

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Marburg/Lahn
(Direktor: Prof. Dr. J. LINZBACH)

Beiträge zur Histochemie der Blutgefäßendothelien und der Capillargrundhautchen

Von

WALDEMAR HORT und HEDWIG HORT

Mit 1 Textabbildung in 3 Einzeldarstellungen

(Eingegangen am 26. Juli 1958)

Alle Blutgefäße sind an ihrer Innenseite von Endothel ausgekleidet. Dieses für den morphologischen Betrachter scheinbar so einheitliche Gewebe lebt in den verschiedenen Gefäßabschnitten unter verschiedenen Bedingungen und erfüllt unterschiedliche Aufgaben. Auf dem Endothel von Arterien, Capillaren und Venen lastet ein verschieden hoher Blutdruck, das Arterienendothel hat im wesentlichen eine abdichtende Funktion (LINZBACH). Durch die Endothelmembran der Capillaren vollzieht sich in der Peripherie der Stoffaustausch. Dabei kommt es zu Veränderungen im Gas- und Nährstoffgehalt des Blutes, so daß die am Endothel vorbeiströmende Blutflüssigkeit in Arterien, Capillaren und Venen unterschiedlich zusammengesetzt ist. Es ist wenig Sichereres darüber bekannt, ob diesen standortbedingten Verschiedenheiten auch Abwandlungen in der Gestalt, in den Bausteinen und im Fermentgehalt der Endothelzellen entsprechen (s. ALTSCHUL). Über morphologische Unterschiede am Venen- und Arterienendothel ist früher berichtet worden (LINZBACH und HORT).

Durch diese Untersuchungen angeregt, stellten wir uns die Aufgabe, an gesunden Tieren (vor allem Meerschweinchen, daneben auch Hunden und Ratten) vergleichende Untersuchungen über den Fermentgehalt verschiedener Blutgefäßendothelien durchzuführen. Ausgewählt wurden zwei wesentliche Fermente, die alkalische Phosphatase und die Bernsteinsäuredehydrogenase. Beide sollten mit verschiedenen Nachweismethoden untersucht und außerdem sollte an einigen Geweben ein Einblick in das Cytochrom-Cytochromoxydase-System der Endothelien mit der Nadi-Reaktion gewonnen werden. An den Capillaren wollten wir die Befunde am Endothel vervollständigen durch die Darstellung der Grundhautchen in verschiedenen Capillarprovinzen mit Hilfe der Perjodsäure-Leukofuchsin-(=PAS-)Färbung.

I. Alkalische Phosphatase

In seiner grundlegenden Arbeit beschrieb GOMORI, daß die Gefäße, besonders die Capillaren und Präcapillaren, bei den meisten Tierarten viel alkalische Phosphatase (a. Ph.) enthalten, daß aber bei einzelnen Tierarten bemerkenswerte Differenzen bestehen. Bei der Ratte seien alle Capillaren positiv. BOURNE (1) untersuchte zahlreiche Meerschweinchenorgane, NEWMAN, FEIGIN und WOLF berichteten über die a. Ph. in sehr vielen Organen bei mehreren Nagetierarten. Während die positiven Capillaren von diesen Untersuchern stets hervorgehoben werden, sind die Endothelien der großen Gefäße niemals besonders erwähnt, und deshalb ist anzunehmen, daß sie ungefärbt geblieben waren. Andere Autoren sprechen in ihren Berichten nur unverbindlich vom Gefäßendothel. Vereinzelt sind positive Endothelien in manchen großen Blutgefäßen beschrieben worden, z. B. von KAR, BANERJEE u. GHOSH in der Rattenniere und SHERLOCK und WALSHE in den Zentralvenen der menschlichen Leber (s. auch GOESSNER). Positive Endothelien in größeren Lungengefäßen bei Mensch und Maus werden von KABAT und FURTH erwähnt und von PEARSE in einer größeren Lungenarterie abgebildet. In der Milz hebt GOESSNER beim Menschen und einigen Tierarten positive Endothelien in Zentralarterien hervor.

Material und Methoden

a) *Methode nach GOMORI* (s. PEARSE). Gefrierschnitte nach Formalinfixierung, 10—15 μ , Inkubationszeit: einheitlich 2 Std.

Untersucht wurden: 1. 6 männliche, mit pflanzlicher Kost ernährte Meerschweinchen, davon 3 jugendliche (335—390 g) und 3 ausgewachsene (595—735 g); 5 Tiere wurden mit Äther, eines durch Nackenschlag getötet. 2. Eine erwachsene weibliche Ratte, durch Nackenschlag getötet. 3. Zwei kleinere Hunde (Barbiturat-Narkose; Organstückchen nach dem Entbluten entnommen).

b) *Kupplungsreaktion* nach PEARSE. Gefrierschnitte 10—15 μ . Als Diazoniumsalz wurde diazotiertes 5-Chlor-o-toluidin verwendet. Inkubationszeit: $\frac{1}{2}$ und 1 Std.

Untersucht wurden: 4 männliche Meerschweinchen (450—735 g). Ferner: Dieselbe Ratte und dieselben Hunde wie bei der Gomori-Methode.

In beiden Versuchsreihen wurden folgende Organe untersucht: Meerschweinchen: In der Regel von jedem Tier alle in Tabelle 1 aufgeführten Organe. Ratte: Dieselben Organe außer dem Pankreas. Zusätzlich wurde ein Uterushorn untersucht. Hund: Dieselben Organe wie beim Meerschweinchen mit Ausnahme vom Zentralnervensystem, Netz und Hoden. Die Organstückchen aus der Brust- und Bauchhöhle waren bei allen Tieren spätestens 15 min p. m. entnommen, beim Zentralnervensystem des Meerschweinchens dauerte es manchmal etwas länger, maximal bis zu $\frac{1}{2}$ Std. Ergänzende Untersuchungen wurden an einzelnen Organen (Milz, Sehne, große Gefäße) von einigen weiteren Meerschweinchen und Hunden durchgeführt.

Ergebnisse

a) *Meerschweinchen*. Die Befunde sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Unterschiede in Abhängigkeit vom Lebensalter (jugendliche oder erwachsene Tiere) oder von der Todesart (Äther, Nackenschlag) ergaben sich nicht (s. dagegen PLENERT).

Capillaren. Die Gomori-Methode ergab eine quantitative oder anähernd quantitative (bei einzelnen Tieren auch geringere) Darstellung

der Haargefäße im Zentralnervensystem, Herzmuskel und Pankreas sowie an der Basis der Magenschleimhaut. Ziemlich reichlich positive Capillaren fanden sich auch im Zwerchfell, mehrere in der Milz (innerhalb der Follikel und in ihren Randzonen) sowie im Dünndarm, vereinzelte im Dickdarm. Im Hoden sahen wir öfter positive Capillaren. Da wir von diesem Organ aber Quetschpräparate untersuchten, können wir

Tabelle 1. *Befunde am Meerschweinchenendothel*

	Alkalische Phosphatase		Formazanbildung (Methode nach ZWEIFACH u. FRIED)	
	Capillaren	Große Gefäße	Capillaren	Große Gefäße
Großhirn	+++	s. Text	+	s. Text
Kleinhirn	+++		+	
Rückenmark	+++	+		
Herzmuskel	+++	negativ	+	+
Zwerchfell	++	negativ	+	+
Pankreas	+++	negativ	(+)	+
Magen, Schleimhaut . . .	++	negativ	+	+
Dünndarm, Schleimhaut .	+	negativ	+	+
Dickdarm, Schleimhaut .	(+)	negativ	(+)	+
Milz	+	selten +	+	+
Hoden	+	negativ	+	+
Nebenniere	?	negativ	+	+
Großes Netz	negativ	negativ	+	nicht zu beurteilen
Niere	negativ	negativ	+	+
Leber	negativ	negativ	+	+
Lunge	negativ	negativ	(+)	+
Aorta		negativ		+

Erläuterung: Große Gefäße = Arterien und Venen.

keine quantitativen Aussagen machen. In der Nebennierenrinde waren im äußeren und mittleren Anteil neben dem Plasma auch die Grenzen der Parenchymzellen deutlich gefärbt, eine Abgrenzung von den Sinuswänden war uns nicht möglich. Ungefärbt blieben die Capillarwände in Lunge, Niere, Leber und Netz, ebenso in Längsschnitten durch 6 Achillessehnen. Unsere Befunde stimmen meist mit denen anderer Autoren überein, besonders mit den obenerwähnten. Bei Capillaren mit geringer Aktivität der a. Ph. differieren die Angaben öfter, weil die Stärke der Reaktion von der Inkubationsdauer abhängt. Es ist bekannt, daß bei überlanger Inkubationszeit schließlich sämtliche Gewebs- und Zellstrukturen geschwärzt werden können (HOROWITZ).

Die Kupplungsreaktion ergab prinzipiell dieselben Befunde wie die Gomori-Methode, nur war die Capillardarstellung im allgemeinen spärlicher. Auch YOKOYAMA, STOWELL und MATTEWS sowie JOHNSON und KUGLER haben die geringere Empfindlichkeit dieser Methode hervor.

In den positiven Endothelzellen schlägt sich der Azofarbstoff in kleinen roten Körnchen nieder, die öfter um die Zellkerne herum angeordnet sind. Im Gegensatz dazu stellen sich bei der Gomori-Methode die Capillaren als schwärzlich gefärbte Röhrchen dar, in denen häufig die Endothelkerne dunkler gefärbt sind.

Über die Lokalisation der a. Ph. innerhalb der Capillarwände lassen sich nur begrenzte Aussagen machen. Ob die Grundhäutchen a. Ph. enthalten, ist nicht zu entscheiden. Sie sind so dünn, daß man sie lichtmikroskopisch nicht gegen den schmalen Endothelbelag abgrenzen kann (s. S. 609). Dagegen gibt es für die intracelluläre Lage deutliche Hinweise, weil man bei der Kupplungsreaktion öfter rote Körnchen auch in dem dünnen Plasmasaum zwischen Kern und Lichtung sieht.

Große Gefäße. Im Gegensatz zu den zahlreichen positiven Capillarprovinzen blieben die *Endothelien in der Aorta und in den großen Gefäßen fast aller untersuchten Organe regelmäßig negativ*. Ausnahmen beobachteten wir nur im Zentralnervensystem und vereinzelt in der Milz.

Im Hirngewebe sind außer den Capillaren auch die Endothelzellen der größeren Blutgefäße positiv. Diese Gefäße zeichnen sich durch ihre Dünnwandigkeit aus. In der Regel sind sie nur von einer einzigen Lage glatter Muskelzellen umgeben, während entsprechend weite Arterien und Venen in anderen Organen gewöhnlich dickere Wände haben.

