

Kurze Mitteilung

Aus der Neurochirurgischen Universitätsklinik Freiburg i. Br.
(Direktor: Prof. Dr. T. RIECHERT)

Über die Bindungsfähigkeit von Gewebsproteinen für Chondroitinsulfat — eine einfache histochemische Proteinreaktion, besonders für Nervengewebe*

Von

REINHARD FRIEDE

(Eingegangen am 9. August 1957)

Mucopolysaccharide und Glykoproteide enthalten als integrierenden Bestandteil Polysaccharide. Bei den sauren Mucopolysacchariden wird der Polysaccharidanteil durch die Chondroitinschwefelsäure gestellt. MÖRNER und später MEYER, PALMER und SMITH haben gezeigt, daß die Herstellung künstlicher Glykoproteide *in vitro* möglich ist, wenn neutrale Lösungen von Chondroitinschwefelsäure und von Protein (Gelatine, Edestin, Eialbumin, Globin von Pferdehämoglobin) in passender Menge zusammengebracht werden. Diese künstlichen Glykoproteide gleichen den natürlichen. Sie entstehen durch Salzbindung, wobei der Schwefelsäureanteil und die Uronsäure zweibasisch an der Bindung teilnehmen. Die Menge der gebundenen Chondroitinschwefelsäure scheint nach MEYER, PALMER und SMITH der Menge basischer Aminogruppen im Protein zu entsprechen.

Die Metachromasie, die saure Glykoproteide und Mucoproteide bei histologischer Färbung zeigen, ist durch die Anwesenheit der Chondroitinschwefelsäure bedingt. LISON wies nach, daß unter bestimmten Voraussetzungen die Metachromasie eine Reaktion für hochmolekulare Esterschwefelsäuren darstellt (vgl. SYLVEN).

Von diesen Voraussetzungen ausgehend haben wir versucht, künstliche Glykoproteide *im Schnitt* *in vitro* herzustellen und anschließend durch ihre Metachromasie nachzuweisen. Es war anzunehmen, daß diese „Chondroitinsulfat-Bindungsfähigkeit“ eine technisch einfache Proteinreaktion entwickeln lassen würde. Entsprechend unserer Arbeitsrichtung wurde vorwiegend zentrales Nervengewebe untersucht.

Da die Versuche von MEYER, PALMER und SMITH mit Proteinlösungen gemacht wurden, haben wir zunächst natives Material verwendet. Zuerst wurden dünne Gewebescheibchen in Chondroitinsulfatlösung verschiedener Konzentration inkubiert, dann fixiert, in Paraffin eingebettet, geschnitten und mit Kresylviolett gefärbt. Solche Schnitte zeigten in der Randzone des Gewebes eine deutliche Metachromasie der Plasmastrukturen. Dann verwendeten wir unfixierte Gefrierschnitte von zentralem Nervengewebe. Nach 2stündiger Inkubation in 6%iger Chondroitinsulfatlösung und anschließender Kresylviolettfärbung fand sich eine sehr intensive Metachromasie der grauen Substanz bei fast fehlender Reaktion in der Alba. Es kam dadurch zu einer eindrucksvollen Darstellung der Verteilung grauer Substanz, z. B. in der Formatio reticularis. Die sehr wechselnde und oft fehlende Reaktion in den Achsenzylinern der Alba machte es jedoch zweifelhaft, ob dieses Re-

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

aktionsergebnis verlässlich sei. Es ergab sich bei diesbezüglichen Kontrollen, daß die fehlende Reaktion der Alba dasselbe Phänomen ist, das man auch findet, wenn nichtentfettete, fixierte Gefrierschnitte z. B. mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt werden: Bei der Differenzierung und Entwässerung geht mit den sich lösenden Lipoiden in der weißen Substanz auch der Farbstoff aus dem Schnitt. Das beschriebene Reaktionsergebnis konnte also nicht als Bild der Proteinverteilung aufgefaßt werden.

Schließlich hat sich nach diesen Vorversuchen ergeben, daß die Chondroitinsulfatbindung auch im fixierten Gewebe und auch im Paraffinschnitt erfolgt, ohne daß sich ein wesentlicher Unterschied gegenüber unfixiertem Gewebe ergäbe. Durch diese Feststellung konnte folgender Reaktionsgang ausgearbeitet werden:

Fixierung in CARNOYS Gemisch oder anderen Fixativa, Paraffineinbettung, Schnitte 5—10 μ . Für die Darstellung der feinen Strukturierung der Zwischensubstanz eignen sich dünnerne Schnitte besser. Die Schnitte werden nicht aufgeklebt. Nach Entparaffinieren werden die Schnitte über Alkohol und Wasser in eine 6%ige Lösung von Chondroitinsulfat für 2 Std bei Zimmertemperatur gebracht. Diese Lösung ist mehr als einen Monat haltbar. Anschließend werden die Schnitte kurz in Wasser gespült. Empfehlenswert ist, sie vor der Färbung zu celloidinieren, da sie sonst sehr leicht abschwimmen. Für die Färbung ist die Celloidinierung belanglos, es darf aber nicht vor der Inkubation in Chondroitinsulfat celloidiniert werden. Die Färbung nehmen wir mit 1% Kresylviolett (30—45 min) vor. Es wird mit Essig-Alkohol kräftig differenziert, entwässert, entcelloidiniert und eingedeckt. Hinsichtlich der Bewertung der Metachromasie muß auf die Untersuchungen von LISON verwiesen werden.

Als Reaktionsergebnis zeigt sich eine metachromatische Rotfärbung von wechselnder Intensität in Zellplasma und plasmatischer Zwischensubstanz, während die Kerne den normalen Farbton der Kresylviolettfärbung haben. In Kontrollschnitten prüft man auf Abwesenheit präexistenter, metachromatischer Substanzen.

Die Schnitte machen den Eindruck einer Doppelfärbung, doch übertrifft die Qualität der Strukturdarstellung der Zwischensubstanz bei dieser Reaktion gewöhnliche Färbungen beträchtlich.

An pathologischem, operativem Excisionsmaterial fand sich mit dieser Technik eine vorzügliche Darstellung der ödematischen Auflockerung des Marklagers, ferner gemästeter Gliazellen, chromophiler und chromophober Ganglienzellen, der Perivasculäräume, von Gliaakkern, Plasmabrücken zur Pia usw. Für Untersuchungen über das Hirnödem und solche über chromophile und chromophobe Ganglienzellen scheint die Methode besonders geeignet. Hinsichtlich der letzteren ist zu bemerken, daß DIXON nachwies, daß chromophobe Nervenzellen proteinarm, chromophile proteinreich sind (Kupplungsmethode nach DANIELLI); diese Befunde lassen sich mit unserer Reaktion voll bestätigen. Auch an altem Paraffinmaterial ist die Anwendung möglich. In Hirntumoren war eine gute Darstellung der plasmatischen Zwischensubstanz zu erzielen, desgleichen war die Struktur mesodermaler Elemente von Hirnnarben ausgezeichnet wiedergegeben. Eine eingehendere Darstellung der Proteinverteilungsverhältnisse an Hand dieser Methode ist vorgesehen.

Aus obigem ist zu entnehmen, daß die beschriebene Technik eine überlegene Darstellung plasmatischer Strukturen, besonders der Zwischensubstanz im ZNS ermöglicht. Nach den Ergebnissen von MEYER, PALMER und SMITH ist sie als histochemische Reaktion für basische Aminogruppen der Proteine anzusprechen. Sie kann leicht routinemäßig durchgeführt werden und ist technisch einfacher als die meisten anderen Proteinreaktionen. Die Methode kann daher, besonders für den Gebrauch am Nervensystem, empfohlen werden.

Zusammenfassung

Die Tatsache, daß eine Bildung künstlicher Glykoproteide *in vitro* durch Zusammenbringen von Chondroitinsulfat und Proteinen möglich ist, läßt sich histochemisch nutzbar machen. Nach Vorbehandlung von Schnitten mit Chondroitinsulfat läßt sich dieses dort, wo es an Proteine gebunden wurde, durch seine metachromatische Färbung nachweisen. Auf Grund dieser Reaktion wird eine technisch sehr einfache Proteinreaktion beschrieben, die eine überlegene histologische Darstellung plasmatischer Strukturen — besonders der Zwischensubstanz im Zentralnervensystem — ermöglicht.

Literatur

- DIXON, K. C.: Cytochemistry of cerebral grey matter. Quart. J. Exper. Physiol. **39**, 129 (1954). — LISON, L.: (1) La signification histo chimique de la métachromasie. C. Soc. r. Biol. Paris **118**, 621 (1935). — (2) Etudes sur la métachromasie. Archives de Biol. **46**, 599 (1935). — MEYER, K., J. W. PALMER, E. M. SMITH: On glycoproteins. V. Protein complexes of chondroitinsulfuric acid. J. of Biol. Chem. **119**, 501 (1937). — MÖRNER, C. TH.: Chemische Studien über den Trachealknorpel. Skand. Arch. Physiol. (Berl. u. Lpz.) **1**, 210 (1889). — SYLVEN, B.: Über das Vorkommen hochmolekularer Esterschwefelsäuren im Granulationsgewebe bei der Epithelregeneration. Acta chir. scand. (Stockh.) **86**, Suppl., 66 (1941).

Dr. R. FRIEDE, 5764 Access Road, Dayton 3/Ohio (USA)