

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Tübingen
(Direktor: Prof. Dr. E. LETTERER).

Untersuchungen über das Verhalten der Phosphatasen und Esterasen während der Autolyse.

Von

WOLFGANG GÖSSNER.

(Eingegangen am 28. April 1955.)

A. Einleitung.

Das Interesse an histochemischen Enzymnachweisen hat in den letzten Jahren in erheblichem Maße zugenommen, da sich mit ihrer Hilfe neue Erkenntnisse über gewebliche und celluläre Stoffwechselvorgänge unter normalen und krankhaften Verhältnissen gewinnen lassen. Besonders die Zuordnung spezifischer Enzymwirkungen zu bestimmten Zell- und Gewebsstrukturen gibt sowohl der Morphologie als auch der Biochemie mit anderen Methoden nicht zu gewinnende Befunde, die zu einem tieferen Verständnis für die Beziehungen zwischen Gestalt und Funktion beitragen können.

Wenn auch bereits zahlreiche wichtige Ergebnisse auf diesem Gebiet vorliegen, so wäre eine breitere Anwendung dieser Methoden auch im Rahmen der allgemein-pathologischen Forschung dringend erwünscht. Dies setzt aber sichere methodische Grundlagen voraus, wovon leider noch nicht die Rede sein kann. Dafür sprechen die Vielzahl der beschriebenen Modifikationen und die dadurch bedingten unterschiedlichen Ergebnisse verschiedener Untersucher.

Die methodischen Schwierigkeiten liegen vor allem in der Erhaltung der Enzymaktivität und in der exakten Enzymlokalisation. Die Aktivität wird vor allem durch die Fixierung und die nachfolgenden zur Herstellung der Gewebsschnitte notwendigen Maßnahmen beeinträchtigt. Auf die Lokalisation ist ebenfalls die Fixierung, vor allem aber auch die Nachweismethode als solche von Einfluß.

Bei der Untersuchung menschlichen, vor allem autoptisch gewonnenen Materials kommen noch die Einwirkungen durch die postmortalen bzw. autolytischen Vorgänge hinzu.

Da es gerade in der pathologischen Histologie häufig notwendig wird, auch das autoptische Material einer histochemischen Analyse zu unterziehen, wird einer experimentellen Untersuchung über den Einfluß der autolytischen Veränderungen bei einer bestimmten histochemischen Reaktion eine grundlegende Bedeutung zukommen.

Die folgenden Versuche sollen zur Analyse dieser verschiedenen Faktoren unter besonderer Berücksichtigung der Autolyse beitragen; sie beschränken sich auf den Nachweis der Phosphatasen und Esterasen.

B. Methodik.

1. Fixierung.

Bei allen histochemischen Enzymnachweisen ist die Art des Fixierungsmittels von entscheidender Bedeutung. Es soll nicht nur die Aktivität weitgehend erhalten, sondern auch das Enzym „*in situ* fixieren“ und ein vom histologischen Standpunkt möglichst gutes Strukturbild ergeben.

Bekanntlich ist die Fixierung und Entwässerung in kaltem Aceton mit nachfolgender Paraffineinbettung die bisher am meisten zur Anwendung gekommene Methode. Die Acetonfixierung beeinträchtigt die Aktivität nicht sehr stark, aber die Paraffineinbettung führt zu einem erheblichen Aktivitätsverlust. Das Strukturbild ist infolge starker Schrumpfung nicht besonders befriedigend.

Die Gefriertrocknung wird von verschiedenen Untersuchern als die Methode der Wahl bezeichnet. Ihre Vorteile liegen in einem Minimum an Aktivitätsverlust und optimaler Strukturerhaltung. Die danach notwendige Einbettung mit der Einwirkung höherer Temperaturen wirkt sich natürlich wieder ungünstig auf die Erhaltung der Aktivität aus. Zudem ist infolge der Kostspieligkeit der Apparatur und der methodischen Schwierigkeiten eine Anwendung auf breiter Basis noch nicht möglich.