In der Milz beobachteten wir bei 2 Meerschweinchen von insgesamt 17 untersuchten Tieren in der Intima einzelner Zentralarterien zahlreiche, bei der Kupplungsreaktion rotgekörnte (und nach GOMORI schwarz gefärbte) Zellen (vgl. auch GOESSNER). Sie reichen oft bis an die Lichtung heran und haben häufig lange Fortsätze, die sich in die Gefäßwand hinein erstrecken. Daneben kommen aber auch rotgekörnte Zellen vor, die nach Form und Lage ganz wie Endothelzellen aussehen. Es ist möglich, daß es sich bei den beschriebenen Zellen z. T. um Wanderzellen handelt, die von der Adventitia herstammen, denn dort kommen oft zahlreiche ähnliche Zellen vor. Außerdem liegen in der Milzpulpa viele positive Einzelzellen.

Bei der Gomori-Reaktion können positive Befunde durch Diffusion vorgetäuscht werden [s. FEIGIN und WOLF (1)]. An unseren Präparaten sahen wir in den größeren Gefäßen von Niere, Nebenniere, Dünnd- und Dickdarm oft blaß gefärbte Endothelkerne. Diesen Befunden war aber eine besonders intensive Parenchymreaktion in der Nachbarschaft gemeinsam, und eine Fokaldiffusion ließ sich auch an der blassen Mitfärbung aller anderen anliegenden Zellkerne ablesen. Für ein Kunstprodukt spricht außerdem, daß diese Endothelien bei der Kupplungsreaktion ungefärbt blieben.

b) Ratte. Die Ergebnisse stimmen meist mit den Befunden am Meerschweinchen überein. Im Uterus waren die Haargefäße in der Schleim-

haut und in der Muskulatur intensiv positiv. In der Lunge fanden sich im lymphatischen Gewebe von Bronchialwänden wenige positive Capillaren (vgl. auch die positiven Befunde von KABAT und FURTH sowie NEWMAN, FEIGIN und WOLF und auch HEINRICHSEN in Lymphknoten). Über die Capillaren in der Darmschleimhaut ließ sich wegen der zahlreichen positiven langgestreckten Bindegewebszellen keine Aussage machen.

LEDUC und WISLOCKI beschrieben, daß sich im Rattengehirn mit der von ihnen benutzten, modifizierten Gomori-Methode zwar die Arteriolen, nicht aber die Capillaren anfärben. Wir haben deshalb in Kontrollpräparaten die Erythrocyten dargestellt und die Projektionszeichnungen dieser Schnitte mit den nach GOMORI behandelten verglichen. Die Gefäßmuster stimmen so gut überein, daß die Capillaren in unseren Gomori-Präparaten a. Ph. enthalten müssen [s. auch FEIGIN und WOLF (2), NEUBECKER].

Unterschiede zum Meerschweinchen ergaben sich in der Niere und Nebenniere. In der Niere waren bei der Gomori-Reaktion die Glomeruli blaß positiv, und im Mark färbten sich Capillaren an [vgl. auch SACHS und DULSKAS; KAR, BANERJEE und GHOSH; GOMORI, BOURNE (1) sowie BEJDL und DULSKAS beschrieben dagegen negative Glomeruli]. In der Nebenniere wurden im Mark und Rinde die Capillaren intensiv gefärbt.

In den großen Gefäßen und in der Aorta waren — genau wie beim Meerschweinchen — die Endothelzellen negativ mit Ausnahme der größeren Blutgefäße im Zentralnervensystem und einzelner Zentralarterien in der Milz.

c) Hund. Die Ergebnisse decken sich im wesentlichen mit denen beim Meerschweinchen. Abweichende Befunde ergaben sich in folgenden Organen: In der Niere des einen Hundes waren einzelne Capillarschlingen in den Glomeruli schwach positiv (s. auch KRITZLER und BEAUBIEN sowie WANG und GROSSMAN). In der Nebenniere fanden sich deutlich positive Capillaren. Dagegen war im Pankreas (nur von einem Hund untersucht) in den Haargefäßen keine a. Ph.-Aktivität nachweisbar (s. auch WANG und GROSSMAN, DELCOURT), ebensowenig in den Milzgefäßen.

Die Endothelien der großen Gefäße waren in allen untersuchten Organen sowie in der Aorta, Lungenschlagader und im herznahen Anteil der oberen Hohlvene negativ. Von 7 untersuchten Aortenwänden sahen wir nur in einer vereinzelt positive Capillaren (Vasa vasorum). Diese stammte von einem fetten Mops, bei dem auch in anderen Organen die Capillaren auffallend stark reagierten. In dem an glatter Muskulatur reichen Hauptstamm der Lungenschlagader kamen bei 1 von 3 Hunden mehrere positive Capillaren vor, in der schmalen Muskelwand der Hohlvenen sahen wir nur vereinzelt fraglich positive Capillaren. Dagegen

waren in der Adventitia großer Gefäße Capillaren mit deutlich nachweisbarer a. Ph. ein häufiger Befund.

Besprechung der Befunde

Die Befunde anderer Autoren und auch unsere eigenen Ergebnisse zeigen, daß die a. Ph.-Aktivität kein integrierender Bestandteil aller Endothelzellen ist. Sie läßt sich in zahlreichen Capillarprovinzen nachweisen, in anderen dagegen und im Endothel der großen Gefäße in der Regel nicht.

Ein Deutungsversuch der vielfältigen histochemischen Befunde setzt die Kenntnis der Funktion der a. Ph. im Stoffwechselgeschehen voraus. Die histochemischen Reaktionen können zu dieser Kenntnis kaum etwas beitragen, denn aus methodischen Gründen weist man die Wirksamkeit der a. Ph. mit völlig unphysiologischen Phosphomonoesterasen nach.

Im Zellstoffwechsel spielen die Phosphorylierungen eine überragende Rolle. Es ist jedoch nicht im einzelnen bekannt, welche Reaktionen von jenem Ferment katalysiert werden, das sich histochemisch als a. Ph. nachweisen läßt.

Gewichtige Argumente sprechen dafür, daß die a. Ph. eine wesentliche Rolle beim Transport der Glucose durch die Zellen hindurch spielt.

Nach biochemischen Untersuchungen herrscht Einigkeit darüber, daß die Aufnahme von Glucose in die Zelle nicht allein durch Diffusion erfolgt, sondern daß häufig ein aktiver Transport — vermutlich durch enzymatische Phosphorylierung — mit im Spiele ist (s. KÜHNAU, LEFEVRE). Dieser Transport- („Carrier“-) Mechanismus (s. auch DE DUVE und HERZ) soll bei der Glucoseaufnahme im Dünndarm und in den Nierentubuli mitwirken, also an den Orten mit der höchsten a. Ph.-Aktivität überhaupt, abgesehen vom Knochen. Für den Glucose-Transport durch die Capillarwand wird derselbe aktive Zusatzmechanismus angenommen (s. KÜHNAU, BAUR).

Es fragt sich, ob man mit dieser Transport-Hypothese die unterschiedliche Verteilung der a. Ph. im Endothel verstehen kann. Wenn man die Haargefäße im Hinblick auf ihr Versorgungsgebiet betrachtet, so fällt auf, daß die *Organe mit stark positiven Capillaren* während ihrer Tätigkeit *einen regen Stoffwechsel haben*. Dies gilt für das Zentralnervensystem, die Herz- und Skelettmuskulatur sowie für die Drüsen mit äußerer Sekretion (Ausnahme: Hund, Pankreas) und mit innerer Sekretion (besonders nach DEMPSEY, GREEP und DEANE).

Die Capillaren ohne nachweisbare a. Ph.-Aktivität versorgen dagegen entweder nur ein spärliches Parenchym (Glomeruli, Lungen, großes Netz) oder ein sehr anspruchloses Gewebe (Sehne). Nicht in dieses einfache Schema hinein paßt die Leber, die weiter unten besprochen wird. Die Wände der Arterien mit ihren negativen Endothelien gehören zu den bradytropen Geweben (s. LINZBACH). Für das Endothel der Aorta

und der großen Arterien kommt hinzu, daß bei ihnen der Stoffaustausch von der Lichtung her wahrscheinlich nur gering ist (LINZBACH).

Nach diesen Befunden halten wir es für sehr wahrscheinlich, daß eine wesentliche Aufgabe der a. Ph. im Capillarendothel darin besteht, den Glucosetransport zu den aktiven Parenchymzellen hin zu beschleunigen, damit dem Herzen und der Skelettmuskulatur genügend Brennstoff zugeführt und der rege Stoffwechsel in den Parenchymzellen der übrigen Organe unterhalten werden kann. Dagegen dürfte in den Lungenalveolen, im großen Netz, in den Sehnen und Gefäßwänden die langsame Diffusion der Glucose durch das Endothel — ohne einen aktiven fermentativen Zusatzmechanismus — für den Stoffwechsel der versorgten Gewebe genügen. In den Glomeruli kommt hinzu, daß die Poren im Endothel so groß sind, daß die Glucosemoleküle mühelos hindurchfließen können (s. PEASE). Eine Ausnahme bilden die Glomeruli der Katzenniere, in denen viel a. Ph. nachweisbar ist (s. BAUR), sowie die schwach positiven Glomeruli von Ratte und Hund.

Eine Sonderstellung nimmt unter den besprochenen Organen die Leber ein, in der wir bei allen 3 untersuchten Tierarten trotz des sehr aktiven Parenchyms in Übereinstimmung mit RICHTERICH und WOLF; JACOBY und MARTIN; HERMAN und DEANE keine a. Ph.-Aktivität im Capillarendothel nachweisen konnten. Dagegen berichteten über positive Ergebnisse NEWMAN, FEIGIN und WOLF bei der Ratte, GOMORI und auch KRITZLER und BEAUBIEN beim Hund sowie LEDUC und DEMPSEY beim Meerschweinchen. GOESSNER beschrieb stark positive Sinuscapillaren beim Huhn.

Die fehlende oder die von manchen Autoren beschriebene geringe a. Ph.-Aktivität im Capillarendothel der Leber könnte durch folgende Befunde verständlich werden: Nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen von RÜTTNER und VOGEL (bei Maus und Ratte) soll es in den Lebersinus keine Basalmembranen geben. Die Kupfferschen Zellen liegen direkt den Leberzellen an und lassen zwischen sich kleine Lücken frei, in denen die Leberzellen unmittelbar vom träge vorbeifließenden Blutstrom umspült werden. Außerdem soll das Blut in der Leber besonders langsam fließen (NORDMANN), so daß womöglich genügend Zeit für die Glucoseaufnahme durch reine Diffusion gegeben ist.

Bei unserem Deutungsversuch über die Aufgabe der a. Ph. im Gefäßendothel bleiben manche Einzelheiten rätselhaft, vor allem die öfter beobachtete ungleiche Fermentverteilung in denselben Capillarprovinzen verschiedener Tierarten (s. auch GOESSNER). Voraussetzung für eine vollständigere Erkenntnis der Zusammenhänge ist eine Vertiefung unserer biochemischen Kenntnisse über die Rolle der a. Ph. im Zellstoffwechsel und eine Erweiterung unseres morphologischen Wissens über die submikroskopische Struktur der Gewebe.

