, welche Bedingungen, besonders hinsichtlich der Aufarbeitung des Gewebes, Zusammensetzung der Bebrütungslösung, Wasserstoffionenkonzentration und Aktivatoren für einen optimalen Nachweis der Succinodehydrase im histologischen Schnitt erforderlich sind.

#### *Vorbereitung des Gewebes.*

Das Gewebe muß möglichst rasch nach der Entnahme weiterverarbeitet werden, die Zeitspanne zwischen Entnahme und histologischer Aufarbeitung soll 15 min nicht überschreiten. Werden Organproben sofort in Trockeneis oder  $\text{CO}_2$ -Schnee durchgefroren, so können sie in gefrorenem Zustand bis zu 4 Std ohne erheblichen Aktivitätsverlust aufbewahrt werden (GOMORI 1952). Eine Fixation des Gewebes ist nicht möglich, da die Succinodehydrase durch Fixationsmittel inaktiviert wird. Nach SELIGMAN und RUTENBURG beträgt die Hemmung der Succinodehydrase nach 4 Std Fixation in Formalin 100%, in kaltem Aceton 40%, in Alkohol 80% und in Methanol 70%. NEUMANN und KOCH berichten, daß auch Gefriertrocknung das Ferment inaktiviert. Die Untersuchungen müssen also an unfixierten Gefrierschnitten durchgeführt werden, und die Schnitte müssen vom Messer direkt in die Bebrütungslösung gebracht werden, da nach Trocknen an der Luft eine Inaktivierung des Fermentes möglich ist.

#### *Einfluß des Sauerstoffs.*

Wie schon erwähnt, spaltet die Succinodehydrase aus Succinat Wasserstoff ab, überträgt ihn auf einen geeigneten Acceptor. Der physiologische Acceptor ist das Cytochromsystem, bzw. der im Gewebe vorkommende Sauerstoff. Durch die Succinodehydrase wird Wasserstoff vom Succinat auf Cytochrom c übertragen. Die Reoxydation des reduzierten Cytochrom c erfolgt durch Sauerstoff mittels der Cytochromeoxydase (HORECKER, STATZ und HOGNESS 1939). Bei den hier unter-

suchten Methoden werden der Bebrütungslösung Tetrazoliumverbindungen zugegeben, die als Wasserstoffacceptoren wirken und zu farbigen, wasserunlöslichen Formazanen reduziert werden. Sind in der Bebrütungslösung, bzw. im histologischen Schnitt Sauerstoff und ein funktionsfähiges Cytochromsystem vorhanden, so wird ein Teil des abgespaltenen Wasserstoffs nicht auf das Tetrazolium, sondern auf das Cytochromsystem und Sauerstoff übertragen. Es wird also weniger Tetrazolium zu Formazan reduziert; im histologischen Bild ist daher nur eine geringe Reaktion nachweisbar. Bei Geweben, die arm an Succinodehydrase sind, kann dadurch die Reaktion sogar negativ ausfallen.

RUTENBURG, WOLMAN und SELIGMAN (1953) versuchten daher — ebenso wie in der Biochemie — den histochemischen Nachweis der Succinodehydrase unter anaeroben Bedingungen durchzuführen. Sie kochten die Bebrütungslösung und leiteten eine Stunde lang Stickstoff durch, um den Sauerstoff im System zu erschöpfen. Nach Einbringen der Schnitte wurde für die Dauer der Bebrütung weiter Stickstoff durchgeleitet. Diese Methode ergibt sehr schöne und gut reproduzierbare Bilder. Die dauernde Stickstoffzufuhr während der Bebrütung ist jedoch unhandlich und erschwert die Untersuchung großer Schnittserien. Außerdem führen die durchperlenden Gasblasen häufig zu einer Beschädigung dünner Schnitte. Ein von LAVES (1949) angegebenes Verfahren ist ebenfalls für die Untersuchung großer Schnittserien wenig geeignet.

Es schien daher zweckmäßig, nach anderen Mitteln zu suchen, um die Übertragung des Wasserstoffs auf Sauerstoff zu verhindern. Da nach den derzeitigen Kenntnissen eine Blockade des Cytochromsystems der Zelle durch KCN stattfindet, müßte Zusatz von KCN zur Bebrütungslösung ebenfalls die Übertragung von Wasserstoff auf Sauerstoff hemmen (POTTER 1941, KEILIN und HARTREE 1949). ROSA und VELARDO veröffentlichten 1954 eine Technik, die auf diesem Prinzip aufgebaut ist. Die Ergebnisse unterscheiden sich sehr wenig von den mit der Methode nach RUTENBURG, WOLMAN und SELIGMAN (1953) erhaltenen Resultaten. Die Unterschiede sollen später näher besprochen werden. Unter den genannten Bedingungen nimmt das Tetrazol den aus Succinat abgespaltenen Wasserstoff auf. Es wird also erheblich mehr Tetrazol zu Formazan reduziert und damit im histologischen Schnitt abgelagert als bei Bebrütung unter aeroben Bedingungen. KUN und ABOOD (1949) gelang es, die Reduktion von Tetrazol durch die Succinodehydrase zu einer quantitativen biochemischen Methode auszubauen.