Die Herstellung nativer Gefrierschnitte dürfte in dieser Hinsicht am schonendsten sein. Dabei besteht allerdings die Gefahr, daß am unfixierten Gewebe während der Inkubation das Enzymweiß herausgelöst bzw. verlagert wird.

Neuerdings wurde festgestellt (SELIGMAN, CHAUNCEY und NACHLAS, PEARSE), daß eine verhältnismäßig kurze Fixierung in kaltem Formalin die Aktivität verschiedener Enzyme nur wenig beeinträchtigt. Von derart fixiertem Material lassen sich leicht Gefrierschnitte herstellen, so daß die schädigende Paraffineinbettung umgangen werden kann. Außerdem erhält man ein gutes Strukturbild.

Die folgende, auf Grund der Angaben verschiedener Untersucher [SELIGMAN, CHAUNCEY und NACHLAS, PEARSE] zusammengestellte Tabelle 1 zeigt zum Vergleich die Wirkung der Formalin-Gefrier- und der Aceton-Paraffinmethode auf die Aktivität von Phosphatasen und Esterasen. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der erhaltenen Aktivität an. Daraus ergibt sich die Überlegenheit der Formalinfixierung besonders deutlich bei der sauren Phosphatase. Von uns durchgeführte Vergleichsuntersuchungen konnten diese Befunde bestätigen.

Tabelle 1. Restaktivität nach Formalin-Gefrier- und Aceton-Paraffinvorbehandlung.

Ferment	Formalin 1:10 4°C, 2 Std. Gefrierschnitt %	Formalin 1:10 4°C, 24 Std. Gefrierschnitt %	Aceton 4°C, 24 Std. Paraffinschnitt %
Alkalische Phosphatase . . .	73	26	20—30
Saure Phosphatase	79	55	5—6
Esterase	82	35	10—40

2. Enzymnachweis.

Die von GOMORI ausgearbeiteten Methoden zum Nachweis der alkalischen und sauren Phosphatase beruhen auf der histochemischen

Darstellung von Calciumphosphat, das an der Stelle der Enzymaktivität bei Inkubation der Gewebsschnitte mit einem organischen Phosphatester bei Gegenwart von Calciumionen niedergeschlagen wird. An ihrer Spezifität ist wohl nicht zu zweifeln, allerdings ist die Diskussion über die Exaktheit der Lokalisation, besonders im Hinblick auf das Auftreten von Diffusions- und Adsorptionsartefakten noch nicht abgeschlossen. Solche Artefakte können natürlich sowohl durch Verlagerung des Enzyms selbst als auch durch die Adsorption von Zwischenprodukten, die im Laufe der Nachweisreaktion entstehen, hervorgerufen werden. Der Vergleich mit einem auf anderem Prinzip beruhenden Enzymnachweis würde daher in dieser Hinsicht eine wertvolle Kontrolle darstellen.

In den letzten Jahren wurde zuerst von MENTEN, JUNGE und GREEN später vor allem von SELIGMAN, NACHLAS, MANHEIMER, FRIEDMAN und WOLF eine neue Methode zum Nachweis der Phosphatasen entwickelt, die den gewünschten Vergleich ermöglicht. Dabei wird der enzymatisch abgespaltene alkoholische Anteil eines organischen Phosphorsäureesters und nicht wie bei der Gomori-Methode die Phosphorsäure nachgewiesen. Als Substrat wird an Stelle des sonst üblichen Glycerophosphates ein Naphthylphosphat verwendet. Das durch das Enzym freigesetzte Naphthol wird dann sofort mit einer Diazoniumverbindung gekuppelt, wobei ein unlöslicher Azofarbstoff entsteht. Die zunächst in ihrer technischen Durchführung schwierige Methode konnte durch die Anwendung stabiler Diazoniumsalze vereinfacht werden.

Nach demselben Prinzip lassen sich histochemisch auch die Esterasen nachweisen.