Offen ist die Frage, ob die in den Capillarwänden vorkommende a. Ph. auch in den Endothelzellen selbst gebildet oder ihnen durch den Blutstrom zugeführt wird. Heute wird als der Hauptbildungsort der a. Ph. das Knochengewebe angenommen (BROWN), und eingreifende Untersuchungen scheinen gegen die Phosphatase-Bildung an den übrigen Orten ihres größten Vorkommens — Niere und Darm — zu sprechen (DALGAARD).

II. Nachweis der endogenen Reduktionsaktivität und der Bernsteinsäure-dehydrogenase mit Tetrazoliumsalzen

Im Gegensatz zur a. Ph., die offenbar besondere Transportfunktionen im Endothel ausübt, sind an der biologischen Reduktion von Tetrazoliumsalzen und bei der Nadi-Reaktion Fermente der Zellatmung beteiligt.

Die Bernsteinsäuredehydrogenase (BDH) überträgt als Bestandteil eines der wichtigsten Redoxsysteme den Wasserstoff unter physiologischen Bedingungen auf das Cytochromsystem, bei ihrem histochemischen Nachweis dagegen (teilweise) auf das Tetrazoliumsalz [s. GOEBEL und PUCHTLER (2), REMMEL].

Die Dehydrogenase-Aktivität der Endothelien hat bisher nur wenig Aufmerksamkeit gefunden. DOERR erwähnte im Rahmen seiner Untersuchungen mit der Triphenyltetrazoliumchlorid- (= TTC-) Methode (ohne zugefügte Substrate) lediglich in der Leber positive Endothelien. BAJUSZ dagegen wies mit ganz ähnlicher Methodik in zahlreichen menschlichen Organen Formazankristalle in Capillaren nach. Er arbeitete allerdings mit ungewöhnlich langen Inkubationszeiten (16—20 Std). Mit Neotetrazolium- (= Tetrazolpurpur = NT-) Salzen (und Succinat) blieben bei NEUMANN und KOCH sowie RUTENBURG, WOLMAN und SELIGMAN die Endothelien ungefärbt, bei HSU und HOCH-LIGETI entweder farblos, oder sie wurden nur ganz zart gefärbt. Auch PADYKULA, die mit Ditetrazoliumsalzen und Succinat arbeitete und die Organe vor der Inkubation auswusch, berichtete über negative Ergebnisse am Endothel. Die zitierten Untersuchungen wurden teils unter aeroben, teils unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Im Gegensatz zu diesen Befunden berichteten ZWEIFACH und FRIED, daß bei weiblichen weißen Ratten in den inneren Genitalorganen, in der Niere und der Arteria carotis die Endothelien in Capillaren und großen Gefäßen deutliche Formazankristalle aufweisen. Sie benutzten eine leicht modifizierte NT-Technik (s. u.).

Wegen dieser widerspruchsvollen Befunde untersuchten wir die Endothelien mit verschiedenen Methoden an Nativschnitten und an frischen Gewebsstückchen. Bei der Stückinkubation färben sich in dem kleinen Gewebsblock die Randpartien nur so weit, wie der Reduktions-indicator eindringen kann.

Material und Methoden

a) *Stückinkubation.* 1. Methode nach ZWEIFACH und FRIED. [Relativ hohe Konzentration NT (0,5%), Zusatz von Succinat und Aktivatoren. Die Konzentration des zugeführten Substrates gibt ZWEIFACH nicht an, wir wählten 0,2 m.]

Untersucht wurden 3 Meerschweinchen und 2 Hunde (dieselben wie bei der a. Ph.). Als Substrat wurde entweder Mannose oder Na-Succinat verwendet. Inkubationszeit: 4 Std.

2. Nach SELIGMAN und RUTENBURG [s. GOEBEL und PUCHTLER (2)]. (0,1% NT mit Phosphatpuffer und Na-succinat, ohne Aktivatoren.) Untersucht wurden 2 Meerschweinchen. Inkubation: 2 Std.

3. Nach ANTOPOL, GLAUBACH und GOLDMANN. (0,5% NT in 0,85%iger Kochsalzlösung, ohne Substrat.) Untersucht wurde 1 Meerschweinchen. Inkubationsdauer: 1 Std. Nach der Inkubation wurden die Gewebsstückchen bei allen 3 Methoden in Formalin fixiert und dann 10—15 μ dicke Gefrierschnitte angefertigt.

b) *Nativschnitte*. Gearbeitet wurde ausschließlich mit der nach GOEBEL und PUCHTLER (2) modifizierten Methode von SELIGMAN und RUTENBURG. (0,05%ige NT-Lösung mit Phosphatpuffer, Na-Succinat und einigen Salzen sowie Zusatz von KCN zum Ausschalten des Cytochromsystems als Wasserstoffacceptor.)

Untersucht wurden 3 Meerschweinchen sowie wenige Organe einer erwachsenen weiblichen Ratte. Dicke der Nativschnitte: 10—15 μ (Messertiefkühlverfahren). Inkubationsdauer: 2 Std.

Von den Meerschweinchen und Hunden wurden dieselben Organe wie bei der a. Ph. untersucht.

Inkubiert wurde in allen Versuchen bei 37° C. Die untersuchten Meerschweinchen waren durchweg erwachsene männliche Tiere.

Ergebnisse

a) *Meerschweinchen*. Methode nach ZWEIFACH und FRIED: Die größeren Gefäße und auch die *Aorta enthalten regelmäßig im Endothel kleine blaue Körnchen* (s. Abb. 1). Sie sind bei mittlerer Vergrößerung gut zu erkennen. Sie liegen zu mehreren, etwa 4—6, selten weniger, öfter mehr in einer Endothelzelle und sind um die Kerne herum angeordnet. Manchmal sieht man ein paar aneinanderliegende Körnchen, mitunter kommen auch kleine blaue Nadeln vor. Die Dichte der Körnchen ist etwa so groß wie in den glatten Muskelzellen der Gefäßwände — in Übereinstimmung mit ZWEIFACH und FRIED — oder wie in den interstitiellen Bindegewebszellen. Geringe Intensitätsunterschiede kommen in verschiedenen Organen vor. Schwach ist die Reaktion z. B. in den großen Lungengefäß. *Capillaren mit blauen Körnchen*

wurden in allen untersuchten Organen (s. Abb. 1), in manchen allerdings erst nach langem Suchen, gefunden. Ob alle Capillaren in den untersuchten Organen positiv sind, lässt sich nicht sagen, weil an den Gefrierschnitten die schwach positiven Capillarwände oft von den viel stärker mit blauen Kristallen beladenen Parenchymzellen überdeckt werden. In Präparaten von Herz und Nebenniere sieht man manchmal positive Capillaren besonders gut im unmittelbaren Anschluß an die gefärbte Randzone im sonst ungefärbten Zentrum der Schnitte. Auch kann man in diesem Gebiet große Gefäße beobachten, in denen ausschließlich das Endothel Formazankristalle enthält. Diese Befunde dürften sich durch die günstigen Diffusionsbedingungen in den Gefäßlichtungen erklären.

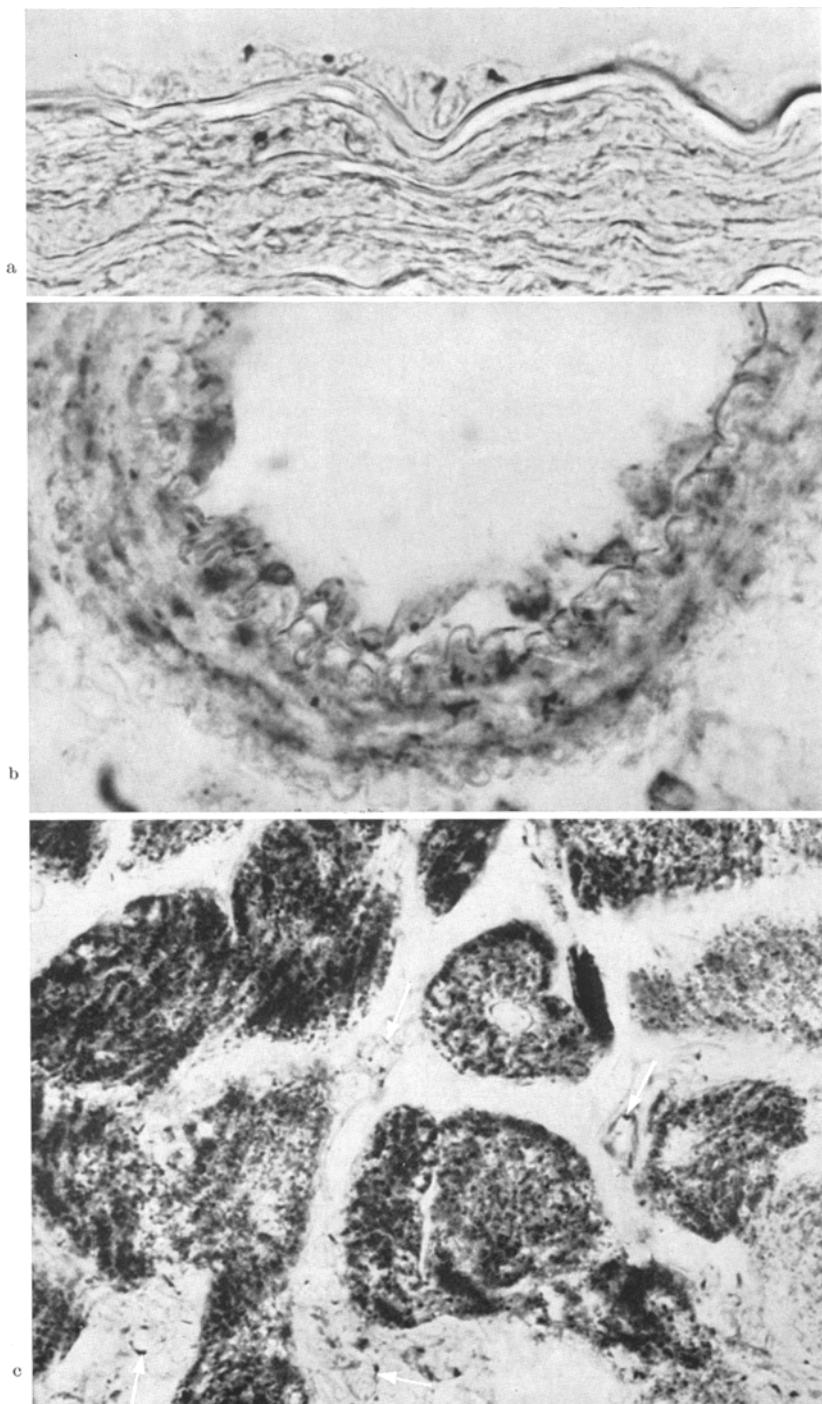


Abb. 1 a—c. (Unterschrift s. S. 601)

Aus unseren Befunden geht hervor, daß das Endothel sowohl in den Capillaren als auch in den großen Gefäßen Formazankristalle enthält. Wegen der geringen Reaktion und wegen der Schwierigkeit der Beurteilung ist eine exakte vergleichende Betrachtung der Reaktionsstärke im Endothel der verschiedenen Gefäßabschnitte unmöglich. Man kann aber sagen, daß die Endothelien in den großen Gefäßen einschließlich der Aorta sicher nicht weniger Formazankristalle enthalten als die der Capillaren, sondern eher etwas mehr.

