

Aus dem Pathologischen Institut (Vorstand: Prof. Dr. M. RATZENHOFER) und aus dem  
Pharmakologischen Institut (Vorstand: Prof. Dr. H. F. HÄUSLER) der Universität Graz

## Modellversuche zur Histochemie silberreduzierender Substrate

Von

M. RATZENHOFER und F. LEMBECK

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 24. Oktober 1958)

Die sog. argentaffine Reaktion (MASSON 1914) von Gewebsstrukturen im formolfixierten histologischen Schnitt zeigt die Anwesenheit reduzierender Substanzen im Gewebe an. Diese schlagen aus ammoniakalischer Silberlösung von sich aus, d.h. ohne Zugabe von Reduktionsmitteln, metallisches Silber nieder (s. ROMEIS 1943). Abgesehen von verschiedenen, im Körper weit verbreiteten reduzierenden Gruppen, wie etwa Sulfhydryl- oder Aldehydgruppen, welche wegen ihrer diffusen Verteilung im Gewebe keine klaren Reduktionseffekte hervorrufen, sind zunächst die melanotischen Pigmente der Haut usw. und deren Geschwülste, ferner fettige und andere Pigmente (s. HAMPERL 1932) argentaffin. Nur zum Teil argentaffin hingegen, und in dem Zusammenhang deshalb von besonderem histochemischen Interesse, sind die in der vorliegenden Studie untersuchten Wirkstoffe Adrenalin (A), Noradrenalin (N), Ascorbinsäure (C) und 5-Hydroxytryptamin (HT)<sup>1</sup>, obgleich *allen* von ihnen vor allem ein sehr starkes Reduktionsvermögen eigen ist und obgleich sie überdies beim Menschen in bestimmten Geweben und in Zellen in hoher Konzentration vorkommen, nämlich

- |         |   |
|---------|---|
| A und N | in Nebennierenmark, sympathischen Paraganglien, Phäochromocytomen.  |
| O       | in Hypophysenvorderlappen, Nebennierenrinde, Gelbkörper, interstitiellen Hodenzellen usw.   |
| HT      | im Magen-Darmtrakt (enterochromaffine Zellen) (Lit. s. ERSPAMER 1954), Carcinoiden des Darmtraktes (LEMBECK 1953), (RATZENHOFER u. LEMBECK 1954). |

Als Grundlage für den histochemischen Nachweis der 4 Substanzen kommen nun folgende wesentliche Eigenschaften in Betracht:

1. das starke Reduktionsvermögen aller 4 Stoffe (bezüglich HT: s. ERSPAMER 1954);
2. die Bildung gefärbter Oxydationsprodukte (gilt für A, N, HT), auf der die sog. Chromierung der phäochromen und der enterochromaffinen Zellen des Darms beruht;
3. das Kupplungsvermögen mit Diazoniumsalzen (gilt für A, N und HT);
4. die Eigenfluoreszenz bestimmter Reaktionsprodukte von A, N und HT (BACQ 1949, BARTER und PEARSE 1953, 1955), welche zum Teil die bekannten Fluoreszenzerscheinungen des Nebennierenmarkes (ERÄNKÖ 1954) bzw. der enterochromaffinen gelben Zellen des Darms (ERÖS 1932, HAMPERL 1932, VIALLI u. ERSPAMER 1942; SHEPHERD, WEST u. ERSPAMER 1953) hervorrufen.

<sup>1</sup> Seit 1. 1. 1956 wird auch in der deutschsprachigen Literatur an Stelle von „oxy“ die Bezeichnung „hydroxy“ verwendet, also Hydroxytryptamin an Stelle von Oxytryptamin (vgl. 3. Erg.-W. zum Beilstein-Handbuch).