#### *Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration.*

Von den meisten Untersuchern wird für die histochemische Reaktion ein  $p_{\text{H}}$ -Optimum um 7,6 angegeben. ROSA und VELARDO (1954) verwenden eine Bebrütungslösung von  $p_{\text{H}}$  8,2 und berichten über eine

deutliche Steigerung der Fermentaktivität bei diesem höheren  $p_H$ -Wert. In der biochemischen Literatur schwanken die Angaben für den optimalen  $p_H$  zwischen 7,5 und 9, für die anaerobe Reaktion liegen sie meist oberhalb  $p_H$  8 (OHLSSON 1921, QUASTEL und WHETHAM 1924, QUASTEL und WOOLDRIDGE 1927, LEHMANN 1929, 1933, COOK und ALCOCK 1931, FRANKE 1934, McGAVRAN und RHEINBERGER 1933, COOPERSTEIN und LAZAROW 1951, BRODIE und GOTS 1951). Damit stimmen die oben erwähnten Untersuchungen bei  $p_H$  7,6 und 8,2 der Bebrütungslösung nach ROSA und VELARDO (1954) überein. Trotzdem erscheint es zweckmäßig, bei histochemischen Untersuchungen bei einem  $p_H$  um 7,6 zu arbeiten, und zwar aus folgenden Gründen: In der Biochemie werden Enzympräparate verwandt, die von anderen Gewebsbestandteilen weitgehend gereinigt sind, während in der Histochemie Gewebsschnitte untersucht werden, die neben der Succinodehydrase zahlreiche andere chemische Verbindungen enthalten. Bebrütet man Gefrierschnitte unter Weglassung von Succinat bei  $p_H$  7,6, so bleiben die Schnitte völlig farblos, bei  $p_H$  8,5 kommt es zu einer diffusen, blaßrosa Färbung des Gewebes. Bei  $p_H$ -Werten um 9 und höher treten deutlich positive Reaktionen auf, die durch im Gewebe vorhandene reduzierende Gruppen wie Sulphydryl-, Enol-, Aldol- und Ketogruppen bedingt sind (BARNETT und SELIGMAN 1952, SELIGMAN und RUTENBURG 1951). Da unter den zum Nachweis der Succinodehydrase üblichen Versuchsbedingungen diese Gruppen Tetrazoliumverbindungen bei einem  $p_H$  um 9 reduzieren, scheint es zweckmäßig, den  $p_H$  der Bebrütungslösung so zu wählen, daß diese nicht-fermentativen Reaktionen mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden können. Es ist daher ratsam, die Bebrütungslösung auf  $p_H$  7,6 einzustellen, vor allem, wenn keine elektrometrische Methode zur Bestimmung des  $p_H$  zur Verfügung steht, um auf jeden Fall zu verhindern, daß oberhalb  $p_H$  8 gearbeitet wird.

#### *Einfluß von Aktivatoren.*

Aus biochemischen Versuchen ist bekannt, daß verschiedene Ionen, z. B. Calcium, Aluminium, Magnesium, einige seltene Erden, Chrom und Mangan die Succinodehydrase aktivieren (AXELROD, SWINGLE und ELVEHJEM 1941, AHLGREEN 1925, HORECKER, STATZ und HOGNESS 1939, KEILIN und HARTREE 1949, POTTER 1941, SWINGLE, AXELROD und ELVEHJEM 1942). Auffallend ist hierbei, daß die aktivierende Wirkung nur bei Verwendung von Phosphatpuffer zu beobachten ist. Es wird angenommen, daß diese Aktivierung auf der Ausfällung von unlöslichen Phosphaten beruht, die Oberflächen für die Adsorption und Reorientierung von Komponenten des Fermentsystems darstellen könnten (HORECKER, STATZ und HOGNESS 1939, POTTER 1941, KEILIN und HARTREE 1949).