Es fragt sich, ob die mit der Zweifachschen Methode in den Endothelien nachgewiesenen Kristalle Kunstprodukte sein können. Es wäre denkbar, daß die Körnchen im Endothel einer Diffusion aus der Nachbarschaft ihre Entstehung verdanken oder daß sie beim Schneiden heraufgewischt werden. Bei den großen Gefäßen spricht gegen eine Diffusion von der Gefäßmuskulatur her, daß die außen an die Gefäßwand angrenzenden Bindegewebsfasern ungefärbt sind. Ein Heraufwischen einzelner Körnchen beim Schneiden mag gelegentlich vorkommen, ist im großen und ganzen aber auszuschließen wegen der gleichen Größe und regelmäßigen Verteilung der Kristalle im Endothel. Außerdem sind die Erythrocyten in den Gefäßen frei von Körnchen.

Bei der Methode nach ZWEIFACH und FRIED können die im Gewebsstück enthaltenen endogenen Wasserstoffdonatoren mitwirken. Auch der Zusatz von Succinat zur Bebrütungslösung garantiert nicht den Nachweis von BDH. Dies geht auch daraus hervor, daß wir — in Übereinstimmung mit ZWEIFACH und FRIED — mit Mannose als Substrat fast dieselben Bilder bekamen wie mit Na-Succinat. In einer weiteren Versuchsreihe haben wir deshalb — wie auch GODDARD und SELIGMAN — von einem Meerschweinchen alle Gewebsstücke nach der Entnahme zunächst für 20 min in Ringerlösung eingelegt, um in der Randzone die endogenen Substrate auszuwaschen. Anschließend wurden die Stückchen inkubiert, teils mit, teils ohne Succinat. In den mit Succinat inkubierten war die Reaktion im Gefäßendothel in der Regel deutlich stärker als in den Kontrollen (die immer noch etwas endogenes Substrat enthielten). Daraus geht hervor, daß die *Endothelzellen BDH enthalten*. Aus diesen Befunden schließen wir, daß bei der Zweifachschen Methode die Formazankristalle im Endothel zum guten Teil unter Mitwirkung der BDH entstehen.

Bei der *Stückinkubation* in NT mit Succinat (Methode 2, s. S. 599) lagen im Endothel der großen Gefäße etwas weniger Kristalle als bei der Zweifachschen Methode, bei der Anwendung von NT ohne Succinat

Abb. 1 a—c. Formazan-Körnchen im Endothel der Aorta (a), einer Nierenarterie mit teilweise abgehobenem Endothel (b) und in Capillaren des Herzmuskels. (c, durch Pfeile markiert) Methode nach ZWEIFACH und FRIED. Alle Präparate stammen von einem 615 g schweren, männlichen, gesunden Meerschweinchen und sind 810 \times vergrößert.
Gefrierschnitte, 15 μ dick

(Methode 3, s. S. 599) waren es deutlich weniger. Die letztere Methode erlaubt nur Aussagen über die endogene Reduktionsaktivität.

Bei den *Nativschnitten* mußten wir in der Regel die starke Vergrößerung benutzen, um die fast immer zu mehreren in den Endothelzellen liegenden sehr kleinen blauen Körnchen zu finden. Die Capillaren ließen sich an den 15μ dicken nativen Gefrierschnitten nicht beurteilen.

Artefakte kommen bei den unfixiert geschnittenen Präparaten sicher vor, besonders in Organen mit stark positivem Parenchym (Herz, Zwerchfell, Niere, Leber). Hier liegen entsprechend kleine Körnchen wie im Endothel auch an den Bindegewebsfasern (die bei den anderen Methoden negativ sind, vgl. auch BAJUSZ und SZIRMAI) und an manchen Erythrocyten.

Zur Prüfung der Diffusion überdeckten wir bei der Inkubation mehrere durch Hitze inaktivierte Schnitte (s. GOEBEL und PUCHLER (2)) mit aktiven Schnitten von Rattenherzen. Die überdeckten Partien wurden diffus gerötet, aber Niederschläge, die eindeutig durch Diffusion entstanden wären, beobachteten wir nicht. An den Nativschnitten ließ sich ebenfalls die Mitwirkung der BDH an der Entstehung der Formazanniederschläge zeigen: Nativschnitte von Rattengewebe, die zuerst 15 min lang in Ringerlösung gebracht wurden, blieben in einer Inkubationslösung ohne Succinat völlig ungefärbt, während sich mit Succinat spärliche sehr kleine Körnchen im Gefäßendothel nachweisen ließen.

Die Glomeruli fanden wir bei den Nativschnitten — wie auch NEUMANN und KOCH — mit sehr feinen Körnchen bestäubt. Bei der Stückinkubation, besonders mit der Zweifachschen Methode, waren die Körnchen etwas größer und reichlicher. Im Gegensatz zu unseren Befunden werden die Glomeruli von fast allen anderen Untersuchern als ungefärbt beschrieben (SELIGMAN und RUTENBURG; PADYKULA; HSU und HOCHLIGETI; MUSTAKALLIO und SAIKKONEN; RUTENBURG, GOFSTEIN und SELIGMAN; BAJUSZ und SZIRMAI; ZWEIFACH und FRIED). Bei der Verwendung von TTC (ohne Succinat) blieben allerdings in Übereinstimmung mit DOERR und anderen Untersuchern auch in unseren Versuchen die Glomeruli frei von Körnchen.

b) *Hund*. In den mit der Methode nach ZWEIFACH und FRIED untersuchten Organen glichen die Befunde denen bei Meerschweinchen. Stets waren die Endothelien der großen Gefäße positiv und auch in den Capillaren ließen sich Formazanniederschläge nachweisen. Nur in der Lunge fanden wir keine sicher positiven Haargefäße.

Besprechung der Befunde

Aus unseren Untersuchungen geht hervor, daß das Ausmaß der Reduktion von Tetrazoliumsalzen im Endothel sehr von der angewandten

Methode abhängt. Beim Nachweis der endogenen Reduktionsaktivität schlügen sich im Endothel beim Zusatz von Succinat zur Inkubationslösung (Methode 2) mehr Formazankristalle nieder als mit Neotetrazolium allein (Methode 3), am meisten beim Hinzufügen von Succinat und Aktivatoren zur Bebrütungslösung (Methode 1). An Nativschnitten war die Reaktion geringer als an inkubierten Gewebsstückchen. Durch Auswaschen der endogenen Wasserstoffdonatoren ließ sich die Mitwirkung der BDH bei der Reduktion des NT aufzeigen.

Unsere in vielen Organen erhobenen Befunde deuten darauf hin, daß die BDH in allen Blutgefäßendothelien vorkommt. Dieser Befund überrascht nicht wegen der großen Bedeutung dieses Fermentes für die Zellatmung.

Aus der Menge der Formazankristalle kann man grobe Schlüsse auf die Stoffwechselintensität der untersuchten Gewebe ziehen. In Geweben mit lebhaftem Stoffwechsel bilden sich viel, in bradytropen wenig Formazankörnchen. Die *absolute Menge der Formazankristalle in einer Endothelzelle ist*, verglichen mit einer aktiven Parenchymzelle (z. B. Herz, Niere, Leber, Skeletmuskulatur) *sehr gering*. Wenige Körnchen in einer Endothelzelle stehen beispielsweise tausenden in einer Herzmuskelzellen gegenüber. Bei Schlüssen auf die Stoffwechselaktivität des Protoplasmas müßte man gleiche Areale (oder Volumina) verschiedener Gewebe miteinander vergleichen. Eine exakte Volumenbestimmung des hauchdünnen Plasmaleibes einer Endothelzelle (s. S. 609) ist aber mit dem Lichtmikroskop wegen seines begrenzten Auflösungsvermögens nicht möglich, so daß man aus unseren Präparaten nur grob orientierende Aussagen machen kann. Danach dürfte die Stoffwechselintensität des Endothelgewebes in derselben Größenordnung liegen wie bei der glatten Muskulatur und geringer sein als in den aktiven Parenchymen.

III. Nadi-Reaktion

Bei der Nadi-Reaktion soll die Oxydation des Substrates zu Indophenolblau durch die oxydierenden Fermente der Zellatmung (Cytochromoxydase — Cytochrom-Komplex) bewirkt werden (s. SCHÜMMELFEDER, LEUTHARD).

Wir führten die G-Nadi-Reaktion wie SCHÜMMELFEDER aus und untersuchten 15 μ dicke Nativschnitte mehrerer Organe von 5 Meerschweinchen. *Die Befunde am Endothel der großen Gefäße stimmten weitgehend mit den Tetrazolium-Ergebnissen überein:* In den Endothelzellen der großen Gefäße lagen spärliche, kleine blaue Körnchen, während die aktiven Parenchymzellen (z. B. Herz- und Skeletmuselfasern, Tubulusepithelien der Niere, Darmschleimhautepithelien) damit dicht vollgestopft waren. Auch die auflichtmikroskopische Untersuchung von Aortenstückchen ergab nur sehr wenige Körnchen im Endothel. Auf

Gefäßquerschnitten entsprach die Körnelung im Endothel ungefähr derjenigen in der glatten Muskulatur. Die Capillarendothelien konnten wir an den Nativschnitten nicht deutlich abgrenzen. Die Glomeruli waren diffus mit sehr feinen Körnchen schwach bestreut. Sie stachen durch ihre geringe Färbung auffallend gegen die sehr intensiv gefärbten Tubulusepithelien ab.

Unsere Befunde am Endothel stimmen mit denen von GRÄFF überein, der in den Endothelzellen der Gefäßwände ebenfalls nur sehr wenige Granula fand.

Es ist sicher kein Zufall, daß die Formazanbildung und die G-Nadi-Reaktion im Endothel in ihrer Größenordnung so gut übereinstimmen (und nur spärliche Niederschläge ergaben). Bei beiden Reaktionen nimmt nämlich das Cytochromsystem eine Schlüsselstellung ein: Die Bernsteinsäuredehydrogenase soll den Substratwasserstoff auf das Cytochromsystem übertragen, und die Indophenolblausynthese soll vom Cytochrom-Cytochromoxydase-System bewirkt werden.

IV. Mitochondrien

Die Fermentuntersuchungen eröffnen einen begrenzten Einblick in den Stoffwechsel des Endothels. Wir hatten gehofft, tiefer in das Verständnis durch eine morphologische und quantitative Untersuchung der Mitochondrien einzudringen.

