

Virchows Archiv, Bd. 327, S. 252—258 (1955).

Aus der Inneren Abteilung des Städtischen Rudolf-Virchow-Krankenhauses
in Berlin (Chefarzt: Prof. Dr. med. Dr. phil. HANS HORSTERS).

Beitrag zur fluorescenzmikroskopischen Untersuchung lebender Organe.

Von

W. KULPE.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 23. März 1955.)

Die Darstellung von Gewebsstrukturen ist im allgemeinen an die Anfertigung histologischer Schnitte gebunden. Sie nimmt dabei die Veränderungen durch Fixierungs- und Färbeverfahren in Kauf. Für eine ganze Reihe von Fragestellungen interessanter und aufschlußreicher aber ist die Darstellung eines Gewebsbildes, das lebend und in voller Funktion beobachtet und beurteilt werden kann. ELLINGER und HIRT haben schon 1929 ein Verfahren entwickelt, das die mikroskopische Betrachtung lebender Organe ermöglicht. Durch Anwendung von Fluoreszenzfarbstoffen und durch Beobachtung im auffallenden ultravioletten Licht gestattet das Verfahren, nicht nur die Struktur zu beurteilen, sondern auch den Ablauf von Sekretionsvorgängen zu verfolgen. Gewiß, die Feinheiten des Plasmas und des Kernaufbaues lassen sich auf diese Weise nicht erkennen, der besondere Vorzug ist und bleibt aber der direkte Einblick in das funktionelle Geschehen. Es entstehen mehrfarbige lebende Bilder, deren Wechsel photographisch festgehalten werden kann. Als Beispiel diene die Abb. 1 der Gallencapillaren, die in der histologischen Präparation bekanntlich nur schwierig dargestellt werden können. Im Mikroskop ist das Bild noch instruktiver, da es farbig ist und auch die Leberzellbalken zu sehen sind. Die Gallencapillaren fluorescieren gelb, die Leberzellen grün. Die Helligkeit der Zellbalken ist allerdings merklich geringer und das ist der Grund, warum die Belichtungszeit von 2 min nicht ausreichte, um sie zur Abbildung zu bringen. Freilich ist die ganze Methode an ein gewisses experimentelles Geschick mit apparativem Aufwand geknüpft. Das mag der Grund gewesen sein, daß sie sich nicht so verbreitet hat, wie es vielleicht lohnend gewesen wäre. Es liegt aber auf der Hand, daß mit diesem Verfahren Möglichkeiten gegeben sind, auf experimentellem Wege gerade an der Leber unter anderem die Vielzahl von Stoffen, die in den letzten Jahren in die Lebertherapie Eingang gefunden hat und deren Wirksamkeit noch strittig ist, zu studieren.

Voraussetzung für die Deutung fluoreszierender Strukturen ist Klarheit und Sicherheit in der Beurteilung der wechselnden Farbentwicklung der verwendeten Fluorochrome. Diese sind nämlich gekennzeichnet durch eine Farbänderung bei verschiedenen Bedingungen. So haben ELLINGER und HIRT *in vitro* für das Fluorescein, einen der gebräuchlichsten Fluoreszenzfarbstoffe, eine Farbtafel entwickelt, deren Farben von der Wasserstoffionenkonzentration des örtlichen Milieus abhängig sind. Diese Farben haben die beiden Autoren der Auswertung ihrer

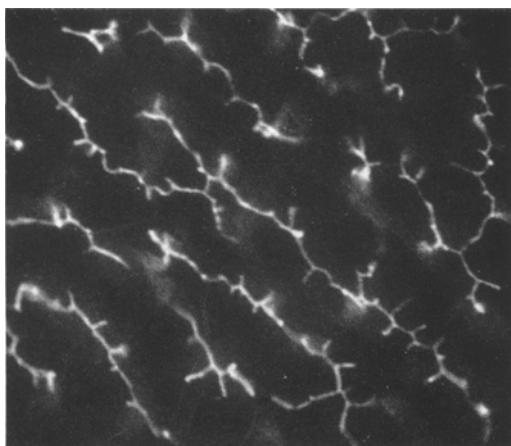


Abb. 1. Gallencapillarnetz in Fluoresceindarstellung.