RUTENBURG, WOLMAN und SELIGMAN (1953) setzten der Bebrütungslösung Natriumbicarbonat, Calciumchlorid, Aluminiumchlorid und Magnesiumsulfat zu. Merkwürdigerweise aktivieren Bicarbonat-Ionen die Succinodehydrase in Gewebsschnitten sehr stark, während sie bei Homogenaten unwirksam sind (RUTENBURG, WOLMAN und SELIGMAN 1953). GREENSTEIN und CHALKLEY (1945) berichten, daß die Aktivität der Dehydrogenasen in dialysierten Leberextrakten durch Bicarbonat erhöht wird. Außerdem wurde eine Fixierung von  $\text{CO}_2$  während der Umwandlung von Fumarat zu Lactat beobachtet (EVANS, SLOTIN und VENNESLAND 1942, EVANS, VENNESLAND und SLOTIN 1943, WOOD, VENNESLAND und EVANS 1945). RUTENBURG, WOLMAN und SELIGMAN (1953) diskutieren die Möglichkeit, daß Bicarbonat-Ionen Fermentsysteme aktivieren könnten, die beim Abbau von Fumarat eine Rolle spielen. Dies könnte darauf hindeuten, daß bei dem histochemischen Nachweis der Succinohydrase ein Teil eines Fermentzyklus dargestellt wird, dessen erste Stufe die Dehydrierung von Succinat ist (POTTER 1946, QUASTEL und WHEATLEY 1931).

Wie oben beschrieben wurde, ergab Zusatz der von RUTENBURG, WOLMAN und SELIGMAN (1953) angegebenen Aktivatoren zu der Bebrütungslösung nach ROSA und VELARDO (1954) bei  $\text{pH}$  8,2 eine geringe, bei  $\text{pH}$  7,6 eine deutliche Steigerung der histochemisch nachweisbaren Fermentaktivität. Bei Serienschnitten fanden sich im histologischen Bild keine Unterschiede gegenüber den Resultaten mit der Methode nach RUTENBURG, WOLMAN und SELIGMAN (1953) oder mit der Modifikation dieser Methode. Diese Beobachtung ist ein weiterer Grund, bei histochemischen Untersuchungen Bebrütungslösungen mit einem  $\text{pH}$  um 7,6 zu verwenden.

#### *Spezifität der Reaktion.*

In der Literatur wurde häufig die Frage diskutiert, ob die Reduktion des Tetrazols zu Formazan allein durch die Succinodehydrase bewirkt wird, oder ob hierbei etwa noch andere Dehydrogenasen eine Rolle spielen könnten, die aus endogenen Substraten Wasserstoff abspalten und auf das Tetrazol übertragen. Für die Spezifität der Reaktion spricht

1. Das Ausbleiben der Formazanbildung, wenn das Succinat aus der Bebrütungslösung weggelassen wird.
2. Die Hemmung durch Malonat. Malonat ist seit langem als spezifischer Hemmstoff für die Succinodehydrase bekannt (QUASTEL und WHEATLEY 1931, MANN und QUASTEL 1941, DOERR und BECKER 1951). Es wird angenommen, daß es infolge seiner ähnlichen chemischen Struktur in der Lage ist, das Succinat vom Ferment zu verdrängen (DAS 1937, ELLIOTT und GREIG 1937, GREVILLE 1936, PADYKULA 1952, QUASTEL und WHETHAM 1925, THUNBERG 1920). Die gleiche Wirkung hat Oxalacetat (DAS 1937, KEILIN und HARTREE 1949, PARDEE und POTTER 1948,

SWINGLE, AXELROD und ELVEHJEM 1942). Geringe Mengen von Oxalacetat können auch während der Bebrütung entstehen, indem Fumarat über Malat in Oxalacetat umgewandelt wird (ROSA und VELARDO 1954). Nach DAS (1937) ist die Oxalessigsäure ein 80mal stärkerer Inhibitor als Malonsäure. Bei Zusatz von KCN zur Bebrütungslösung wird die Oxalessigsäure durch Bildung von Cyanhydrin abgefangen.

3. Für die Spezifität der histochemischen Reaktion spricht außerdem die Aktivierbarkeit durch Ionen, die in der Biochemie als Aktivatoren der Succinodehydrase bekannt sind.

Bei Untersuchungen an Gewebsblöcken ist die Mitwirkung anderer Dehydrogenasen, z. B. Citricodehydrase, Malicodehydrase, Fumarsäudehydrase, denkbar. Gefrierschnitte bieten demgegenüber den Vorteil, daß endogene Substrate leichter ausgewaschen werden können. Außerdem dürfte hier auch die unterschiedliche Kryolabilität der Fermente eine Rolle spielen (SHELTON und SCHNEIDER 1952). In biochemischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die meisten Dehydrogenasen durch Gefrieren zerstört werden, während die Succinodehydrase sehr kälteresistent ist (THUNBERG 1920, FRANKE 1934, 1940). Demnach würden schon bei der Herstellung der Gefrierschnitte andere Dehydrogenasen inaktiviert werden. Zudem benötigen die meisten dieser Dehydrasen Cofermente, die unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht in ausreichender Menge vorhanden sind.