Eine überzeugende färberische Darstellung der Mitochondrien ist uns an unseren Präparaten von Meerschweinchen aber nicht gelungen. Zwar sahen wir an Schnitten von ganz frisch entnommenen Leber- und Nierenstückchen nach Fixierung in Osmiumsäure oder in RÉGAUDS Gemisch (bei guter Darstellung der Mitochondrien in den Parenchymzellen) manchmal sehr kleine Körnchen in den Endothelzellen, die sich mit Eisenhämatoxylin intensiv schwarz anfärbten. Sie lagen entweder dicht am Zellkern oder im Plasma, mitunter auch in schmalen, durch die Fixation und Entwässerung vom Zelleib weitgehend abgerissenen Plasmafortsätzen. Wegen des seltenen Vorkommens dieser sehr kleinen Körnchen und wegen ihrer unregelmäßigen Verteilung waren Artefakte nicht sicher auszuschließen. Auch mit Janusgrün, Benzpyren und Rhodamin B ließen sich im Aortenendothel an Häutchenpräparaten oder bei der Auflichtuntersuchung keine Mitochondrien darstellen. EFSKIND gab an, daß er im Endothel von Kaninchen manchmal Mitochondrien anfärbten konnte.

Für das Vorkommen von Mitochondrien vermutlich in allen Endothelzellen sprechen die Fermentuntersuchungen: BDH kommt ganz überwiegend in den Mitochondrien vor (HÖLSCHER; SHELTON und SCHNEIDER; BARNET und PALADE) ebenso auch die Cytochromoxydase (s. LANG), und auch a. Ph. ist in Mitochondrien enthalten (ALBERT). Unsere

negativen Ergebnisse könnten darauf beruhen, daß die Mitochondrien im Endothel ungewöhnlich schwer anzufärben sind. In manchen tierischen Geweben sind Mitochondrien färberisch überhaupt nicht und in anderen nur in bestimmten Funktionsphasen der Zellen darstellbar, wie FINK gezeigt hat. Außerdem ist bekannt, daß die Mitochondrien unterschiedlich groß sind (s. HIRSCH) und daß ihre Größe häufig der Zellgröße proportional ist (FINK). Inzwischen liegen elektronenmikroskopische Abbildungen vor, die zeigen, daß die Mitochondrien im Endothel sehr klein sind: Ihre Breite beträgt etwa $0,2\text{ }\mu$ oder noch etwas weniger [s. SCHULZ (menschliche Lungencapillaren). PASCHEK, HAYEK und BRAUNSTEINER (Meerschweinchenalveole), MILLER und BOHLE (Rattenglomerulus), MOORE und RUSKA (Herzcapillaren von Säugern), BUCK (Aorta von Säugern)]. Aus diesen Befunden geht hervor, daß die Mitochondrien im Endothel an der Grenze der lichtoptischen Sichtbarkeit liegen, und es ist gut möglich, daß wir sie aus diesem Grunde bei unseren Untersuchungen nicht darstellen konnten.

Beim Betrachten der elektronenmikroskopischen Bilder gewinnt man den Eindruck, daß die Anzahl der Mitochondrien im Endothel gering ist.

V. Perjodsäure-Leukofuchsin-(= PAS-)Färbung der Capillaren

Material und Methoden

Untersuchte Tiere und Organe. 1. Drei ausgewachsene männliche Meerschweinchen (585—595 g), mit Äther getötet. Von einem Tier wurden alle in Tabelle 1 aufgeführten Organe untersucht, von den beiden anderen fast alle. 2. Drei männliche Meerschweinchen, davon zwei jugendliche (335 bzw. 390 g, mit Äther getötet) und ein ausgewachsener (Tod durch Nackenschlag). Untersucht wurden von jedem Tier mehrere Organe, insgesamt 13. 3. Eine ausgewachsene weibliche Ratte (400 g) mit Äther getötet. Untersucht: Niere, Lunge, Gehirn, Zwerchfell, Dünndarm. 4. Zwei kleinere Hunde, dieselben Tiere und dieselben Organe wie bei den vorhergehenden Untersuchungen. Entnahmestellen der Organstückchen: wie bei der a. Ph., s. S. 592.

Fixierung. Alkohol: Gruppe 1 und 3. Je $1/2$ Tag 70%iger, 96%iger und absoluter Alkohol, $1/2$ Std Toluol, 2 Std Paraffin, 58—60° C.

Formalin: (1 Teil konzentriertes handelsübliches Formalin + 9 Teile Wasser) *kurz*dauernd: Gruppe 1 und 3: 2 Tage lang; *lang*dauernd: Gruppe 2: 2—6 Monate lang; Gruppe 4: knapp 2 Monate lang.

ORTHS Gemisch: (s. ROMEIS) Organe von 1 Meerschweinchen aus Gruppe 1.

Die in Formalin und in ORTHS Gemisch fixierten Präparate wurden wie die der Alkoholgruppe entwässert und eingebettet. Schnittdicke $5\text{ }\mu$.

PAS-Färbung. Hotchkiss-Methode: s. GEDIGK und STRAUSS. [10 min Perjodsäure (= PJS), 20 min SCHIFFS Reagens]. McManus-Methode: Dieselben Zeiten wie bei der Hotchkiss-Methode. Wäßrige PJS-Lösung. An Stelle des Reduktionsbades werden die Schnitte in destilliertem Wasser abgespült.

Ergebnisse

a) *Einfluß verschiedener PAS-Methoden.* Beim Meerschweinchen färben sich die Capillar-Grundhütchen (= Capillarmembranen = Basal-

membranen der Capillaren) mit der Methode nach HOTCHKISS und McMANUS in gleicher Weise. Sie werden in den verschiedenen Organen entweder zartrot, nur angedeutet oder gar nicht gefärbt (s. S. 607). Die Intensität der Färbung läßt sich deutlich verstärken, wenn man die Perjodsäureoxydation und auch die Behandlung mit dem Schiffsschen Reagens verlängert. (Wir wählten je 1 Std.) Dann färben sich die mit den Originalmethoden zartroten Capillargrundhäutchen deutlich rot an, und die ungefärbt gebliebenen bekommen in der Regel einen blassen rosa Schimmer.

Bei unseren Untersuchungen beeinflußte eine zusätzliche Behandlung der formalinfixierten Paraffinschnitte mit Na-bisulfit (zum Entfernen freier Aldehyde, s. GEDIGK) die Färbbarkeit der Capillarwände ebenso wenig wie das Spülen der Schnitte mit SO_2 -haltigem Wasser nach der Färbung mit SCHIFFS Reagens. Auch der Zusatz von Na-acetat zur PJS-Lösung, der die saure Reaktion abschwächt, hatte auf die Färbung der Capillarwände keinen deutlichen Einfluß (geprüft mit wässriger 1%iger PJS und mit Zusatz von 0,3 bzw. 0,5 m Na-acetat).

b) Einfluß der Fixierung. Die geringste PAS-Reaktion ergaben die alkoholfixierten Präparate (Gruppe 1,3). An den formalinfixierten Organen derselben Gruppen fiel die Färbung fast immer deutlich stärker aus, auch mit Orthscher Flüssigkeit, die aber schlechter fixiert.

Die schwache Färbung der alkoholfixierten Präparate ließ sich durch nachträgliche Formalinbehandlung der Schnitte etwas verstärken. (Die entparaffinierten Schnitte von Rattenorganen wurden 1 Std in Formalin gestellt.) Eine geringe Intensitätszunahme ergab sich auch nach Vorbehandlung (alkohol- und formalinfixierter Schnitte) mit n NaOH ($\frac{1}{4}$ Std lang).

An den formalinfixierten Präparaten nahm die Stärke der Färbung mit der Fixierungsdauer zu: Die Capillarwände der lange fixierten Meerschweinchenorgane (Gruppe 2) waren durchweg wesentlich kräftiger gefärbt als die kurzdauernd fixierten der Gruppe 1. Auch bei der Ratte (Gruppe 3) waren nach vierteljähriger Formalinfixierung die Capillarmembranen intensiver gefärbt als in denselben Organen nach nur 2tägiger Formalinfixierung.

Von einer weiteren Ratte wurden Organstückchen von Niere, Lunge, Leber und Zwerchfell gefriergetrocknet (Anfertigen der Schnitte nach GERSH und CATCHPOLE) sowie Nachbarstückchen derselben Organe in Formalin (2 Tage lang) und in Alkohol fixiert. Die Capillarmembranen färbten sich mit der Hotchkiss-Methode an den gefriergetrockneten Präparaten ungefähr so kräftig wie an den alkoholfixierten und etwas schwächer als an den in Formalin fixierten.

c) Organunterschiede. Bei den untersuchten Tierarten ergaben sich in den verschiedenen Capillarprovinzen deutliche Unterschiede in der

Stärke der PAS-Reaktion. In allen Versuchsreihen färbten sich am intensivsten die Capillargrundhüütchen in den Glomeruli und in den Alveolen. Bei den lange in Formalin fixierten Präparaten sprangen sie mit ihrem kräftigen Purpurrot in die Augen, bei den kurz dauernd fixierten waren sie zart rot.

Ebenfalls gut stellten sich die Capillarmembranen im Zentralnervensystem dar, z. T. auch die Sinuswände in der Milz, die sich aber nur sehr schwer von den ebenfalls deutlich positiven reticulären Fasern abgrenzen lassen. In den übrigen untersuchten Organen (Herz, Zwerchfell, Pankreas, Nebenniere, Hoden, Netz, Magen-Darmkanal) färbten sich die Capillargrundhüütchen mit den Originalmethoden nur ganz schwach, manchmal kaum merklich an. An unbehandelten Leberschnitten waren wegen des hohen Glykogengehaltes der Leberzellen die Basalmembranen nicht zu beurteilen. Nach Speichelverdauung und an einer glykogenfreien Leber konnten wir ebenfalls keine deutlichen Basalmembranen erkennen.

Vorläufig nur in geringem Umfang durchgeführte Vergleichsuntersuchungen am Sektionsmaterial ergaben ähnliche Organunterschiede. Die Capillargrundhüütchen in den Glomeruli färbten sich bei Erwachsenen wesentlich kräftiger als bei Meerschweinchen und Ratte. Bei einem Säugling war dagegen die Färbung nur gering und bei einem Frühgeborenen (mens 7) nur angedeutet. Ähnliche altersbedingte Unterschiede beobachteten GERSH und CATCHPOLE an Schweinenieren.

d) *Postmortale Veränderungen*. Bei 4 gesunden, erwachsenen Meerschweinchen wurde der Einfluß der Autolyse auf die PAS-Färbbarkeit der Capillargrundhüütchen in Niere, Lunge und Zwerchfell untersucht. (An formalinfixierten Präparaten.) Von benachbarten Stellen derselben Organe wurden Teilstücke sofort nach dem Tode sowie nach 1 und 3 Tagen entnommen. Die Tiere wurden danach wieder zugenäht und lagen in einem verschlossenen größeren Gefäß bei Zimmertemperatur.