Außer SELIGMAN und seinen Mitarbeitern haben sich vor allem DANIELLI, GOMORI und PEARSE mit diesen Azofarbstoffmethoden befaßt.

Wir haben in der letzten Zeit diese Methoden nachgeprüft und auch bei den Autolyseversuchen angewendet, wobei sie sich durchaus bewährt haben. Es ist dabei von großem Vorteil, daß der Verlauf der Reaktion direkt unter dem Mikroskop beobachtet werden kann und die Inkubationszeiten verhältnismäßig kurz sind.

Zu diesen Azofarbstoffmethoden seien noch einige technische Bemerkungen vorausgeschickt.

Die dabei auftretenden Schwierigkeiten liegen vor allem in der Wahl eines geeigneten Diazoniumsalzes, das bei dem p_H -Optimum des betreffenden Enzyms möglichst schnell mit dem freiwerdenden Naphthol zu einem unlöslichen, kräftig gefärbten Farbstoff kuppeln soll. Geht der Kupplungsvorgang zu langsam vor sich, so kann das Naphthol noch vor der Präcipitation in die Umgebung diffundieren, wodurch die Lokalisationsstreue der Reaktion beeinträchtigt wird.

Leider sind die stabilen Diazoniumsalze in Lösung ziemlich unbeständig und es entstehen braune Zersetzungprodukte, die zu einer störenden Diffusfärbung der Schnitte führen.

Die Kupplungsfähigkeit und die Zersetzung sind vom p_H abhängig. Dabei ist von gewissem Nachteil, daß beide Prozesse im alkalischen Milieu begünstigt werden.

Die folgende Tabelle 2 zeigt die Resultate nach Kupplung fünf verschiedener Diazoniumsalze mit α -Naphthol und sog. Naphtoel AS bei verschiedenem p_H , und zwar sind jeweils Farbe und Niederschlagsform des entstehenden Reaktionsproduktes sowie der Grad der Zersetzung angegeben. Die besonders geeigneten Kombinationen sind hervorgehoben.

Tabelle 2. *Eigenschaften der Azofarbstoffe nach Kupplung mit verschiedenen Basen an enzymatisch abgespaltene Naphthole.*

	5-Nitro-anisidin	o-Dianisidin	4-Benzoylaminoo-2,5-dimethoxy-anilin	4-Chlor-o-anisidin	5-Chlor-o-toluidin
α -Naphthol					
p_H 5.0					
Farbe . . .	(gelb)	rotbraun feinkörnig gering	(schwarzbraun) diffus gering	(gelb) diffus gering	braun grobkörnig keine
Niederschlag .	diffus				
Zersetzung .	gering				
p_H 7.4					
Farbe . . .	orange	schwarz feinkörnig gering	schwarz feinkörnig gering	braunrot grobkörnig gering	braunrot grobkörnig keine
Niederschlag .	feinkörnig				
Zersetzung .	gering				
p_H 9.2					
Farbe. . . .	braunrot	schwarzbraun feinkörnig stark	schwarz feinkörnig gering	braunrot feinkörnig gering	braunrot feinkörnig keine
Niederschlag .	feinkörnig				
Zersetzung .	stark				
Naphtol AS					
p_H 6.9					
Farbe. . . .	keine	violett grobkörnig stark	blau grobkörnig gering	braunrot feinkörnig gering	ziegelrot grobkörnig keine
Niederschlag .	—				
Zersetzung .	stark				

Diese Versuche wurden an in der Kälte formalinfixierten Gefrierschnitten von Niere, Leber und Milz der Maus durchgeführt.

Bei p_H 5.0, also dem Optimum für die saure Phosphatase, erfolgt nur mit dem o-Dianisidin eine ausreichende Kupplung. Das 5-Chlor-o-toluidin zeichnet sich durch eine unter den geprüften Bedingungen fast völlig fehlende Zersetzung aus.

Die nächste Tabelle 3 gibt eine Zusammenstellung der schließlich beim Nachweis der Phosphatasen und Esterasen angewandten Versuchsbedingungen.