Völlig unentschieden ist dagegen die Frage, ob es sich bei der Succinodehydrase um ein einzelnes Ferment oder um ein Fermentsystem, eventuell mit Mitwirkung eines Flavoproteins handelt, ob als Wasserstoffüberträger ein Flavoprotein zwischengeschaltet ist, oder ob die Succinodehydrase selbst ein Flavoprotein ist (AXELROD, SWINGLE und ELVEHJEM 1942, BIELIG, RAUSCHE und HAARDICK 1949, BLACK, ZWEIFACH und SPEER 1953, BRODIE und GOTS 1951, 1952, FRANKE 1940, JENSEN, SACKS und BALDANSKI 1951, KUN 1951, MUDD, BRODIE, WINTERSHEID, HARTMANN, BEUTNER und McLEAN 1951, PADYKULA 1952, SHELTON und SCHNEIDER 1952, SLATER 1949, WALDSCHMITZ-LEITZ und SPRINZ 1952). Die hier besprochenen histochemischen Methoden erlauben keinerlei Aussagen zur Einzahl oder Mehrzahl des die Übertragung von Wasserstoff des Succinats auf einen geeigneten Acceptor katalysierenden Ferments. Es wäre natürlich denkbar, daß durch eine diffusible Komponente im Succinodehydrasesystem die Intensität der histochemischen Reaktion beeinflußt werden könnte.

#### *Diffusion.*

Diformazane des Triphenyltetrazoliumchlorids und des Tetrazol-Purpur sind bei  $p_H$  7,6 bzw. 8,2 in Wasser unlöslich. Sie werden durch den Luftsauerstoff nicht oxydiert. Eine Diffusion des Diformazans ist demnach wenig wahrscheinlich. Aus biochemischen Untersuchungen ist

bekannt, daß das Ferment selbst sehr fest an der Gewebsstruktur haftet. Bereits 1910 berichteten BATELLI und STERN, daß die Oxydation der Bernsteinsäure durch ein besonders fest an der Gewebsstruktur haftendes, nicht mit Wasser extrahierbares Agens erfolge. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, daß etwa 70—75% der Succinodehydrase in den Mitochondrien lokalisiert sind (HOGEBOOM, CLAUDE und HOTCHKISS 1946, HOGEBOOM, SCHNEIDER und PALADE 1948, SCHNEIDER 1946a, 1946b, 1953, SCHNEIDER und HOGEBOOM 1950, SCHNEIDER, CLAUDE und HOGEBOOM 1948, LANG 1952, HARMANN 1950, HOGEBOOM und SCHNEIDER 1952). Der Zellkern enthält keine nachweisbaren Mengen des Ferments (DOUNCE 1952). Er bleibt auch in histochemischen Untersuchungen stets frei von Formazan. Auf Grund der festen Bindung der Succinodehydrase an die Gewebsstruktur darf angenommen werden, daß auch unter den Bedingungen der histochemischen Methodik keine wesentliche Diffusion von Ferment auftritt.

Eine Möglichkeit von Diffusionsartefakten liegt in der leichten Löslichkeit des Diformazans in Lipoiden. In lipoidreichen Organen kann Diformazan in den Lipoiden in Lösung gehen und somit diffundieren. Fetttropfen in der Nachbarschaft hochaktiver Strukturen sind deutlich rot gefärbt. In Versuchen konnte gezeigt werden, daß bei Aufziehen eines frischen Herzmuskel schnittes unter teilweiser Überdeckung von inaktiviertem Fettgewebe im inaktivierten Schnitt ein 1—2 Zelldurchmesser breiter Saum deutlich rot gefärbter Fetttropfen zu beobachten ist. Diese Anfärbung muß wohl mit einer Lösung von Diformazan erklärt werden. Ob Fettgewebe selbst Succinodehydrase enthält, konnte noch nicht eindeutig entschieden werden. PADYKULA (1952) verneint das Vorkommen von Succinodehydrase in Fettgewebe, andere lassen diese Frage offen (SELIGMAN und RUTENBURG 1951, SHELTON und SCHNEIDER 1952, RUTENBURG, WOLMAN und SELIGMAN 1953, ROSA und VELARDO 1954).