Lebenduntersuchungen tierischer Organe zugrunde gelegt. Das Ergebnis waren Arbeiten über die p_H -Änderung während der Harnbereitung im tubulären Apparat der Niere, und es erschien einleuchtend, daß mit der Anwendung solcher Fluorescenzindikatoren eine brauchbare Methode zur Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration im lebenden Gewebe gefunden worden war. Unsere Untersuchungen ließen aber berechtigte Zweifel an der Richtigkeit dieser Anschaufung aufkommen, so daß wir uns im Hinblick auf die Nützlichkeit der Methode veranlaßt sahen, die Frage nach der Beurteilung der Fluoreszenzfarben im lebenden Organismus aufzugreifen und die Möglichkeit einer intravitalcolorimetrischen p_H -Bestimmung zu überprüfen.

Methodik.

Salamandern, Kröten und Fröschen wurden $0,5 \text{ cm}^3$ Fluorescein oder andere Fluoreszenzfarbstoffe in den Rückenlymphsack injiziert. Nach $1\frac{1}{2}$ Std erfolgte die Betrachtung der Leberoberfläche unter dem Auflichtmikroskop. Die Tiere wurden vorher narkotisiert und ruhiggestellt mit Urethan-Curare. Das Abdomen wurde eröffnet unter

Schonung der in der Mitte verlaufenden Vena abdominalis anterior. Zur Verfügung stand ein Mikroskop der Firma Leitz mit heb- und senkbarem Objekttisch sowie der Auflicht-Illuminator „Ultropak“ der gleichen Firma. Auf den Objekttisch wurde eine Wanne mit Siebplatteneinsatz und Abflußvorrichtung aufgesetzt. Nach Lagerung des präparierten Tieres erfolgte eine ständige Berieselung der Leberoberfläche mit Kaltblüter-Ringerlösung. Zur Betrachtung wurden Wasserimmersionen verschiedener Vergrößerung verwendet. Als Lichtquelle diente eine 15 Amp.-Kohlenbogenlampe mit Kupfersulfatkühlküvette (10%) und Blaufilter BG 12, das auch das langwelligere ultraviolette Licht passieren und somit eine größere Bildhelligkeit erzielen lässt. Als Vorteil erwies sich die Wechsellichteinrichtung des Ultropak, die durch mühelose Umschaltung auch Beobachtungen im Glühlampenlicht gestattet. Zum Schutze der Augen wurden geeignete ultraviolette Sperrfilter in die Oculare eingelegt. Die photographischen Aufnahmen wurden ausgeführt mit einer Mifilmca (Leitz) unter Verwendung der Erfahrungen von FRANKE und SYLLA.

Die klassische Darstellung des Fluoreszenzbildes der Leber erfolgt mit Fluorescein. Alsbald nach der Injektion in den Lymphsack stellen sich die Leberzellen in ihrer typischen bälkchenförmigen Anordnung schwach grün fluoreszierend dar. Nach etwa $1\frac{1}{2}$ Std hat sich ein gelb bis goldgelb leuchtendes Gallencapillarnetz entwickelt. Interzelluläre Fortsätze sind hier und da deutlich sichtbar. Das strömende Blut fluoresciert nicht, die Blutcapillaren zwischen den Leberzellbalken erscheinen daher schwarz. Die Sekretionsrichtung erfolgt von der Leberzelle in die Gallencapillare, der Farbwechsel des Fluoresceins auf diesem Wege erfolgt vom Grün zum Gelb. Vier Farbstoffe haben wir herangezogen, um zu klären, ob der Farbwechsel der Fluorochrome Ausdruck der pH- oder der Konzentrationsänderung darstellt. Verwendet wurden Fluorescein, Trypaflavin, Lactoflavin und Acridinorange. Fluorescein und Lactoflavin ähneln sich in ihrem Verhalten, beide stellen färberisch besonders die Gallencapillaren heraus, während Trypaflavin und Acridinorange weniger die Gallencapillaren, um so mehr aber die Zellkerne anfärbten. Geprüft wurde zunächst im Reagensglasversuch das färberische Verhalten der genannten Fluorochrome im ultravioletten Licht (BG 12) a) bei verschiedenen wässrigen Lösungsmitteln, b) bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration, c) bei verschiedener Farbstoffkonzentration.