Diese Eigenschaften sind neben zahlreichen anderen, die histochemisch außer acht fallen, *in vitro* auch schon bei geringen Konzentrationen der 4 Substanzen zu beobachten. Demgegenüber ist auffallend, daß der histochemische Nachweis der 4 Stoffe im Gewebe immer nur unter ganz bestimmten Voraussetzungen gelingt. Beispielsweise läßt sich die *Reduktion von Silberlösungen* durch die an reduzierenden Stoffen sehr reiche Nebenniere selbst in lebensfrischem Zustand nur dann erzielen, wenn die Silberlösung unmittelbar auf das *unfixierte* Gewebe zur Einwirkung gebracht wird (KUTSCHERA-AICHBERGEN 1922, OGATA u. OGATA 1923, BOURNE 1933, GIROUD und LEBLOND 1934, vgl. hierzu HAMPERL 1932), während sie nach vorausgegangener Fixierung mit allen üblichen Mitteln stets mißlingt, obwohl etwa durch die Alkoholfixierung sicher keine Zerstörung von A, N oder C eingetreten ist. Im Gegensatz dazu fällt die argentaffine Reaktion mit ammoniakalischer Silberlösung an den enterochromaffinen gelben Zellen des Darmes bzw. an Carcinoiden nur nach Fixierung mit Formol bzw. Formolgemischen positiv aus (FEYRTER 1934, GOMORI 1948, HAMPERL 1952), vorausgesetzt, daß innerhalb der von HAMPERL (1925, 1932) festgestellten 6 Std.-Frist fixiert wurde, offenbar deshalb, weil HT post mortem sehr rasch aus den Granula und den Zellen austritt und dann mittels der Diazoreaktion gegebenenfalls nur mehr im Gewebepreßsaft, aber nicht mehr in den Zellkörnchen nachweisbar ist (RATZENHOFER und LEMBECK 1954). Formolfreie Gemische, z. B. alkohol- oder sublimathaltige Flüssigkeiten sind zur Fixierung der spezifischen Substanz der gelben Zellen (HT) ungeeignet (s. PATZELT 1936). Andererseits vermochte CLARA (1944) zu zeigen, daß die Granula der gelben Zellen beim Menschen auch *frisch* durch angesäuerte Silbernitratlösung (Methode des Vitamin C-Nachweises nach GIROUD-LEBLOND) geschwärzt werden können.

Die *chromaffine Reaktion* mit Kaliumbichromat usw. beruht auf der Oxydation der Wirkstoffe in phäochromen und gelben Zellen bzw. in den von ihnen ausgehenden hochdifferenzierten Tumoren (Phäochromocytomen, Carcinoiden). Es ist dabei sehr bemerkenswert, daß die Braunfärbung der Granula in den gelben Zellen von all den Autoren seit J. E. SCHMIDT (1905) offenbar nur dann beobachtet wurde, wenn entweder die Fixierungsflüssigkeiten gleichzeitig Formaldehyd (FA) enthielten (Fixierungsgemische von ORTH, KOPSCH, REGAUD), oder wenn zunächst mit FA allein fixiert und erst nachträglich chromiert wird (gelbe Zellen: TEHVER 1930, SCHACK 1932; Carcinoid: FEYRTER 1953). Bei den phäochromen Zellen der Nebenniere ist eine derartige „Nachchromierung“ nicht möglich: vorausgehende Fixierung mit FA (HAMPERL 1932) oder anderen Flüssigkeiten (ROMEIS) zerstört das Vermögen der Zellen, sich unter Einwirkung des Bichromats zu bräunen; vielmehr gelingt bei diesen Zellen die Bräunung durch das Chromsalz nur dann, wenn dieses nach den Angaben von BORBERG (1913) 1. unmittelbar *allein* (mit schlechter allgemeiner Fixationswirkung) oder 2. *gleichzeitig mit FA* (in nicht zu großen Mengen! ROMEIS) zur Anwendung gebracht wird.

Die *Diazoreaktion* an gelben Zellen (CORDIER und LISON 1930, CLARA 1932, CLARA und CANAL 1932, VIALLI u. ERSPAMER 1933) und an Carcinoiden (RATZENHOFER 1954, RATZENHOFER und LEMBECK 1954) ist ebenfalls nur am rasch mit FA fixierten Material zu erzielen. Über die histochemische Diazoreaktion an A oder N enthaltenden Zellen liegen bis heute keine klaren Beobachtungen vor, obwohl man die Diazoreaktion zum chemischen Nachweis dieser Substanzen heranziehen kann (HEINRICH und SCHULER 1948).

*Eigenfluoreszenz* chromaffiner Zellen kennt man nur am formolfixierten, aber nicht am frisch untersuchten Material. Dies gilt für N-haltige Nebennierenmarkzellen (ERÄNKÖ 1954, 1955), enterochromaffine Zellen (ERÖS 1932, HAMPERL 1932) und Carcinoiden (FEYRTER 1953).