#### *Bedeutung der Rotfärbung.*

Die beim histochemischen Nachweis der Succinodehydrase mit Tetrazol-Purpur zu beobachtende Rotfärbung mancher Strukturen kann auf zweierlei Ursachen beruhen:

1. Auf einer Lösung von dunkelblauen Diformazangranula in Lipoiden der Zellen. In Lipoid gelöstes Diformazan erscheint in durchfallendem Licht rot (SELIGMAN und RUTENBURG 1951, PADYKULA 1952, RUTENBURG, WOLMAN und SELIGMAN 1953, NEUMANN und KOCH 1953).
2. Auf einer unvollständigen Reduktion des Tetrazol-Purpur zu rotem Monoformazan. Dieses Monoformazan ist leichter wasserlöslich und weniger beständig gegen Luftsauerstoff als das Diformazan. Es wird angenommen, daß — bei ausreichender Bebrütungszeit — die Bildung von Monoformazan einen Hinweis auf Stellen mit niedriger

Fermentaktivität gibt (SELIGMAN und RUTENBURG 1951, PADYKULA 1952, RUTENBURG, WOLMAN und SELIGMAN 1953, ROSA und VELARDO 1954).

Bei Bebrütung stark aktiver Gewebe für kurze Zeiten (2—10 min) kommt es zunächst zu einer diffusen Rotfärbung des Schnittes, mit zunehmender Ablagerung von dunkelblauen Diformazangranula und deutlicher Rotfärbung von Lipoidtröpfchen (Fettfärbung von Serienschnitten). Werden die eingedeckten Schnitte über einige Wochen immer wieder kontrolliert, so findet sich eine allmähliche Verminderung der diffusen Rosafärbung, während die Farbtensität der Fettröpfchen gleich bleibt. Diese Beobachtung läßt es möglich erscheinen, daß es sich bei der diffusen Färbung zum Teil um Monoformazan handelt, das allmählich wieder zu farblosem Tetrazol-Purpur oxydiert wird, während das in Lipoiden gelöste Diformazan nicht angegriffen wird.

#### *Einfluß der Formalinfixation.*

Nach der Bebrütung können die Schnitte in Formalin fixiert werden, da Diformazan nicht wasserlöslich ist. Es ist jedoch darauf zu achten, daß neutrales bzw. gepuffertes Formalin verwandt wird, da Formazane bei pH 4,5 in Lösung gehen (SHELTON und SCHNEIDER 1952). Da Formazane auch in Alkohol und Aceton löslich sind, muß in Glycerin-Gelatine eingedeckt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit, in der nur die Methodik des histochemischen Nachweises der Succinodehydrase untersucht wurde, soll auf die Verteilung der Succinodehydrase in den Geweben und auf Veränderungen der Fermentaktivität unter experimentellen Bedingungen nicht näher eingegangen werden. Da Untersuchungen zu diesen Fragen im Schrifttum weit verstreut sind, sollen hier nur einige Arbeiten aus verschiedenen Gebieten angeführt werden. Die Versuche wurden mit unterschiedlichen Methoden durchgeführt.

*Botanik:* KUHN und JERCHEL (1941), LAKON (1942), MATTSON, JENSEN und DUTCHER (1947), SONNENBLICK, ANTOPOL und GOLDMANN (1949), JENSEN, SACKS und BALDANSKI (1951), TEUBNER und MURNECK (1952).

*Bakteriologie:* BIELIG, KAUSCHE und HAARDICK (1949), NARAHARA, QUITTNER, GOLDMAN und ANTOPOL (1949), MUDD, BRODIE, WINTERSCHEID, BEUTNER und MCLEAN (1951), MUDD, WINTERSCHEID, DELAMATER und HENDERSON (1951).

*Meerestiere:* BIELIG und QUERNER (1949).

*Verteilung der Succinodehydrase in tierischem Gewebe:* ANTOPOL, GLAUBACH und GOLDMAN (1949), BECKER und QUADBECK (1950), BLACK, SPEER und OPLER (1950), DOERR (1950), DOERR und LÜTTICHAU (1949), HAYEK (1950), HAYEK und THUNS (1952), MEYER-ARENDE (1950), NEUMANN (1952), NEUMANN und KOCH (1953), PADYKULA (1952), PEARSON und DEFENDI (1954), ROSA und VELARDO (1954), RUTENBURG, GOFSTEIN und SELIGMAN (1950), RUTENBURG, WOLMAN und SELIGMAN (1953), SHELTON und SCHNEIDER (1952), SELIGMAN und RUTENBURG (1951).  
*Thyreidea:* GODDARD und SELIGMAN (1953). *Ovar:* FORAKER und DENHAM (1952).

*Nebenniere:* ZWEIFACH, BLACK und SHORR (1951). *Pankreas und Speicheldrüsen:* STIER (1952). *Blut-Hirnschranke:* LEDUC und WISLOCKI (1952). *Untersuchung von Giftwirkungen:* BECKER (1949), DOERR (1950), DOERR und BECKER (1951), MUSTAKALLIO und TELKKÄ (1953). *Untersuchungen nach Bestrahlung:* FORAKER, DENHAM und JOHNSTON (1953). *Einfluß von Hormonen:* DAVIS, MEYER und McSHAN (1949). *Veränderungen der Niere bei Hochdruck:* ZWEIFACH, BLACK und SHORR (1950).