Tabelle 3. *Versuchsbedingungen für Azofarbstoffmethoden bei den untersuchten Enzymen.*

Ferment	Substrat	Puffer	p i	Aktivator	Temperatur °C	Zeit min
Alkalische Phosphatase	α -Naphthyl-phosphat	0.1 M Borat	9.2	MgCl ²	20	5—30
Saure Phosphatase	α -Naphthyl-phosphat	0.1 M Acetat	5.0	—	20	60
Esterase	α -Naphthyl-acetat	0.1 M Phosphat	7.4	—	20	5—15
AS-Esterase	Naphtol AS-acetat	0.1 M Phosphat	6.9	—	20	30

3. *Befunde an normalen Mäuseorganen.*

Wir haben nun zunächst die Verteilung der alkalischen und sauren Phosphatase mit der Gomori- und Azo-Methode unter normalen Bedingungen vergleichend an Niere, Leber, Milz und Lunge der Maus untersucht.

Die wesentlichen Befunde sind in der folgenden Tabelle 4 zusammengestellt.

Tabelle 4. *Verteilung der Phosphatasen in verschiedenen Organen. Vergleich zwischen Gomori- und Azofarbstoff-Methoden.*

Organ	Alkalische Phosphatase GOMORI	Alkalische Phosphatase Azo-Methode	Saure Phosphatase GOMORI	Saure Phosphatase Azo-Methode
Niere	Tubuli cont.		Rinde	++
	Cytoplasma	+	Mark	++
	Kerne	+	Cytoplasma	+
	BOWMANSche Kapsel	+	Kerne	—
	Gefäßwände	+	Glomeruli	+++
	Mark	—		
Leber	Leberepithel		Leberepithel	
	Cytoplasma	+	Cytoplasma	+
	Kerne	+	Kerne	—
	Endothelzellen	+	Capillarwände	+
	Gallenkapillaren	+	Sternzellen	+
	Läppchenperipherie > -zentrum		Läppchenperipherie < -zentrum	
Milz	Gefäßwände	+++	Cytoplasma	+
	Follikelrandzone	++	Kerne	(+)
	Follikelzentrum	+	(Pulpa, Endothel, Lymphocyten)	
	Follikel > Pulpa	+	Follikel < Pulpa	
Lunge	Basalmembran (Bronchien)	++	Bronchialwand	++
	Alveolardeckzellen	+	Alveolardeckzellen	+
	Gefäßwände	++		

Es ergibt sich eine weitgehende Übereinstimmung des Reaktionsausfalls bei beiden Methoden. Lediglich die Kerne zeigen bei den Azofarbstoffmethoden im Gegensatz zu den Gomori-Methoden im allgemeinen keine Aktivität. Die Bedeutung dieser Diskrepanz und vor allem ihre Ursache sind noch nicht geklärt. Von verschiedenen Seiten wird die positive Kernreaktion bei der Gomori-Methode als Artefakt angesehen (s. Literatur bei PEARSE).

Die nächste Tabelle 5 gibt schließlich die normale Verteilung der unspezifischen Esterase und der sog. AS-Esterase in Niere, Leber, Milz

Tabelle 5. *Normale Verteilung der Esterasen in verschiedenen Organen.*

Organ	Esterase Azo-Methode	AS-Esterase Azo-Methode
Niere	Cytoplasma der Tubuli in der Rinde	+++
	Kerne	—
	Mark	—
Leber	Cytoplasma der Leberepithelien	+++
	Kerne	—
Gleichmäßige Verteilung im Läppchen		
Milz	Rote Pulpa	++
	Randzone der Follikel	++
	Follikelzentrum	+
Lunge	Bronchialepithel	++++
	Alveolardeckzellen	++

und Lunge der Maus wieder. Die beiden Substrate ergeben ein übereinstimmendes Resultat.