Bei jedem der Tiere fanden sich an allen untersuchten Organen deutliche postmortale Veränderungen an den Capillargrundhüütchen: Nach 1 Tag färbten sie sich etwas schwächer, nach 3 Tagen erheblich geringer als sofort nach dem Tode. Diese Befunde deuten auf einen autolytischen postmortalen Abbau der PAS-positiven Substanzen in den Capillarwänden hin.

Besprechung der Befunde

Aus mehreren Untersuchungen ist bekannt, daß Capillarmembranen sich mit der PAS-Methode anfärben lassen.

McMANUS beschrieb zuerst gefärbte Basalmembranen im Glomerulus. GERSH und CATCHPOLE fanden bei der Maus gefärbte Capillargrundhüütchen in der Lunge, Haut und im Glomerulus, CLARA (2) an Hirncapillaren beim Menschen, LEDUC und WISLOCKI bei der Ratte. MOOG und WENGER beschrieben bei einigen tierischen, z. T. embryonalen Organen PAS-positive Capillarwände, GRAUMANN (1)

bei Mäuseembryonen und beim Menschen in Milz und Tonsille (2). Im Gegensatz zu diesen positiven Befunden betont CLARA (2), daß beim Menschen in Milz, Tonsille, Zirbeldrüse, Leber, Hypophyse und Nebenniere die Capillarmembranen stets ungefärbt seien. Die PAS-Färbung der Capillarwände kann man bei geeigneter (modifizierter) Technik sogar zur quantitativen Darstellung der Haar gefäße benutzen, wie am Herzmuskel gezeigt wurde (HORT, HECHT).

Das Capillargrundhäutchen besteht aus einer homogenen Grundsubstanz, in die feine reticuläre Fasern eingelagert sind. Es fragt sich, welche Bestandteile der Capillarmembran für die PAS-Färbung verantwortlich sind. Mit BARGMANN könnte man annehmen, daß im wesentlichen die reticulären Fasern die PAS-Färbbarkeit der Capillarwand bedingen. Diese sind nach allgemeiner Ansicht PAS-positiv. Nach CLARAS (1) Untersuchungen trifft dies beim Menschen aber nur für wenige Organe zu (Milz, Tonsille, Zirbeldrüse), während in den anderen die reticulären Fasern ungefärbt bleiben.

Eine Aussage über den Anteil der reticulären Fasern an der PAS-Färbung der Capillarwände läßt sich machen, wenn man versilberte und PAS-gefärbte Präparate miteinander vergleicht. In unseren nach GOMORI versilberten Schnitten bilden die Gitterfasern in den Capillargrundhäutchen ein mehr oder weniger deutliches Netz. Im Gegensatz dazu stellt sich bei der PAS-Färbung aber ein (besonders gut auf Querschnitten zu erkennender) kontinuierlicher, außen dem Endothel anliegender, dünner, rotgefärbter Mantel dar. Dieser Befund weist darauf hin, daß in erster Linie der andere wesentliche Bestandteil der Capillarwand — die *homogene Grundsubstanz* — für die PAS-Färbbarkeit verantwortlich ist. GERSH und CATCHPOLE sowie CLARA (2) kamen zu demselben Schluß. Aus den grundlegenden Untersuchungen von GERSH und CATCHPOLE wissen wir, daß die Grundsubstanz der Gewebe, die sich an den Haar gefäßen zur Capillarmembran verdichtet, PAS-positive Glykoproteine enthält. Chemische Untersuchungen stützen diese Befunde (s. GIBIAN).

Zu einem bescheidenen Teil könnten auch Anteile der reticulären Fasern zur PAS-Färbung der Grundhäutchen beitragen. Nach histo-chemischen Befunden von GERSH und CATCHPOLE sowie nach elektronen-mikroskopischen Untersuchungen von SCHWARZ und auch PAHLKE wissen wir nämlich, daß die sehr zarten argyrophilen Fibrillen von einem PAS-positiven Grundsubstanzmantel umgeben sind [s. auch GLEGG, EIDINGER und LEBLOND sowie GRAUMANN (3)].

Nach den elektronenmikroskopischen Abbildungen von Capillargrundhäutchen muß man sich sehr wundern, daß man diese Gebilde lichtmikroskopisch überhaupt sehen kann. Sie liegen nämlich fast alle unterhalb der Auflösungsgrenze des Lichtmikroskopes. Im Elektronenmikroskop stellen sie sich als zwischen den Endothelzellen und den angrenzenden Zellen gelegene Räume mit sehr geringer Dichte dar. (Sie

vermögen praktisch keine Osmiumsäure zu reduzieren.) Sie sind in den bisher untersuchten endokrinen Organen sowie in Lunge und Herzmuskel nur etwa $0,1 \mu$ breit oder schmäler, selten etwas breiter (LEVER; ECKHOLM; WETZSTEIN; BARGMANN und KNOOP, KARRER, MOORE und RUSKA). Im Glomerulus sind sie bei den untersuchten Tierarten $0,1$ bis $0,2 \mu$ breit (BERGSTRAND und BUCHT; MILLER und BOHLE; MILLER und SITTE; MUELLER, MASON und STOUT).

Die PAS-gefärbten Capillargrundhäutchen kann man lichtmikroskopisch bereits bei mittlerer Vergrößerung als schmale, rot gefärbte Mäntel erkennen. Unter der Voraussetzung, daß die elektronenmikroskopischen Befunde die wahre Dicke der Basalmembranen wiedergeben, könnte man annehmen, daß es bei der PAS-Färbung zu einer Quellung der Capillarmembranen durch Fixation und Färbung kommt oder daß sich anliegende Strukturen mitfärben. Zu einer solchen Mitfärbung könnten die Capillarendothelien kaum etwas beitragen, denn sie sind — abgesehen von der Verdickung um die Zellkerne herum — nur wenige hundert Å dick (vgl. POLICARD, COLLET und PREGERMAIN, BARGMANN und KNOOP, KARRER, ECKHOLM).

Der Einfluß der Fixierung auf die Intensität der PAS-Färbung ist schwer zu deuten. Bei der Verstärkung der PAS-Färbung durch Formalin kann es sich nicht um eine einfache Anlagerung oder um einen Einbau von Formaldehyd unter Erhaltung der Aldehydgruppe handeln, weil mit dem Schiffschen Reagens allein (ohne Perjodsäurevorbehandlung) die Capillarmembranen ungefärbt bleiben. Vermutlich werden die Glykoproteine der Grundhäutchen durch die Formalinfixierung für die Perjodsäureoxydation besser angreifbar. Es ist interessant, daß sich nach HOLCZINGER auch die PAS-Färbbarkeit reticulärer Fasern nach Formalinfixation verstärkt. Ihr PAS-positiver Grundsubstanzmantel dürfte dafür verantwortlich sein.

Es ist eine offene Frage, ob den Organunterschieden bei der PAS-Färbung quantitative oder qualitative Unterschiede im Glykoproteingehalt zugrunde liegen. Das gehäufte Vorkommen der Glykoproteine in den Capillarwänden der Lunge, die in den dünnwandigen Alveolen verlaufen, und in den zahlreichen, eng benachbarten Glomeruluscapillaren deutet auf eine besondere Stützfunktion an diesen Stellen hin. Für eine Stützfunktion dieser PAS-positiven Substanzen sprechen ferner die Viscositätsverminderungen der Grundsubstanz nach Einwirken von Hyaluronidase (s. GIBIAN), welche sogar bei Mikroinjektion eine Ruptur der Capillarmembran bewirken kann (ZWEIFACH und CHAMBERS). Die besonders kräftige PAS-Färbbarkeit der capillären Basalmembranen im Glomerulus der menschlichen Niere könnte mit deren auffallender Dicke zusammenhängen. Sie sollen nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen von BERGSTRAND und BUCHT etwa $0,35 \mu$ breit sein.

Eine übersichtliche Beziehung zwischen dem Gehalt an a. Ph. und der Intensität der PAS-Färbung, wie z. B. bei der Ossifikation oder in manchen parenchymatösen Organen (KROON, MOOG und WENGER) besteht in den Capillarwänden nicht. Auffällig ist, daß sich in Glomerulus- und Lungencapillaren der Gehalt an a. Ph. und PAS-positiven Glykoproteinen gegensätzlich verhält.

Schlußbetrachtungen

Unsere Ergebnisse unterstreichen die Ansicht, daß das Endothel kein einheitliches, überall gleich gestaltetes Gewebe darstellt, sondern daß sowohl im Fermentgehalt der Endothelien als auch in den Capillargrundhautchen deutliche Organunterschiede auftreten. Aber mit diesen organspezifischen Unterschieden ist die Variabilität noch nicht erschöpft. Innerhalb einer Capillarprovinz können sich im Lauf der Entwicklung und unter physiologischen und pathologischen Bedingungen tiefgreifende Veränderungen abspielen, wie die Befunde an den Basalmembranen der Glomeruli in verschiedenen Lebensaltern zeigen. GERSH und CATCHPOLE fanden, daß bei der Maus die Löslichkeit und Extrahierbarkeit der Glykoproteine in der Grundsubstanz mit zunehmendem Alter abnimmt, und sie erklärten ihre Befunde mit einer fortschreitenden Polymerisierung dieser Substanzen.

Daß auch im Fermentgehalt alter und junger Gewebe deutliche Unterschiede auftreten, zeigen die Untersuchungen von BOURNE (2) sowie FLEXNER, GREENBLATT, COOPERBAND und FLEXNER für die a. Ph. und von BAAR für die BDH.

Im Capillarendothel können sich unter endokrinen Einflüssen auffallende Änderungen in der Aktivität der a. Ph. abspielen. An den Capillaren der Uterusschleimhaut treten deutliche cyclusbedingte Schwankungen auf (BURTON, AUGUSTIN, HEIDENREICH und THILO). DEMPSEY, GREEP und DEANE fanden, daß bei der Ratte nach Hypophysektomie die a. Ph.-Aktivität in den Capillaren der meisten innersekretorischen Organe völlig verschwindet und auch in der Skeletmuskulatur nicht mehr nachweisbar sein soll. Nach Nebennierenextirpation kommt es bei Ratten dagegen im Gefäßendothel der Leber zu einem Anstieg der a. Ph.-Aktivität (HIERONYMI).

Bei Sauerstoffmangel nimmt die a. Ph.-Aktivität in Capillarendothelien ab [GOEBEL und PUCHTLER (1)].

Die erwähnten Befunde zeigen, wie wandelbar der Fermentgehalt im Endothel und auch die Struktur der Capillargrundhautchen sind. Eine lebendige morphologische Anschauung wird sich nicht damit begnügen, das Endothel der Capillaren und der großen Gefäße isoliert und für sich allein zu betrachten. Die Capillaren und ihr Versorgungsgebiet bilden ein harmonisches Gefüge, und die Endothelien in den

großen Gefäßen werden auf die Besonderheiten der verschiedenen Gefäßwände abgestimmt sein. Im Verständnis dieser vielfältigen Zusammenhänge und ihrem Wechselspiel unter physiologischen und pathologischen Bedingungen stehen wir heute erst am Anfang.