Diese Übersicht zeigt, daß der histochemische Nachweis von A, N, C und HT im Gewebe nur unter bestimmten Bedingungen möglich ist. Dabei fällt besonders auf, daß bei den enterochromaffinen Zellen und Carcinoiden die FA-Fixierung als unbedingte Voraussetzung für die Argentaffinität, für ihre Fluoreszenz, für die Diazo- und offenbar auch für die Chromreaktion im histologischen Schnitte angesehen werden muß. A und N dagegen sind nach FA-Fixierung mittels der Argentaffinreaktion und durch Chromierung nicht mehr darstellbar. C scheint durch die üblichen Fixationsmittel dem histochemischen Nachweis überhaupt entzogen zu sein. Seine Darstellung gelingt nur dann, wenn das Untersuchungsgut lebensfrisch in angesäuerte Silbernitratlösung verbracht wird (*primäre Silberreaktion*).

Auf die Bedeutung des FA für die Darstellung der enterochromaffinen Granula und die hierbei noch völlig ungeklärte Art seiner Einwirkung hat außer CORDIER (1926) und anderen

insbesondere FEYRTER in seinen Arbeiten immer wieder hingewiesen (s. FEYRTER 1953). Auch letzte Modellversuche von BENDITT und WONG (1957) befassen sich mit diesem Problem. Sie zeigten, daß HT, vermengt mit Gelatine und nachträglich mit Formaldehyd fixiert, die für die enterochromaffinen Zellen charakteristischen histochemischen Eigenschaften (Argentaffin-Reaktion, Diazo-Reaktion, Ferrieyanid-Reaktion, Fluoreszenz) gibt: nur die Indolreaktion mit p-Dimethylaminobenzaldehyd fiel nach Formalineinwirkung negativ aus.

Wie im folgenden ausgeführt wird, haben wir in eigenen Modellversuchen die vorgenannten kennzeichnenden Reaktionen der 4 Wirkstoffe und die Bedingungen beim Zustandekommen der argentaffinen und chromaffinen Reaktion im histologischen Präparat nachgeprüft, wobei die bedeutsame Rolle des Formaldehyds naturgemäß besondere Beachtung erforderte. Zur Argyrophilie wird in unseren Ausführungen nicht Stellung genommen.

### Methodik

Die Modellversuche hatten den natürlichen Verhältnissen im Gewebe und den Vorgängen bei der histologischen Technik (Fixierung, argent- und chromaffine Reaktion) Rechnung zu tragen. Dabei war zu berücksichtigen, daß im Gewebe am Orte der Reaktion die Substanzen A, N, C und HT in relativ hoher Konzentration vorkommen und ferner, daß im Zuge der Behandlung (Fixation, Wässerung usw.) mit löslichen und unlöslichen Reaktionsprodukten zu rechnen ist, wobei histochemisch freilich nur die unlöslichen erfaßt werden können.

Um das Verhalten der 4 Substanzen bei der argentaffinen Reaktion von verschiedenen Seiten zu beleuchten, wurden sie *in vitro* und am Objektträger unter wechselnden Bedingungen mit FA bzw. ammoniakalischer Silbernitratlösung bzw. Müllerscher Flüssigkeit zusammengebracht.

1. Folgende Ansätze wurden hergestellt:

a) 0,2 ml 1%iger Lösungen von A, N, C und HT<sup>1</sup>; 0,1 ml 5%iger Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung (pH 7,6); 0,5 ml 40%iges Formalin (neutrale Lösung).

b) 0,2 ml 1%iger Lösungen von A, N, C und HT; 0,1 ml 10%iger Essigsäure (pH 2,0); 0,5 ml 40%iges Formalin (neutrale Lösung); ferner entsprechende Kontrollansätze zu a und b, die statt Formalin Aqua dest. enthielten. Der Kontrollansatz zu a) entspricht etwa dem pH des Gewebes.

Diese Ansätze dienten zur Beobachtung *in vitro* bzw. wurden sie nach 3. weiterverwendet.

2. Wäßrige Lösungen der Substanzen wurden auf Objektträger aufgetragen, mit FA zusammengebracht, mit Silber- und Kaliumbichromat-Lösungen behandelt und makro- und mikroskopisch beobachtet.

3. Aus den Ansätzen von Punkt 1 wurden Proben auf Mattglasplatten aufgetüpfelt und ihr Verhalten gegenüber Silberlösung mit und ohne vorausgegangene Wässerung studiert.

Die Versilberung erfolgte durch Einlegen oder Besprühen der mit den 4 Stoffen beschickten gelatinierten Objektträger und Mattglasplatten mit 10%iger ammoniakalischer Silbernitratlösung (Fontanasche Lösung nach der Vorschrift von MASSON).

Weitere Einzelheiten sind dem folgenden Abschnitt zu entnehmen.