Zum Studium des histochemischen Verhaltens der Phosphatasen und Esterasen bei der Autolyse isolierter und im Körper belassener Organe kamen die eben beschriebenen Methoden zur Anwendung.

C. Histoenzymatische Befunde bei der Autolyse.

Zum Studium der Autolyse wurden zunächst steril entnommene Nieren von dekapitierten und 12 Std ohne Nahrung gehaltenen Mäusen in toto bis 50 Std bei 37° C in einer feuchten Kammer gehalten und in verschiedenen Zeitabständen untersucht. Die Fixierung erfolgte 12 Std in kaltem Formalin bzw. Aceton. Die Enzymnachweise wurden an allen Nieren an Gefrier- und Paraffinschnitten in völlig identischer Form durchgeführt.

Die histologische Untersuchung zeigt nach 4 Std beginnende Karyorhexis der Tubulusrinne, die nach 12 Std ihr Maximum erreicht, darauf folgt die Karyolyse. Die Kerne der Epithelien sind nach 24 Std, die des Interstitiums und der Glomeruli nach 36 Std fast völlig, nach 50 Std vollständig geschwunden.

Sämtliche untersuchten Enzyme zeigen bis 8 Std eine etwa gleichbleibende Aktivität, nur die der alkalischen Phosphatase nimmt am Anfang etwas zu. Die Ursache dieser anfänglich auftretenden vorübergehenden Aktivitätssteigerung ist vorerst nicht eindeutig zu erklären. Möglicherweise handelt es sich dabei um das Wirksamwerden normalerweise inaktiven Enzyms, entweder durch Aktivierung oder durch Wegfall von Hemmungsfaktoren, denn eine Enzymsynthese erscheint unter diesen Bedingungen unwahrscheinlich. Nach 12 Std beginnt die Reaktion schwächer zu werden und gleichzeitig eine zunehmend diffuse Verteilung aufzutreten.

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase bleibt im Schnitt etwas länger erhalten als die der übrigen Enzyme. Die Azofarbstoffmethoden zeigen gegenüber den Gomori-Methoden ein etwas früher einsetzendes Schwächerwerden der Reaktion. Auffallend ist, daß die saure Phosphatase der Glomeruli bei beiden Methoden bis zu 50 Std eine unveränderte Reaktion gibt, so daß dieselben schließlich elektiv dargestellt sind. Die saure Phosphatase schwindet aus dem Cytoplasma der Tubuli schon nach 4 Std. Dies ist bei der Gomori-Methode sehr deutlich, bei der Azofarbstoffmethode weniger gut zu erkennen. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle 6 übersichtlich zusammengestellt.

Tabelle 6. *Autolyseversuch bei 37° C an der Niere.*

	Zeit in Stunden						
	2	4	8	12	24	30	50
Kerne							
a) Epithel . . .	+	+	+	+	—	—	—
b) Interstitium . .	+	+	+	+	+	—	—
Karyorrhexis . . .	—	+	++	+++	—	—	—
Karyolyse	—	—	—	—	+	++	+++
Alkalische Phosphatase Gomori	=	<	<	=D	=D	>D	>DD
Alkalische Phosphatase Azomethode	=	<	=	=D	>D	>D	—DD
Saure Phosphatase Gomori	=	=**	=	>*	>*	>*	>D*
Saure Phosphatase Azomethode . .	=	=	=	>D*	>D*	>D*	>D*
EsteraseAzomethode	=	=	=	>D	>D	>D	>D
AS-Esterase Azomethode . .	=	=	=	>D	>D	>D	—DD

= unverändert; < Zunahme; > Abnahme; — negativ; D Diffusfärbung; DD Diffusfärbung über den ganzen Schnitt; ** Tubulusecytoplasma negativ; * Glomeruli noch positiv.