Die Farbangaben verzichten bewußt auf ausgeklügelte Nuancen. Sie wurden so gewählt, wie sie sich dem Auge ohne Schwierigkeit unterscheidbar darbieten. Die Fluoreszenzintensität wurde mit Kreuzen + bis +++ angegeben.

Tabelle 1.

Verdünnung	pH 4,41	pH 6,1	pH 7,8	pH 8,57	pH 9,36
Fluorescein					
1:100	+	+	+	+	+
	rotorange	rotorange	rotorange	rotorange	rotorange
1:500	++	++	+++	+++	+++
	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb
1:1000	++	++	+++	+++	+++
	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb
1:10000	++	++	+++	+++	+++
	gelbgrün	grün	grün	grün	grün
Trypaflavin					
1:1000	+	+	+	+	+
	goldgelb	goldgelb	goldgelb	goldgelb	goldgelb
1:10000	+++	+++	+++	+++	+++
	gelbgrün	gelbgrün	gelbgrün	gelbgrün	gelbgrün
1:100000	+++	+++	+++	+++	+++
	grün	grün	grün	grün	grün
1:1000000	++	++	++	++	++
	blaßgrün	blaßgrün	blaßgrün	blaßgrün	blaßgrün
Lactoflavin					
1:2000	+	+	+	+	+
	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb
1:20000	+++	+++	+++	+++	+++
	grün	grün	grün	grün	grün
1:200000	+++	+++	+++	+++	+++
	grün	grün	grün	grün	grün
1:2000000	++	++	++	++	++
	blaßgrün	blaßgrün	blaßgrün	blaßgrün	blaßgrün
Acridinorange					
1:1000	+	+	+	+	+
	rot	rot	rot	rot	rot
1:10000	++	++	++	++	++
	gelb	gelb	gelbgrün	gelbgrün	gelbgrün
1:100000	++	++	+++	+++	+++
	grün	grün	grün	grün	grün
1:1000000	++	++	+++	+++	+++
	blaßgrün	blaßgrün	blaßgrün	blaßgrün	blaßgrün

Die Versuche wurden ausgeführt unter Verwendung eines Glykokoll-puffers und eines Phosphatpuffergemisches nach SÖRENSEN. Beide zeigten bei der Farbentwicklung das gleiche Verhalten. Die optimale Fluorescenzintensität liegt, wie aus der Tabelle 1 ersichtlich, immer bei der stärkeren Verdünnung und wird im allgemeinen bei 1:10000 erreicht.

Das Fluorescein erzielt das Optimum bereits bei einer Verdünnung von 1:1000. Fluorescein und Acridinorange fluorescieren im alkalischen etwas stärker als im sauren Milieu. Besonders anschaulich macht die Tabelle die Farbentwicklung. Sie läßt in der Wagerechten, d. h. bei der gleichen Verdünnung im p_H -Bereich von 4,41—9,36 praktisch keinerlei Farbwechsel erkennen. Lediglich das Fluorescein und das Acridinorange zeigen in der Verdünnung 1:10000 unter Zunahme der Alkalescenz eine Nuancierung vom Gelbgrün zum Grün bzw. vom Gelb zum Gelbgrün. Nimmt sich diese geringe Farbänderung in der Tabelle 1 wirklich recht vereinzelt aus, so zeigt die Tabelle 2 in signifikanter Weise den Farbwechsel in Abhängigkeit von der Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffes. Alle 4 Fluorochrome zeigen in der konzentrierten Lösung die gelbe und mit Zunahme der Verdünnung die grüne Farbe. Der Farbwechsel ist hier so eindeutig wie er in Tabelle 1 bei Berücksichtigung der Wasserstoffionenkonzentration fehlt.