### Ergebnisse

**1. Der Einfluß des Formaldehyds.** Die Tabellen 1 und 2 zeigen das Verhalten der 4 Stoffe in saurer und schwach alkalischer Lösung *in vitro* im gewöhnlichen und UV-Licht. Dabei kommt es bei alkalischen A- und N-Lösungen nach 24 Std zur Verfärbung durch die entstehenden Oxydationsprodukte (BACQ 1949); auch bei HT zeigt sich, aber erst nach mehreren Tagen, eine gelbbraune Verfärbung.

<sup>1</sup> Für die Überlassung der Substanzen l-Adrenalinbitartrat (Fa. Sanabo-Wien), l-Noradrenalin-Base (Farbwerke Hoechst) und Hydroxytryptamin-Kreatininsulfat (Fa. Abbott-Chicago) sei den genannten Firmen an dieser Stelle gedankt.

Tabelle 1. *Ansätze a und b in vitro sowie deren Kontrollen ohne und mit FA nach 24 Std bei Zimmertemperatur bei Beobachtung im sichtbaren Licht*

	pH	A	N	C	HT
Ohne FA	7,6 4,0	rosa —	ocker —	— —	— —
Mit FA	7,6 4,0	schwach gelblich —	orange mit Nieder- schlag —	— —	sattgelb mit Nieder- schlag —

Tabelle 2. *Ansätze a und b in vitro sowie deren Kontrollen ohne und mit FA nach 24 Std bei Zimmertemperatur bei Beobachtung im ultravioletten Licht*

	pH	A	N	C	HT
Ohne FA	7,6 4,0	stark hellgelb —	— <sup>1</sup> —	— —	hellblau hellblau
Mit FA	7,6 4,0	hellblau —	grünlich —	— —	sehr stark hellgelb schwach hellblau

<sup>1</sup> Nach 30 min gelbgrüne Fluoreszenz, die nach etwa 12 Std verschwindet.

Die sauren Lösungen bleiben über Wochen unverändert und behalten auch ihre unveränderte Wirksamkeit.

Im ultravioletten Licht (Tabelle 2) sieht man bei HT im Sauren und Alkalischen von Anfang an die bekannte hellblaue Fluoreszenz (JEPSON u. STEVENS 1953). Die alkalische A-Lösung zeigt nach 24 Std die zuerst von GADDUM und SCHILD (1934) beschriebene starke Hellgelb-Fluoreszenz, die auf Oxydationsstufen des A zurückgeht.

Die entsprechenden in vitro-Ansätze (Tabelle 1) weisen im Sauren weder sofort noch nach Tagen eine Veränderung auf. Anders im Alkalischen: Bei HT tritt *sofort* ein weißlichgelber Niederschlag auf, der zusehends gelb wird. Bei N tritt erst im Verlauf etwa 1 Std ein gelber Niederschlag auf, der später nachdunkelt. Bei A kommt es zu einer Gelbfärbung und Trübung des Ansatzes erst nach mehreren Stunden.

Im UV-Licht (Tabelle 2) fällt bei den alkalischen FA-Ansätzen vor allem die starke und leuchtendgelbe Fluoreszenz des HT-Gemisches auf, ferner ist bei N eine grüngelbe und bei A eine hellblaue Fluoreszenz zu verzeichnen. Im Sauren treten keine auffallenden Veränderungen ein; lediglich die blaue Fluoreszenz des HT scheint etwas schwächer zu werden.

Zum weiteren Studium der FA-Wirkung wurden *Objektträger*, auf welchen die 4 Substanzen aus 1%iger wäßriger Lösung eingetrocknet waren, mehrere Tage hindurch in einer feuchten Kammer *FA-Dämpfen* ausgesetzt. Hier zeigte N bereits nach einigen Stunden eine starke Gelbfärbung. Bei HT entwickelte sich erst nach Tagen eine gelbe Verfärbung. Bei A hingegen kam es nur zu einer weißgelblichen Trübung, und C blieb ohne jede Verfärbung.

Die *mikroskopische Beobachtung* vor und während der Einwirkung der FA-Dämpfe ergibt bei HT anfangs die farblosen Kristalle der aufgetrockneten Substanz; nach 12—24 Std kann man dann die Bildung von gelblichen, 10—100  $\mu$  großen, schaumähnlichen Tröpfchen verfolgen, die sich rundherum anschließen oder an der Oberfläche der Kristalle wie ausgeschmiert erscheinen, und die im

UV-Licht nicht mehr hellblau, sondern gelb fluorescieren. Es handelt sich bei diesen gelben Tröpfchen somit bereits um die Reaktionsprodukte des HT mit FA. Je länger man FA einwirken läßt (10 Tage), um so mehr verschwinden die Kristalle und schließlich sind nur mehr gelbbraun fluorescierende, amorphe Bildungen vorhanden (Abb. 1 und 2). — Das gelbe Reaktionsprodukt von N, das durch 5stündige Einwirkung der FA-Dämpfe entstanden ist, besteht aus feinen gelben amorphen Körnchen; von den ursprünglichen farblosen Kristallen ist nichts mehr zu sehen. Bei A und C hingegen bleiben auch nach tagelanger Einwirkung der FA-Dämpfe noch immer die unveränderten Kristalle.