Diese Versuche zeigen also, daß die Phosphatasen und Esterasen der Mäuseniere bei der Autolyse deutlich faßbare histochemische Veränderungen erst ab 12 Std erkennen lassen. Diese bestehen in Diffusionserscheinungen sowie fortschreitender Abnahme der histochemisch nachweisbaren Aktivität. Sie fallen zeitlich mit dem Auftreten der morphologischen Veränderungen (Höhepunkt der Karyorrhexis, beginnende Karyolyse) zusammen. Zu diesem Zeitpunkt hat der autolytische Abbau zur weitgehenden Zerstörung der Zellstrukturen geführt, wodurch es wahrscheinlich zum Freiwerden der vorher strukturgebundenen Enzyme kommt. Diese diffundieren dann in die Umgebung und gehen teilweise

auch während der Inkubation in Lösung, wodurch das Schwächerwerden der Reaktion zu erklären ist.

Mit Hilfe der Azofarbstoffmethoden läßt sich dieser Vorgang sogar bei mikroskopischer Betrachtung der Schnitte während der Inkubation direkt beobachten, indem sich von den Schnitten deutlich Farbwolken ablösen.

Zur Kontrolle wurde jeweils die andere Niere einer Maus bei 4° C im Eisschrank aufbewahrt und in gleichen Intervallen untersucht. Unter diesen Bedingungen blieb die Aktivität sämtlicher Enzyme während der Versuchsdauer weitgehend unverändert. Bei der alkalischen Phosphatase war die Reaktion nach 50 Std etwas verwaschen, bei der sauren Phosphatase und den Esterasen waren keine größeren Veränderungen bezüglich der Lokalisation festzustellen.

Eine andere Gruppe von Versuchen wurde zur Prüfung des Enzymverhaltens bei postmortalen Veränderungen im Gesamtorganismus vorgenommen. Dazu wurden die Kadaver durch Genickschlag getöteter, ebenfalls vorher 12 Std ohne Nahrung gehaltener Mäuse unter konstanten Bedingungen bei einer gleichbleibenden Temperatur von 15° C aufbewahrt. Nach verschiedenen Zeitabständen wurden die Tiere obduziert, Niere, Leber, Milz und Lunge entnommen, in kaltem Formalin 12 Std fixiert und schließlich Gefrierschnitte hergestellt. Die Versuche erstreckten sich bis zu 72 Std.

Dabei blieb die Aktivität der untersuchten Enzyme in allen Organen bis zu 72 Std im wesentlichen unverändert. Die alkalische Phosphatase ließ in den ersten Stunden wieder eine angedeutete Aktivitätssteigerung erkennen. Nur die AS-Esterase der Milz nahm nach 36 Std ab und war nach 72 Std praktisch nicht mehr nachzuweisen; die Esterasreaktion wurde nach 60 Std etwas schwächer. Die Lokalisation der Esterasen blieb in sämtlichen vier Organen bis 60 Std unverändert, danach wurde sie unscharf. Bei der alkalischen Phosphatase trat in der Niere bereits nach 24 Std, in den übrigen Organen nach etwa 48 Std eine Diffusion und dadurch verwaschene Reaktion auf. Die Lokalisation der sauren Phosphatase blieb länger, nämlich bis zu etwa 60 Std. unverändert.

Unter diesen Versuchsbedingungen zeigen also die Phosphatase und Esterase in bezug auf ihre histochemische Darstellung verhältnismäßig geringe Veränderungen. Eine auffallende Beeinträchtigung der Intensität der Reaktion kann nicht beobachtet werden und Diffusionsvorgänge setzen frühestens nach 24 Std, meist aber erst später ein.

D. Diskussion.

Es war von vornherein zu erwarten, daß im Gegensatz zu vielen anderen den Histochemiker interessierenden, häufig äußerst labilen Substanzen, die nach dem Tod durch die autolytischen Vorgänge in kurzer

Zeit verändert bzw. zerstört werden, die Enzyme, die doch selbst die Autolyse bewirken, zunächst erhalten und damit eventuell auch histochemisch nachweisbar bleiben.