*Untersuchungen am Menschen.* Hier sei vor allem auf die Arbeit von MEYER ZUM GOTTESBERGE (1954) über die Lokalisation verschiedener Fermente in der Tonsille und auf eine Veröffentlichung von WACHSTEIN (1950) über das Vorkommen der Succinodehydrase in Zellen von normalem und leukämischem Blut und Knochenmark verwiesen.

*Untersuchungen an Tumoren.* Es wurde wiederholt versucht, die Untersuchung der Succinodehydrase für die Tumordiagnostik heranzuziehen. Die Ergebnisse verschiedener Untersucher weichen erheblich voneinander ab (BLACK, KLEINER und SPEER 1950, BLACK, OPLER und SPEER 1950, DOERR 1950, MACKENZIE und FULLER 1950, SCHUEERMANN 1950, SELIGMAN, GOFSTEIN und RUTENBURG 1949, SHELTON und SCHNEIDER 1952, SMITH 1951, STRAUS, CHERONIS und STRAUS 1948). DOERR (1950), SELIGMAN, GOFSTEIN und RUTENBURG (1949), SHELTON und SCHNEIDER (1952) und SMITH (1951) konnten zeigen, daß Tumorzellen unterschiedlich reagieren; die Intensität der Reaktion ist oft nicht stärker als in anderen Geweben. Sie betrachten daher den Succinodehydrasenachweis als ungeeignet für die Tumordiagnostik.

#### Zusammenfassung.

In vergleichenden Untersuchungen mit verschiedenen Methoden zur histochemischen Darstellung der Succinodehydrase wird festgestellt, daß Untersuchungen an Gewebsblöcken wenig geeignet sind und der Nachweis am unfixierten Gefrierschnitt eine gute Darstellbarkeit der Succinodehydrase ergibt.

Als geeignete und verhältnismäßig einfach zu handhabende Methode wird eine vereinfachende Modifikation des Verfahrens von RUTENBURG, WOLMAN und SELIGMAN 1953 angegeben, die bei einem pH von 7,6 (Phosphatpuffer mit Zusatz von 0,2% KCN) reproduzierbare Bilder ergibt, die mit der guten Originalmethode übereinstimmen.

Wir danken Herrn Prof. Dr. GOMORI für wertvolle kritische Ratschläge und Herrn Prof. Dr. GRAFFLIN für die Einladung und Gastfreundschaft an seinem Institut, die dem einen von uns einen längeren Aufenthalt in den Vereinigten Staaten ermöglichte.

#### Literatur.

- AHLGREN, G.: Skand. Arch. **47**, (Suppl.), 1 (1925). — ANTOPOL, W., S. GLAUBACH and L. GOLDMAN: Trans. New York Acad. Sci. **112**, 156 (1949). — AXELROD, A. E., K. F. SWINGLE and C. A. ELVEHJEM: J. of Biol. Chem. **145**, 297 (1942). — BALL, E. G., C. B. ANFINSEN and O. COOPER: J. of Biol. Chem. **168**, 257 (1947). — BATELLI, F., u. L. STERN: Biochem. Z. **30**, 172 (1910). — BECKER, H., u. G. QUADBECK: Naturwiss. **37**, 565 (1950). — BECKER, V.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 109 (1949). — BIELIG, H.-J., G. A. KAUSCHE u. H. HAARDICK: Z. Naturforsch. **4b**, 80 (1949). — BIELIG, H.-J., u. H. QUERNER: Z. Naturforsch. **4b**, 21 (1949). — BLACK, M. M., I. S. KLEINER and F. D. SPEER: Cancer Res. **10**, 204 (1950). — BLACK, M. M., S. R. OPLER and F. D. SPEER: Amer. J. Path. **26**, 1097 (1950). —