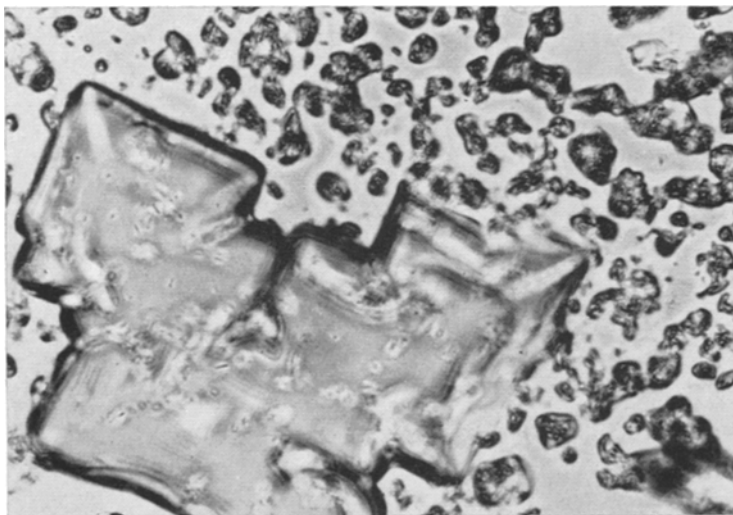


Abb. 1. Unvollständige Formaldehydwirkung auf 5-Hydroxytryptamin. Aus wäßriger Lösung auskristallisiertes Serotonin nach 17 stündigem Aufenthalt in FA-Dämpfen. Neben dem farblosen Serotonin-Kristall amorphe gelbliche Bildungen (Reaktionsprodukt HT-FA). 540fach

Um die Reaktionen im Gewebe bei FA-Fixierung im Modellversuch ganz grob nachzuahmen, wurden in weiteren Versuchen die 4 Substanzen in 1%iger wäßriger Lösung auf Objektträger aufgetropft und nach dem Eintrocknen mit kleinen Tröpfchen einer durch Zusatz von 10%igem wäßrigem Lithiumcarbonat *schwach alkalischen 10%igen FA-Lösung* vorsichtig überschichtet bzw. darübergetüpfelt. Laufende makro- und mikroskopische Beobachtung zeigte, daß sich die Kristalle von A, N und C sofort klar lösten, bei HT hingegen entstand schon nach etwa  $\frac{1}{2}$  min ein weißlicher Niederschlag. Bei N trat erst nach einigen Minuten eine gelbliche Trübung auf, mikroskopisch sieht man analoge gelbbraune Körnchen wie im oben beschriebenen Versuch mit FA-Dämpfen. Bei A ist erst nach etwa 1 Std eine leicht gelbliche Trübung zu verzeichnen, C verändert sich überhaupt nicht und die vor Verdunsten geschützte Lösung bleibt farblos und klar. Fortgesetztes Auftüpfeln der FA-Lösung ergibt dann in Übereinstimmung mit den Versuchen in vitro (vgl. Tabelle 1 und 2), daß bei HT schließlich ein makroskopisch gelbes Produkt entsteht, dem mikroskopisch wieder die in Abb. 2 abgebildeten amorphen gelbbraunen, stark fluorescierenden Krümel zugrunde liegen.

Diese Versuche zeigen übereinstimmend, daß wäßriger FA im schwach Alkalischen *nur bei HT sofort* zur Bildung eines unlöslichen Niederschlages führt. Auch

bei N bildet sich ein Niederschlag, doch dauert dies Minuten; bei A vergehen Stunden, ohne daß ausgesprochene Niederschlagsbildung eintritt. C zeigt überhaupt keine Reaktion.