Als wesentlicher Befund der geschilderten experimentellen Untersuchungen hat sich nun gezeigt, daß postmortale und autolytische Veränderungen innerhalb der ersten 12 Std nach dem Tod bzw. Bebrütung des isolierten Organes zu keiner wesentlichen, mit histochemischen Methoden faßbaren Beeinflussung der Aktivität und Lokalisation bestimmter hydrolytischer Enzyme (Phosphatasen, Esterasen) führen. Von diesem Zeitpunkt an kommt es je nach Versuchsbedingungen bei den einzelnen Enzymen zu unterschiedlich starker Verminderung des Reaktionsausfalles und unscharfer Lokalisation infolge Diffusionserscheinungen. Diese Vorgänge entwickeln sich in Parallel zu den bekannten histologischen Strukturveränderungen, so daß es naheliegt, sie mit diesen in Zusammenhang zu bringen. Offenbar kommt es infolge der vor allem durch proteolytische Enzyme bedingten autolytischen Strukturzerstörung zu einer Ablösung der untersuchten Hydrolasen von ihren Trägerstrukturen, so daß sie leicht in Lösung gehen können und sich dem histochemischen Nachweis entziehen.

Die durch die Autolyse bedingten wohlbekannten morphologischen Veränderungen werden somit zugleich zum Indikator für die zu erwartende Zuverlässigkeit etwa beabsichtigter histochemischer Enzymnachweise, denn nach ihrem Einsetzen ist auf keinen Fall mehr mit verwertbaren Ergebnissen zu rechnen. Bis zu diesem Zeitpunkt allerdings stehen ihrer Anwendung keine prinzipiellen Bedenken gegenüber, was immerhin dazu ermutigt, solche Untersuchungen auch auf autoptisch gewonnene menschliche Organe auszudehnen, soweit die genannten Voraussetzungen erfüllt sind, wenn auch dabei die Verhältnisse noch wesentlich komplizierter als im Experiment liegen werden.

Die vorliegenden Untersuchungen lassen natürlich noch viele grundsätzliche Fragen des im ganzen äußerst komplexen Autolyseproblems offen. Sie behandeln nur das Schicksal einzelner, zur Zeit mit histochemischen Methoden nachweisbarer Enzyme, deren Bedeutung für den eigentlichen Autolysevorgang vorerst noch unbekannt ist.

E. Zusammenfassung.

Nach einleitender kurzer Besprechung einiger Methoden zum histochemischen Nachweis hydrolytischer Enzyme (Phosphatasen und Esterasen) unter besonderer Berücksichtigung der Azofarbstoffmethoden wird über die Befunde bei Anwendung derselben zum experimentellen Studium postmortaler und autolytischer Einflüsse auf das Enzymverhalten im Gewebe berichtet.

Bis zu 12 Std nach Versuchsbeginn zeigen in den Organschnitten diese Enzyme keine wesentlichen Veränderungen im Hinblick auf Aktivität und Lokalisation. Danach kommt es gleichlaufend mit der histologisch nachweisbaren Strukturzerstörung zu einer zunehmenden Abschwächung der Reaktion und zu Diffusionserscheinungen.

Literatur.

DANIELLI, J. F.: *J. of exper. Biol.* **22**, 110 (1946). — GOMORI, G.: *Microscopic histochemistry*. Chicago: University of Chicago Press 1952. — MENTEN, M. L., J. JUNGE and M. H. GREEN: *J. of Biol. Chem.* **153**, 471 (1944). — PEARSE, A. G. E.: *Histochemistry*. London: J. A. Churchill, Ltd. 1953. — SELIGMAN, A. M., M. M. NACHLAS, L. H. MANHEIMER, O. M. FRIEDMAN and G. WOLF: (1) *Ann. Surg.* **130**, 1933 (1949). — SELIGMAN, A. M., H. H. CHAUNCEY and M. M. NACHLAS: (2) *Stain. Techn.* **26**, 19 (1951).

Dr. WOLFGANG GÖSSNER,
Pathologisches Institut der Universität Tübingen.