Tabelle 2.

Verdünnung	Farbe	Fluoreszenz-intensität	Verdünnung	Farbe	Fluoreszenz-intensität
	Fluorescein			Trypaflavin	
1:100	rotorange	+	1:500	goldgelb	(+)
1:500	gelb	++	1:1000	gelb	+
1:1000	gelb	+++	1:10000	gelbgrün	+++
1:10000	grün	+++	1:100000	grün	+++
1:100000	blaßgrün	++	1:1000000	blaßgrün	++
	Lactoflavin			Acridinorange	
1:200	orange	(+)	1:100	dunkelrot	Ø
1:2000	gelb	+	1:1000	rot	+
1:20000	grün	+++	1:1000	gelb	++
1:200000	grün	+++	1:100000	grün	++
1:2000000	blaßgrün	++	1:1000000	blaßgrün	++

Diese Reagensglasversuche lassen zunächst den Schluß zu, daß in einem p_H -Bereich, das dem lebenden Gewebe zukommt, weder das Lösungsmittel noch die örtliche Wasserstoffionenkonzentration, sondern ausschließlich die Farbstoffkonzentration die Farbe der Fluorochrome bestimmt. Dadurch scheidet schon einmal die Möglichkeit aus, auf dem Wege der Fluoreszenzcolorimetrie eine p_H -Bestimmung im lebenden Gewebe auszuführen.

Auch im Experiment am lebenden Tier läßt sich der Beweis führen, daß die Konzentration die Farbe der Fluorochrome bestimmt. Allerdings stellen sich unsere Ergebnisse damit in Gegensatz zu den Folgerungen, die ELLINGER und HIRT in ihren Arbeiten gezogen haben. Diese konnten in Versuchen an der Niere zunächst die p_H -Abhängigkeit der Fluoreszenz glaubhaft machen. Sie fanden nämlich auf dem Wege vom Glomerulus

zum Sammelkanälchen eine Farbänderung des Fluoresceins vom Grünen zum Gelben und setzten dies gleich mit der Zunahme saurerer und der Abnahme alkalischer Valenzen bei der Harnbereitung. Die Erklärung fußte darauf, daß Fluorescein, wie auch aus der Tabelle 1 ersichtlich (Verdünnung 1:10000), im saueren Milieu einen gelbgrünen Farbton annimmt.

An der Leber stellen sich die Verhältnisse bei Anwendung des gleichen Farbstoffes derart dar, daß die Leberzellbalken grün fluorescieren, während die Gallencapillaren einen intensiven gelben Farbton annehmen, der auch in den hilusnahen Sammelgefäßern wiederzufinden ist.

Die ELLINGER- und HIRTSCHEN Erfahrungen an der Niere auf die Leber angewendet, führen nun zu dem erstaunlichen Ergebnis, daß dem Inhalt der Gallencapillaren ein stark saurer Charakter bis in die Leberpforte hinab zukommt, während wir doch glauben, die Leber sei im Gegensatz zur Niere das Ausscheidungsorgan im alkalischen Milieu. Die Anwendung des Lactoflavins vermag nun diesen Widerspruch zu klären. Das Lactoflavin bringt die Gallencapillaren gleich gut wie das Fluorescein zur Darstellung, es zeigt aber im Gegensatz zu diesem bei allen Verdünnungen zwischen p_H 3,34 und 9,36 eine einheitlich gefärbte Fluorescenz (vgl. Tabelle 1). Man hätte daher bei Anwendung des Lactoflavins, wenn tatsächlich die p_H -Verhältnisse maßgebend sind, eine gleiche Anfärbung von Leberzellbalken und Gallencapillaren erwarten können, eben weil das Lactoflavin sowohl im saueren als auch im alkalischen Milieu den gleichen Farbton entwickelt. Sein Verhalten im Lebendversuch erbringt aber das Gegenteil, in der Farbentwicklung stimmt es genau mit dem Fluorescein überein. Dieses parallele Verhalten beim Vergleich der Konzentrationsstufen mit den Verhältnissen in der Leber sollte die Konzentrationsabhängigkeit der Fluorochrome bei der Lebenduntersuchung erläutern können.