Wenn man, um diese Effekte besonders deutlich zu zeigen, Objektträger mit den aufgetrockneten Substanzen in eine schwach alkalische FA-Lösung *einstellt* (wie in der histologischen Technik), so bleibt nur bei HT infolge sofortiger Reaktion ein auf dem Glas haftender Niederschlag, während die anderen Stoffe in

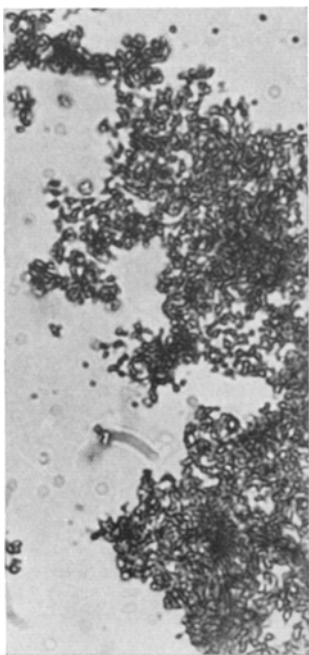


Abb. 2. Serotonin nach einwöchigem Aufenthalt in FA-Dämpfen. Nur mehr feine amorphe dunkelgelbe Partikel. 720fach

Lösung gehen, bevor es bei N und A durch Reaktion mit FA zur Niederschlagsbildung kommen kann. Auf die Verhältnisse der histologischen Technik übertragen bedeutet dies, daß nur HT mit FA sofort reagiert, während die Niederschlagsbildung von N und A mit FA erst zu einem Zeitpunkt erfolgt, nachdem die Stoffe aus ihrer ursprünglichen Lokalisation herausgelöst und in der Fixierungsflüssigkeit diffus verteilt wurden.

**2. Die Argentaffinität.** In vitro führen A, N und C auch in hohen Verdünnungen mit ammoniakalischer Silbernitratlösung fast augenblicklich zu einem Silberniederschlag, bei HT verläuft die Reaktion dagegen langsamer. Auch beim Besprühen der auf Objektträger aufgetrockneten Substanzen mit ammoniakalischer Silbernitratlösung tritt die Schwärzung in der Reihenfolge C—N—A—HT auf. In ähnlicher Weise kommt es auch nach Aufpinseln der Silberlösung zur Reduktion (Abb. 3/I).

Wenn hingegen die Substanzen auf gelatinierte Objektträger aufgetrocknet werden, anschließend für 3 Tage FA-Dämpfen ausgesetzt und zum Entfernen des FA mehrere Stunden in destilliertem Wasser gewaschen werden, so daß nur mehr die unlöslichen Reaktionsprodukte mit FA auf dem Objektträger verbleiben, dann sieht man nach dem Besprühen mit der Silberlösung nur mehr bei N und HT eine Schwärzung. Die gebildeten unlöslichen FA-Reaktionsprodukte von N und HT haben also ebenfalls reduzierende Eigenschaften!

Das gleiche Resultat: Schwärzung nur bei N und HT konnten wir dann erzielen, wenn die mit FA-Dämpfen behandelten und gewässerten Stoffe in die Silberlösung eingestellt wurden (Abb. 3/II).

Um die einzelnen Stufen dieses Endergebnisses zu erfassen, wurden folgende Versuche auf *Mattglasplatten* durchgeführt; die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Die schwach alkalischen bzw. sauren Ansätze a und b (vgl. Methodik Punkt 1), sowie deren Kontrollen ohne FA wurden nach 5tägigem Stehenlassen auf Mattglasplatten aufgetüpfelt; hierbei wurden gleichzeitig die nur bei den alkalischen Ansätzen von N und HT aufgetretenen gelb fluoreszierenden Niederschläge (vgl. S. 87) mit übertragen. Anschließendes mehrstündiges *Lüften* der Platten führte

zur Entfernung des in den Ansätzen vorhandenen FA bzw. der Essigsäure (Ansatz b), so daß wie bei Anstellung der argentaffinen Reaktion der FA als reduzierendes Agens ausgeschaltet wurde.

Wird eine derart mit den 4 Substanzen mit und ohne FA beschickte Mattglasplatte nunmehr gleichmäßig mit ammoniakalischer Silberlösung besprüht, so ahmt man nebeneinander den wesentlichen Vorgang bei der argentaffinen Reaktion (Massonsche Methode der „sekundären Silberreaktion“ nach vorausgegangener FA-Fixierung) bzw. bei der „primären Silberreaktion“ ohne vorausgegan-