Zusammenfassung

An zahlreichen Organen von Meerschweinchen, Ratten und Hunden wurden histochemische Untersuchungen am Endothel und an den Grundhautchen der Capillaren sowie am Endothel von größeren Blutgefäßen durchgeführt. Dabei fand sich:

Die *alkalische Phosphatase* ist unterschiedlich im Endothel verteilt. In der Aorta sowie im Endothel der Arterien und Venen fast aller untersuchten Organe ist keine alkalische Phosphatase-Aktivität nachweisbar. In den Capillarendothelien kommen ausgeprägte quantitative, organabhängige Unterschiede vor. Eine wesentliche Aufgabe der alkalischen Phosphatase im Blutgefäßendothel besteht wahrscheinlich darin, den Glucosetransport zu den aktiven Parenchymzellen hin zu beschleunigen.

Die *Formazanbildung* im Endothel der Aorta, Arterien, Venen und Capillaren ist spärlich, und ihr Ausmaß hängt von der angewandten Tetrazoliummethode ab.

Die Aktivität der *Bernsteinsäuredehydrogenase* im Gefäß-Endothel ist gering.

Die *Nadi-Reaktion* fällt ebenfalls nur schwach positiv aus.

Die Intensität der *PAS-Färbung* von Capillargrundhautchen hängt von der Fixierung ab. An formalinfixierten Präparaten stellen sich die Grundhautchen der Capillaren besser dar als an alkoholfixierten, und die Färbung wird mit zunehmender Dauer der Formalinfixierung kräftiger. Es ergeben sich deutliche Organunterschiede. Nach dem Tode wird die PAS-Färbbarkeit der capillären Basalmembranen allmählich geringer.

Summary

Histochemical examinations were made of the endothelium and the basement membranes of the capillaries and of the endothelium of larger blood vessels in numerous organs of guinea pigs, rats, and dogs.

Alkaline phosphatase is variously distributed in the endothelium. In the aorta and in the endothelium of the arteries and veins of almost all the organs examined no alkaline phosphatase activity is demonstrable. Marked quantitative organ-specific differences are found in the capillary endothelia. An important function of alkaline phosphatase in the vascular endothelium is perhaps the accelerating of the transport of glucose to the active parenchymal cells.

Formazan formation in the endothelium of the aorta, arteries, veins, and capillaries is slight; its extent depends upon the tetrazolium method used.

The activity of *succinic dehydrogenase* in the vascular endothelium is slight.

Likewise, the „*Nadi*“ reaction is only weakly positive.

The intensity of the *PAS-reaction* in the capillary basement membranes depends upon the fixation. In formalin fixed preparations the basement membranes of the capillaries are better shown than in preparations fixed with alcohol; the longer the formalin fixation lasts, the stronger the staining reaction becomes. Marked organ differences are obtained. The *PAS-reaction* in the capillary basement membranes gradually decreases post-mortem.

Literatur

- ALBERT, E.: Über Lokalisation und Spezifität der alkalischen und sauren Phosphatase im Nervengewebe. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **302**, 129 (1955).
 ALTSCHUL, R.: Endothelium. New York 1954. — ANTOPOW, W., S. GLAUBACH and L. GOLDMAN: Effects of a new tetrazolium derivate on tissue, bacteria and onion root tips. *Publ. Hlth Rep. (Wash.)* **63**, 1231 (1948). — AUGUSTIN, E., O. HEIDENREICH u. A. THILO: Vorkommen und Aktivität der Phosphomonoesterasen im Genitaltrakt der weiblichen Ratte und im Blutserum und ihre Beeinflussbarkeit durch Ovarialhormone. *Arch. Gynäk.* **184**, 281 (1954). — BAAR, H. S.: Succinic dehydrogenase activity of normal and pathological tissue. *Schweiz. Z. Path.* **20**, 164 (1957). — BAJUSZ, E.: Über die Dehydrogenase-Aktivität der menschlichen Kapillaren. *Z. Vitamin-, Hormon- u. Fermentforsch.* **8**, 81 (1956). — BAJUSZ, E., u. E. SZIRMAI: Wirkung des neuesten Nebennierenrindenhormones „Elektrocortin-Aldosteron“ auf die histochemische Reaktion von Succino-Dehydrogenase. *Acta histochem. (Jena)* **2**, 1 (1955). — BARGMANN, W.: Die Morphologie der Kapillaren und des Interstitiums. In: *Kapillaren und Interstitium*. Stuttgart 1955. — BARGMANN, W., u. A. KNOOP: Vergleichende elektronenmikroskopische Untersuchungen der Lungenkapillaren. *Z. Zellforsch.* **44**, 263 (1956). — BARNETT, J., and G. E. PALADE: Histochemical demonstration of the sites of activity of dehydrogenase systems with the electron microscope. *J. biophys. biochem. Cytol.* **3**, 577 (1957). — BAUR, H.: Tierische Phosphatasen. *Z. Vitamin-, Hormon- u. Fermentforsch.* **2**, 507 (1948/49). — BEJDL, W.: Vergleichende Untersuchungen über die Verteilung der alkalischen Phosphatase in der Ur- und Nachniere sowie in den Nebennieren. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **61**, 533 (1955). — BERGSTRAND, A., and H. BUCHT: Anatomy of the glomerulus as observed in biopsy material from young and healthy human subjects. *Z. Zellforsch.* **48**, 51 (1958). — BOURNE, G. (1): The distribution of alkaline phosphatase in various tissues. *Quart. J. exp. Physiol.* **32**, 1 (1944). — (2): Changes in dephosphorylating enzymes in young and old tissues of the rat. *Gerontologia (Basel)* **1**, 50 (1957). — BROWN, R. K.: Über den Ursprung und die klinische Bedeutung der Plasmaenzyme. *Klin. Wschr.* **1958**, 1. — BUCK, R. C.: The fine structure of endothelium of large arteries. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 187 (1958). — BURTON, J. F.: The histological demonstration of alkaline phosphatase activity in human endometrium. *Brit. J. exp. Path.* **34**, 159 (1953). — CLARA, M.: (1) Beiträge zur Kenntnis der Gitterfasern. *Z. Zellforsch.* **37**, 389 (1952). — (2) Untersuchungen über den feineren Bau des Grundhüttchens bei den Blutcapillaren des Gehirns. *Dtsch. Z. Nervenheilk.* **171**, 62 (1953). —

DALGAARD, J. B.: Phosphatase in dogs following bile obstruction and removal of the small intestine. *Acta physiol. scand.* **16**, 287 (1949). — DELCOURT, A.: Phosphatases alcalines et function exocrine du pancréas. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* **149**, 1069 (1955). — DEMPSEY, E. W., R. O. GREEP and H. W. DEANE: Changes in the distribution and concentration of alkaline phosphatase in tissues of the rat after hypophysectomy or gonadectomy, and after replacement therapy. *Endocrinology* **44**, 88 (1949). — DOERR, W.: Über die Anwendung des Reduktions-indikators Triphenyltetrazoliumchlorid in Histologie und Histophysiologie. *Frankfurt. Z. Path.* **61**, 557 (1950). — DUVE, C. DE, and H. G. HERS: Carbohydrate metabolism. *Ann. Rev. Biochem.* **26**, 149 (1957). — ECKHOLM, R.: The ultra-structure of the blood capillaries in the mouse thyroid gland. *Z. Zellforsch.* **46**, 139 (1957). — EFSKIND, L.: Die Regenerationsverhältnisse im Intimaepithel nach Gefäß-Sutur. *Acta chir. scand.* **84**, 283 (1941). — FEIGIN, I., and A. WOLF (1): Artifactual nuclear staining in the Gomori method for demonstrating alkaline phosphatase. *Lab. Invest.* **2**, 115 (1953). — (2): The phosphatase of the nervous system. *J. Neuropath.* **14**, 11 (1955). — FINK, W.: Mitochondrien und ihre Darstellung. *Z. Krebsforsch.* **58**, 678—681 (1952). — FLEXNER, J. B., C. L. GREENBLATT, S. R. COOPERBAND and L. B. FLEXNER: Biochemical and physiological differentiation during morphogenesis. *Amer. J. Anat.* **98**, 129 (1956). — GEDIGK, P.: Histochemische Darstellung der Kohlenhydrate. *Klin. Wschr.* **1952**, 1057. — GEDIGK, P., u. G. STRAUSS: Zur Histochemie des Hämosiderins. *Virchows Arch. path. Anat.* **324**, 373 (1953). — GERSH, I., and H. R. CATCHPOLE: The organisation of ground substance and basement membrane and its significance in tissue injury, disease and growth. *Amer. J. Anat.* **84**, 457 (1949). — GIBIAN, H.: Der Beitrag des Chemikers zur Struktur- und Funktionsaufklärung der mesenchymalen Grundsubstanz mit besonderer Bezugnahme auf die Hyaluronidase und ihre Substrate. In: *Kapillaren und Interstitium*. Stuttgart 1955. — GLEGG, R. S., D. EIDINGER and C. P. LEBLOND: Same carbohydrate components of reticular fibers. *Science* **118**, 614 (1953). — GODDARD, J. W., and A. M. SELIGMAN: Histochemical demonstration of succinic dehydrogenase in rat hepatoma. *Cancer (Philad.)* **6**, 385 (1953). — GOEBEL, A., u. H. PUCHTLER: (1) Über das Verhalten der histochemisch nachweisbaren alkalischen Phosphatase und 5-Nucleotidase im Sauerstoffmangel und im Niereninfarkt. *Virchows Arch. path. Anat.* **326**, 119 (1954). — (2) Untersuchungen zur Methodik der Darstellung der Succinodehydrase im histologischen Schnitt. *Virchows Arch. path. Anat.* **326**, 312 (1955). — GÖSSNER, W.: Histo-chemischer Nachweis hydrolytischer Enzyme mit Hilfe der Azofarbstoffmethode. *Histochemie* **1**, 48 (1958). — GOMORI, G.: The distribution of phosphatase in normal organs and tissues. *J. cell. comp. Physiol.* **17**, 71 (1941). — GRÄFF, S.: Die Naphtholblau-Oxydasereaktion der Gewebszellen nach Untersuchungen am unfixierten Präparat. *Frankfurt. Z. Path.* **11**, 358 (1912). — GRAUMANN, W.: (1) Das Vorkommen von Perjodsäure-Leukofuchsin(PSL)-positiven Substanzen im embryonalen Organismus. *Anat. Anz.* **99**, 19 (1952). — (2) Die histochemische Perjodatreaktion der Reticulin- und Kollagenfasern. *Acta histochem. (Jena)* **1**, 116 (1954). — (3) Kohlenhydrathistochemie der Bindegewebsfasern. *Acta histochem. (Jena)* **3**, 226 (1956). — HECHT, A.: Zur capillären Gefäßversorgung der subendokardialen Muskelschichten im menschlichen Herzen. *Virchows Arch. path. Anat.* **331**, 26 (1958). — HEINRICHSEN, E.: Alkaline phosphatase and calcification in tuberculous lymph nodes. *Exp. Cell. Res.* **11**, 511 (1956). — HERMAN, E., and H. W. DEANE: A comparison of the localisation of alkaline glycerophosphatase, as demonstrated by the Gomori-Takamatsu method, in frozen and in paraffin sections. *J. cell. comp. Physiol.* **41**, 201 (1953). — HIERONYMI, G.: Quantitative und qualitative Untersuchungen alkalischer Phosphatase in Darm, Leber und Nieren bei adrenalektomierten Ratten. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **36**, 185 (1953). — HIRSCH, G. C.: Die Dynamik der Mitochondrien. In: *Allgemeine Stoffwechsel*