Die ELLINGER- und HIRTSCHEN Versuche büßen trotzdem nicht an Bedeutung ein. Nachdem die Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzfärbungen klargestellt ist, bringen die Versuche die Konzentrationssteigerung durch Resorption von Wasser im tubulären Apparat der Niere zum Ausdruck. Allein das Zusammentreffen von Konzentrationsvorgang und Aciditätszuwachs und die Anwendung von Fluorescein, das im konzentrierten Zustand und auf der saueren Seite den gleichen gelblichen Farbton zeigt, vermochte diesen Fehlschluß herbeizuführen.

Mit unserer Auffassung von der Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzfärbungen gelangen wir in Übereinstimmung mit den Ansichten STRUGGERS, der in ausgedehnten pflanzenphysiologischen Studien mit Acridinorange das färberische Verhalten lebender und toter Pflanzenzellen untersucht hat. Nach seinen Arbeiten ist der Farbwechsel des

Acridinoranges ebenfalls Ausdruck der Konzentrationssteigerung des Farbstoffes in der Zelle, bedingt durch elektro-adsorptive Bindung des Farbstoffes an frei werdende Valenzen des absterbenden Protoplasma-moleküls. Ob diese theoretische Begründung des Konzentrations-effektes generell zutrifft, möchten wir dahingestellt sein lassen, da Konzentrationseffekte auch ohne Anwesenheit des molekularen Raum-gitters des Protoplasmas zu erzielen sind.

Wir sind überzeugt, daß nach Klarstellung des färberischen Ver-haltens der Fluorochrome die Brauchbarkeit des fluorescenzmikroskopischen Beobachtungsverfahrens an lebenden Organen wesentlich erhöht wird. Wir haben die Methode überarbeitet und versucht, die Aus-wertungsmöglichkeit zu verbessern, weil wir glauben, daß auf diesem Wege noch eine ganze Reihe von Fragestellungen bearbeitet und gelöst werden kann.

Zusammenfassung.

Es wird das färberische Verhalten von Fluorescenzfarbstoffen bei der Fluorescenzmikroskopie lebender Organe untersucht und festgestellt, daß 1. eine fluorescenzcolorimetrische p_H -Bestimmung im lebenden Gewebe nicht möglich ist und 2. daß die Entwicklung der Fluorescenz-farbe abhängig ist von der Konzentrationsstufe der Fluorochrome.

Die Sicherstellung dieser Tatsachen vermag die Brauchbarkeit der Methode zu erhöhen. Die Bedeutung der Methode für eine Reihe von Fragestellungen wird dargelegt.

Die Arbeit wurde im Rahmen der Forschungsaufgaben von Herrn Prof. Dr. Dr. HORSTERS mit finanzieller Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft angefertigt.

Literatur.

DANCKWORTT, P. W.: Lumineszenzanalyse. Leipzig 1949. — ELLINGER, Ph., u. A. HIRT: Z. Anat. 90, 791 (1929). — Arch. exper. Path. u. Pharmakol. 145, 193 (1929); 150, 285 (1930). — FRANKE, K.: Handbuch biologischer Arbeitsmethoden (ABDERHALDEN), Bd. 4, Abt. V, Teil 10, S. 973. — FRANKE, K., u. A. SYLLA: Z. exper. Med. 89, 141 (1933); 93, 592 (1934). — STRUGGER, S.: Dtsch. tierärztl. Wschr. 1941, 525; 1942, 51. — STRUGGER, S., u. P. HILBRICH: Dtsch. tierärztl. Wschr. 1942, 121.

Dr. med. KULPE, Städtisches Rudolf-Virchow-Krankenhaus, Innere Abteilung,
Berlin-N 65, Augustenburger Platz 1.