Abb. 3. Gelatinierte Objektträger, beschriftet mit A, N, C und HT (O). Verhalten der Wirkstoffe gegenüber ammoniakalischer Silberlösung ohne bzw. nach Formaldehyd-Einwirkung. I: Ohne Formaldehyd. Die Silberlösung wurde auf die aufgetrockneten Stoffe direkt mit dem Pinsel aufgetragen. Ergebnis: Alle 4 Stoffe reduzieren. — II.: Formaldehyd-Dämpfe 3 Tage — 24 Std gewässert — untergetaucht in Fontanascher Lösung 12stündig. Ergebnis: A und C im Waschwasser in Lösung gegangen; nur N und HT (O) bildeten mit FA unlösliche Reaktionsprodukte, welche die Silberlösung reduzieren

gene Fixierung (Methoden von KUTSCHERA-AICHBERGEN; OGATA u. OGATA; GIROUD u. LEBLOND) nach. Es ergibt sich bei allen Tüpfeln eine mehr oder minder deutliche Schwärzung mit Ausnahme des Ansatzes „C—FA“, wo offenbar durch FA bereits eine Zerstörung des reduzierenden Agens erfolgt ist (Tabelle 3/I).

Zum Unterschied von dieser Versuchsanordnung wird aber in der histologischen Technik nach erfolgter FA-Fixierung zum Entfernen des FA vor der Versilberung nicht gelüftet, sondern gründlich *gewässert*. Im Modellversuch gingen wir entsprechend vor, indem nämlich die Mattglasplatten mit den eingetrockneten Ansätzen vorsichtig in destilliertes Wasser eingelegt wurden. Es konnten sodann nur mehr die wasserunlöslichen Niederschläge auf der rauhen Glasfläche haftenbleiben. Die darauffolgende Besprühung mit ammoniakalischer Silbernitratlösung ergibt im Vergleich zu oben (Tabelle 3/I) ein stark verändertes Bild (Tabelle 3/II): eine markante Schwärzung ist jetzt so wie bei den Objektträger-Versuchen (Abb. 3/II) nur mehr bei N und HT im alkalischen Ansatz zu sehen.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Mattglasplatten mit den eingetrockneten Ansätzen mit heißer 10%iger Gelatinelösung übersprüht, um ein Abschwemmen von Substanzen sicher zu verhindern, ohne daß dadurch das Heraus-

Tabelle 3. Verhalten gegenüber Fontanascher Lösung

	pH	I ohne vorangehende Wässerung				II mit vorangehender Wässerung			
		A	N	C	HT	A	N	C	HT
ohne FA	7,6	+++	+++	+++	++	—	—	—	—
ohne FA	4,0	+++	+++	+++	++	—	—	—	—
mit FA	7,6	++	+++	—	+++	+	+++	—	+++
mit FA	4,0	+	+	—	+	+	+	—	+

Erläuterung: +++ starke, + schwache, — keine Schwärzung.

waschen löslicher Stoffe beeinträchtigt würde; anschließende Wässerung und Besprühen mit Fontanascher Lösung führten wieder zu demselben Ergebnis wie zuvor (Tabelle 3/II).

Diese verschiedenen Versuche am Objektträger und der Mattglasplatte unterscheiden sich vom histologischen Verfahren nach MASSON nun durch die Art der FA-Einwirkung, indem die 4 Substanzen entweder mit FA-Dämpfen behandelt oder in den Ansätzen von vornherein lange Zeit mit dem wäßrigen FA zusammengebracht wurden und hiedurch für N genügend Zeit zur Niederschlagsbildung zur Verfügung stand. Wenn dagegen, wie bei der Massonschen Methode, die Objekte, d.h. die vier angetrockneten Stoffe, in die FA-Lösung *eingestellt*, anschließend gewässert und dann mit der Silberlösung behandelt werden, so kommt man wie im histologischen Schnitt zu folgendem Resultat: markante Schwärzung nur bei HT, bei N ganz undeutliche, bei A und C negative Reaktion. Der Grund liegt darin, daß bei dieser Methode durch die FA-Einwirkung im wäßrigen Milieu alles herausgelöst wird, das nicht *von vornherein* in unlöslicher Form vorliegt (wie im Gewebe z.B. Melanin) oder *sofort durch die FA-Einwirkung in ein unlösliches Produkt umgewandelt wird* (wie HT). Auch das nachfolgende Wässern bewirkt im Schnitt wie im letzten Modellversuch, daß nur mehr unlösliche Produkte für die nachfolgende Versilberung zurückbleiben (Tabelle 3/II). Es ist also die Versilberung im Gewebe vom Vorhandensein oder der Bildung unlöslicher reduzierender Substrate abhängig. Diese Voraussetzung ist auf Grund der vorangegangenen Untersuchungen mit FA (S. 86—88) bei den 4 Wirkstoffen aber nur für HT gegeben, insofern, als nur HT sofort, N dagegen erst nach einigen Minuten mit FA einen Niederschlag bildet, während A und C im wäßrigen FA überhaupt in Lösung gehen.