morphologie des Zytoplasmas, im Handbuch der allgemeinen Pathologie, Bd. 2/I, S. 92. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955. — HÖLSCHER, H. A.: Über die Reduktionsorte von Tetrazoliumsalzen in Tumorzellen. *Naturwiss.* **38**, 116 (1951). — HÖLZINGER, L.: Einfluß von Fixierungslösungen auf die PAS-Färbung der reticulären Fasern. *Acta histochem.* (Jena) **3**, 19 (1956). — HOROWITZ, Zit. nach R. RICHTERICH. — HORT, W.: Quantitative Untersuchungen über die Capillarisierung des Herzmuskels im Erwachsenen- und Greisenalter, bei Hypertrophie und Hyperplasie. *Virchows Arch. path. Anat.* **327**, 560 (1955). — HSU, Y. T., and C. HOCH-LIGETI: Studies on the reduction of tetrazolium derivatives by normal and diseased human tissues. *Amer. J. Path.* **29**, 105 (1953). — JACOBY, F., and B. F. MARTIN: Histo- and biochemical studies on alkaline phosphatase in guinea-pigs with experimentally produced obstructive jaundice. *J. Anat. (Lond.)* **89**, 440 (1955). — JOHNSON, F. R., and I. H. KUGLER: Alkaline phosphatase in the mucosal cells of small intestine of the rat, cat and dog. *J. Anat. (Lond.)* **87**, 247 (1953). — KABAT, E. A., and J. FURTH: A histochemical study of the distribution of alkaline phosphatase in various normal and neoplastic tissues. *Amer. J. Path.* **17**, 303 (1941). — KAR, A. B., S. BANNERJEE and A. GHOSH: Studies in the distribution and concentration of alkaline phosphatase in different tissues of alloxan-diabetic rats. *Anat. Anz.* **98**, 336 (1952). — KÄRNER, H. E.: The ultrastructure of mouse lung. *J. biophys. biochem. Cytol.* **2**, 241 (1956). — KRITZLER, R. A., and J. BEAUBIEN: Microchemical variation of alkaline phosphatase activity of liver in obstructive and hepatocellular jaundice. *Amer. J. Path.* **25**, 1079 (1949). — KROON, D. B.: Phosphatase and formation of protein-carbohydrate complexes. *Acta anat. (Basel)* **15**, 317 (1952). — KÜHNÄU, J.: Steuerungsmechanismen für den Stoffaustausch durch die Capillarwand. In: *Capillaren und Interstitium*. Stuttgart 1955. — LANG, K.: Lokalisation der Fermente und Stoffwechselprozesse in den einzelnen Zellbestandteilen und deren Trennung. 2. Colloquium der Dtsch. Ges. für phys. Chemie, Mosbach i. Baden 1951, S. 24. Berlin 1952. — LEDUC, E., and E. W. DEMPSEY: Aktivation and diffusion as factors influencing the reliability of the histochemical method for alkaline phosphatase. *J. Anat. (Lond.)* **85**, 305 (1951). — LEDUC, E., and G. B. WISLOCKI: The histochemical localisation of acid and alkaline phosphatases, nonspecific esterase and succinic dehydrogenase in the structures comprising the hematoencephalic barrier of the rat. *J. comp. Neurol.* **97**, 241 (1952). — LEFEVRE, P. G., and R. I. DAVIES: Active transport into the human erythrocyte. *J. gen. Physiol.* **34**, 515 (1951). — LEUTHARDT, F.: Lehrbuch der physiologischen Chemie, 12. Aufl. Berlin 1955. — LEVER, J. D.: The subendothelial space in certain endocrine tissues. *J. biophys. biochem. Cytol.* **2**, Suppl. 293 (1956). — LINZBACH, A. J.: Die Bedeutung der Gefäßwandfaktoren für die Entstehung der Arteriosklerose. 41. Tagung der dtsch. Ges. Path. **41**, 24 (1957). — LINZBACH, A. J., u. W. HORT: Mikroskopische Untersuchungen am Gefäßendothel mit Phasenkontrast- und Auflichtverfahren. *Virchows Arch. path. Anat.* **329**, 669 (1957). — McMANUS, J. F. A.: Histological demonstration of mucin after periodic acid. *Nature (Lond.)* **158**, 202 (1946). — MILLER, F., u. A. BOHLE: Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Basalmembran der Glomeruluscapillaren der Maus bei experimentellem Nierenamyloid. *Klin. Wschr.* **1956**, 1204. — MILLER, F., u. H. SITTE: Elektronenmikroskopische Befunde am Glomerulum bei der Masugi-Nephritis der Ratte. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **41**, 333 (1957). — MOOG, F., and E. L. WENGER: The occurrence of a neutral mucopolysaccharide at sites of high alkaline phosphatase activity. *Amer. J. Anat.* **90**, 339 (1952). — MOORE, D. H., and H. RUSKA: The fine structure of capillaries and small arteries. *J. biophys. biochem. Cytol.* **3**, 457 (1957). — MUELLER, C. B., A. D. MASON and D. G. STOUT: Anatomy of the glomerulus. *Amer. J. Med.* **18**, 267 (1955). — MUSTAKALLIO, K. K., and J. SAIKKONEN: Histochemical alterations in succinic dehydrogenase activity of rat tissues

following administration of disulfiram. *Acta path. scand.* **37**, 398 (1955). — NEUBECKER, R.: Hydrolytic enzymes in experimental disseminated encephalomyelitis in guinea pigs. *Lab. Invest.* **5**, 441 (1956). — NEUMANN, K., u. G. KOCH: Übersicht über die feinere Verteilung der Succino-Dehydrogenase in Organen und Geweben verschiedener Säugetiere, besonders des Hundes. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **295**, 35 (1953). — NEWMAN, W., J. FEIGIN and A. WOLF: Histochemical studies on tissue enzymes. IV. *Amer. J. Path.* **26**, 257 (1950). — NORDMANN, M.: Die pathologische Anatomie der Kapillaren. In: *Kapillaren und Interstitium*. Stuttgart 1955. — PADYKULA, H. A.: The lokalisation of succinic dehydrogenase in tissue sections of the rat. *Amer. J. Anat.* **91**, 107 (1952). — PAHLKE, G.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Interzellulärsubstanz des menschlichen Sehnengewebes. *Z. Zellforsch.* **39**, 421 (1954). — PASCHEK, F., H. HAYEK u. H. BRAUNSTEINER: Die Struktur der die Lungenkapillaren bedeckenden Epithelhürtchen. *Wien. Z. inn. Med.* **38**, 184 (1957). — PEARSE, A. G. E.: *Histochemistry*. London 1954. — PEASE, D. C.: Fine structures of the kidney seen by electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* **3**, 295 (1955). — PLENERT, W.: Der histochemische Nachweis der alkalischen Phosphatase als Routinemethode. *Acta histochem. (Jena)* **5**, 70 (1957). — POLICARD, A., A. COLLET et S. PRÉGER-MAIN: Sur quelques dispositions inframicroscopiques de l'endothélium des capillaires pulmonaires chez les mammifères. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **243**, 8 (1956). — REMMEL, W.: Tetrazoliumsalze und Zelfunktion. *Frankfurt. Z. Path.* **69**, 206 (1958). — RICHTERICH, R., u. A. WOLF: Zur Lokalisation der alkalischen Phosphatase in der Leber der Albinoratte. *Acta anat. (Basel)* **18**, 20 (1953). — ROMEIS, B.: *Mikroskopische Technik*. München 1948. — RÜTTNER, J., u. A. VOGEL: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Lebersinusoidwand. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **41**, 314 (1957). — RUTENBURG, A. M., R. GOFSTEIN and A. M. SELIGMAN: Preparation of a new tetrazolium salt which yields a blue pigment on reduction and its use in the demonstration of enzymes in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res.* **10**, 113 (1950). — RUTENBURG, A. M., M. WOLMAN and A. M. SELIGMAN: Comparative distribution of succinic dehydrogenase in six mammals and modification in the histochemical technic. *J. Histochem. Cytochem.* **1**, 66 (1953). — SACHS, H. W., u. A. DULSKAS: Die alkalische Phosphatase der Niere bei einigen Vergiftungen. *Virchows Arch. path. Anat.* **329**, 466 (1956). — SCHÜMMEL-FEDER, N.: Untersuchungen zur histochemischen Indophenolblausynthese der Herzmuskelzellen und Leukozyten. *Virchows Arch. path. Anat.* **317**, 707 (1950). — SCHULZ, H.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen der normalen Lunge und der Lunge bei Mitralklappenstenose. *Virchows Arch. path. Anat.* **328**, 582 (1956). — SCHWARZ, W.: Die Zwischensubstanzen des Bindegewebes. In: *Kapillaren und Interstitium*. Stuttgart 1955. — SELIGMAN, A. M., and A. M. RUTENBURG: The histochemical demonstration of succinic dehydrogenase. *Science* **113**, 317 (1951). — SHERLOCK, S., and V. WALSHE: Hepatic alkaline phosphatase. *J. Path. Bact.* **59**, 615 (1947). — WANG, K. J., and M. J. GROSSMAN: Histochemical study of alkaline phosphatase in tissue prepared by the freezing-drying method. *Anat. Rec.* **104**, 79 (1949). — WETZSTEIN, R.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Nebennierenmark von Maus, Meerschweinchen und Katze. *Z. Zellforsch.* **46**, 517 (1957). — YOKOJAMA, H. O., R. E. STOWELL and R. M. MATTEWS: Evaluation of histochemical alkaline phosphatase technics. *Anat. Rec.* **109**, 139 (1951). — ZWEIFACH, B. W., and R. CHAMBERS: The action of hyaluronidase extracts on the capillary wall. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **52**, 1047 (1950). — ZWEIFACH, B. W., and G. H. FRIED: Neotetrazolium studies of blood vessels. *Anat. Rec.* **121**, 97 (1955).

Dr. WALDEMAR HORT,
Pathologisches Institut der Universität Marburg/Lahn,
Robert-Koch-Str. 5