- BLACK, M. M., F. D. SPEER and S. R. OPLER: Amer. J. Path. **26**, 741 (1950). — BLACK, M. M., B. W. ZWEIFACH and F. D. SPEER: Amer. J. Clin. Path. **23**, 332 (1953). — BRODIE, A. F., and J. S. GOTS: Science (Lancaster, Pa.) **114**, 40 (1951); **116**, 588 (1952). — COLLETT, M. E., M. RHEINBERGER and E. G. LITTLE: J. of Biol. Chem. **100**, 271 (1933). — COOK, R. P., and R. S. ALCOCK: Biochemic. J. **25**, 523 (1931). — COOPERSTEIN, S. J., and A. LAZAROW: Biol. Bull. **100**, 159 (1951). — DANIELLI, J. F.: Cytochemistry. New York: John Wiley & Sons. London: Chapman & Hall 1953. — DAS, N. B.: Biochemic. J. **31**, 1124 (1937). — DAVIS, J. S., R. K. MEYER and W. H. McSHAN: Endocrinology **44**, 1 (1949). — DOERR, W.: Frankf. Z. Path. **61**, 557 (1950). — DOERR, W., u. V. BECKER: Verh. dtsch. Ges. Path. **35**, 222 (1951). — DOERR, W., u. E. v. LÜTTICHAU: Klin. Wschr. **1949**, 754. — DOUNCE, A. L.: Exper. Cell Res. Suppl. **2**, 103 (1952). — ELLIOTT, K. A. C., and M. E. GREIG: Biochemic. J. **31**, 1021 (1937). — EVANS jr., E. A., L. SLOTIN and B. VENNESLAND: J. of Biol. Chem. **143**, 565 (1942). — EVANS jr., E. A., B. VENNESLAND and L. SLOTIN: J. of Biol. Chem. **147**, 771 (1943). — FORAKER, A. G., and S. W. DENHAM: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **80**, 132 (1952). — FORAKER, A. G., S. W. DENHAM and M. H. JOHNSTON: A. M. A. Arch. Path. **55**, 147 (1953). — FRANKE, W.: In H. v. EULER, Chemie der Enzyme, Bd. II/3. München: J. F. Bergmann 1934. — In NORD u. WEIDENHAGEN: Handbuch der Enzymologie. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft 1940. — GLICK, D.: Techniques of Histo- and Cytochemistry. New York u. London: Interscience Publishers 1949. — GODDARD, J. W., and A. M. SELIGMAN: Anat. Rec. **112**, 543 (1953). — GOEBEL, A., u. H. PUCHTLER: Zbl. Path. **92**, 159 (1954). — GOMORI, G.: Microscopic Histochemistry. Chicago: University of Chicago Press 1952. — GREENSTEIN, J. P., and H. W. CHALKLEY: J. of Biol. Chem. **160**, 371 (1945). — GREVILLE, G. D.: Biochemic. J. **30**, 877 (1936). — HARMAN, J. W.: Exper. Cell Res. **1**, 382 (1950). — HAYEK, H. v.: Naturwiss. **37**, 262 (1950). — HAYEK, H. v., u. U. THUNS: Z. Anat. **116**, 436 (1952). — HOGEBOOM, G. H., A. CLAUDE and R. D. HOTCHKISS: J. of Biol. Chem. **165**, 615 (1946). — HOGEBOOM, G. H., and W. C. SCHNEIDER: J. of Biol. Chem. **194**, 513 (1952). — HOGEBOOM, G. H., W. C. SCHNEIDER and G. E. PALADE: J. of Biol. Chem. **172**, 619 (1948). — HORECKER, B. L., E. STATZ and T. R. HOGNESS: J. o. Biol. Chem. **128**, 251 (1939). — JENSEN, C. D., W. SACKS and F. A. BALDANSKI: Science (Lancaster, Pa.) **113**, 65 (1951). — KEILIN, D., and E. F. HARTREE: Biochemic. J. **44**, 205 (1949). — KUHN, E., u. D. JERCHEL: Ber. dtsch. chem. Ges. **74**, 949 (1941). — KUN, E.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **78**, 195 (1951). — KUN, E., and L. G. ABOOD: Science (Lancaster, Pa.) **109**, 144 (1949). — LAKON, G.: Ber. dtsch. bot. Ges. **60**, 299 (1942). — LANG, K.: 2. Kolloquium der Dtsch. Ges. für physiol. Chemie, Mosbach i. Baden. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1952. — LAVES, W.: Verh. dtsch. Ges. Path. **33**, 114 (1949). — LEDUC, E. H., and G. B. WISLOCKI: J. Comp. Neur. **1952**. — LEHMANN, J.: Skand. Arch. Physiol. (Berl. u. Lpz.) **58**, 173 (1929); **65**, 291 (1933). — MACKENZIE, L. L., and D. FULLER: J. Labor. a. Clin. Med. **35**, 314 (1950). — MATTSON, A. M., C. O. JENSEN and R. A. DUTCHER: Science (Lancaster, Pa.) **106**, 294 (1947). — McGAVRAN, J., and M. RHEINBERGER: J. of Biol. Chem. **100**, 267 (1933). — MEYER-ARENKT, J.: Zbl. Path. **86**, 92 (1950). — MEYER ZUM GOTTESBERGE, A.: Z. Hals- usw. Heilk. (Kongr.ber.. 1954). — MUDD, S., A. F. BRODIE, L. C. WINTERSCHEID, P. E. HARTMANN, E. H. BEUTNER and R. MCLEAN: J. Bacter. **62**, 729 (1951). — MUDD, S., L. C. WINTERSCHEID, E. D. DELAMATER and H. J. HENDERSON: J. Bacter. **62**, 459 (1951). — MUSTAKALLIO, K. K., and A. TELKKÄ: Science (Lancaster, Pa.) **118**, 320 (1953). — NEUMANN, K. H.: Klin. Wschr. **1952**, 605. — NEUMANN, K. H., u. G. KOCH: Hoppe-Seylers Z. **295**, 35 (1953). — OHLSSON, E.: Skand. Arch. Physiol. (Berl. u. Lpz.) **41**, 77 (1921). — PADYKULA, H. A.: Amer. J. Anat. **91**, 107 (1952). — PARDEE, A. B., and R. v. POTTER: J. of Biol. Chem. **176**, 1085 (1948). — PEARSE, A. G. E.:

Histochemistry, theoretical and applied. Boston, Mass.: Little, Brown & Co.: 1953. — PEARSON, B., and V. DEFENDI: J. Histochem. a. Cytochem. **2**, 248 (1954). — POTTER, V. R.: J. of Biol. Chem. **137**, 13 (1941). — J. of Biol. Chem. **165**, 311 (1946). — QUASTEL, J. H., and A. H. M. WHEATLEY: Biochemic. J. **25**, 117 (1931). — QUASTEL, J. H., and M. D. WHETHAM: Biochemic. J. **18**, 519 (1924); **19**, 520 (1925). — QUASTEL, J. H., and W. R. WOOLDRIDGE: Biochemic. J. **21**, 148 (1927). — ROBERTS, L. W.: Science (Lancaster, Pa.) **113**, 692 (1951). — ROSA, C. G., and J. T. VELARDO: J. Histochem. a. Cytochem. **2**, 110 (1954). — RUTENBURG, A. M., R. GOFSTEIN and A. M. SELIGMAN: Cancer Res. **10**, 113 (1950). — RUTENBURG, A. M., M. WOLMAN and A. M. SELIGMAN: J. Histochem. a. Cytochem. **1**, 66 (1953). — SCHNEIDER, W. C.: Cancer Res. **6**, 685 (1946a). — J. of Biol. Chem. **165**, 585 (1946 b). — J. Histochem. a. Cytochem. **1**, 212 (1953). — SCHNEIDER, W. C., A. CLAUDE and G. H. HOGEBOOM: J. of Biol. Chem. **172**, 451 (1948). — SCHNEIDER, W. C., and G. H. HOGEBOOM: J. Nat. Canc. Inst. **10**, 969 (1950). — SCHÜMMELFEDER, N.: Verh. dtsch. Ges. Path. **33**, 65 (1949). — SCHUERMANN, H.: Klin. Wschr. **1950**, 464. — SELIGMAN, A. M., R. GOFSTEIN and A. M. RUTENBURG: Cancer Res. **9**, 366 (1949). — SELIGMAN, A. M., and A. M. RUTENBURG: Science (Lancaster, Pa.) **113**, 317 (1951). — SEMENOFF, W. C.: Z. Zellforsch. **22**, 305 (1935). — SHELTON, E., and W. C. SCHNEIDER: Anat. Rec. **112**, 61 (1952). — SLATER, E. C.: Biochemic. J. **45**, 1 (1949). — SMITH, F. E.: Science (Lancaster, Pa.) **113**, 751 (1951). — SONNENBLICK, B. P., W. ANTOPOL and L. GOLDMAN: Trans. New York Acad. Sci. **112**, 161 (1949). — STIER, A.: Z. Anat. **116**, 399 (1952). — STRAUS, F. H., N. D. CHERONIS and E. STRAUS: Science (Lancaster, Pa.) **108**, 113 (1948). — SWINGLE, K. F., A. E. AXELROD and C. A. ELVENHJEM: J. of Biol. Chem. **145**, 581 (1942). — TEUBNER, F. G., and A. E. MURNEEK: Science (Lancaster, Pa.) **116**, 39 (1952). — THUNBERG, T.: Skand. Arch. Physiol. (Berl. u. Lpz.) **22**, 430 (1909); **40**, 1 (1920). — WACHSTEIN, M.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **73**, 306 (1950). — WALDSCHMIDT-LEITZ, E., and H. SPRINZ: Science (Lancaster, Pa.) **116**, 488 (1952). — WOOD, H. G., B. VENNESLAND and E. A. EVANS: J. of Biol. Chem. **159**, 153 (1945). — ZWEIFACH, B. W., M. M. BLACK and E. SHORR: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **74**, 848 (1950); **76**, 446 (1951).

Dr. A. GOEBEL, Pathologisches Institut der Universität,  
Köln-Lindenthal, Lindenburg.