**3. Die Reaktion mit Müllerscher Flüssigkeit.** Wenn man 1%ige Lösungen der 4 Substanzen zu gleichen Teilen mit Müllerscher Flüssigkeit mischt, so beobachtet man innerhalb von 3 Std bei Zimmertemperatur folgendes:

A: dunkel rotbraune Verfärbung, keine Trübung, erst nach 1—2 Tagen ist eine Trübung, aber kein deutlicher Niederschlag zu sehen.

N zeigt binnen weniger Minuten eine braune Trübung, die sich nach 1—2 Std als *Niederschlag* absetzt.

C führt zu keiner Verfärbung und zu keinem Niederschlag.

HT ergibt in  $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$  Std eine bräunliche Trübung und nach 2—3 Std einen braunen *Niederschlag* (Abb. 4).



Bei Aufbringen Müllerscher Flüssigkeit auf Objektträger mit aufgetrockneten Substanzen beobachtet man ein ganz ähnliches Verhalten: während bei N und HT eine braune Trübung entsteht, bildet sich bei A eine dunkelrote Verfärbung, C zeigt nichts. Dieser Versuch entspricht im Wesen der *primären* Chromierung, z. B. von Nebennierenmark.

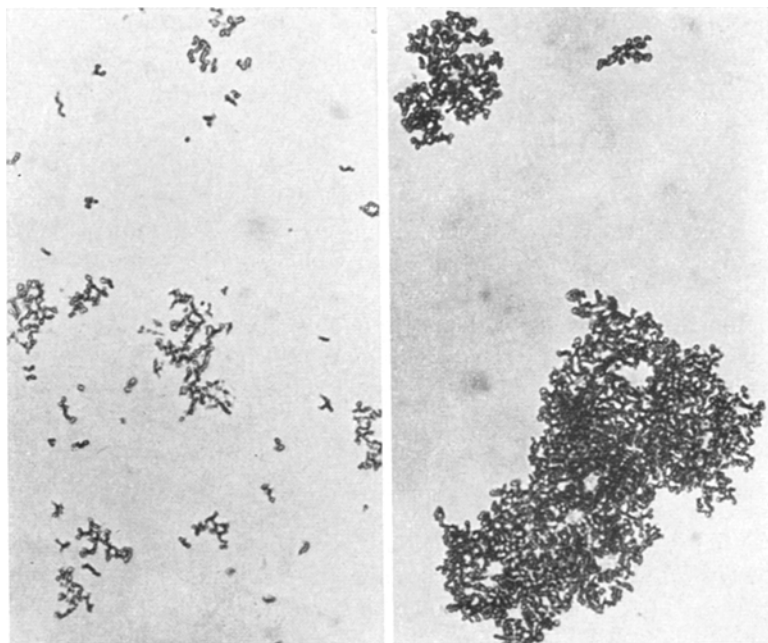


Abb. 4. Chromreaktion in vitro: 1‰-Lösungen von N bzw. HT, versetzt mit MÜLLERs Flüssigkeit 55 partes. Gewaschene 24Std-Niederschläge bei 180facher Vergr. Bei HT größere Agglomerate

Um die *sekundäre* Chromierung FA-fixierter *Gewebe* im Modell nachzuprüfen, wurden die 4 Substanzen auf Objektträger aufgetrocknet, mit Gelatine übersprüht, dann in FA-Lösung eingelegt, anschließend gründlich gewässert und erst darnach in Müllersche Lösung verbracht. Eine klare Niederschlagsbildung konnte jetzt nur mehr bei HT erzielt werden; die anderen Substanzen waren schon zuvor im wäßrigen FA in Lösung gegangen. Wurden hingegen FA-Dämpfe (4 Tage) angewendet, dann bildeten sich sowohl bei HT als auch bei N die gleichen gelbbraunen unlöslichen Reaktionsprodukte wie im früheren Versuch.

Tabelle 4. Verhalten gegenüber Echtrotsalz B

	pH	A	N	C	HT
ohne FA	8	++	+++	—	++
	6	++	+++	—	++
mit FA	8	—	++	—	++
	6	—	+	—	++

4. Die **Diazokupplungsreaktion** wurde lediglich zu kurzer Orientierung und Ergänzung in vitro und auf gelatinisierten Objektträgern mit dem von CLARA (1934) vorgeschlagenen stabilisierten Diazoniumsalz Echtrotsalz B ausgeführt (Tabelle 4). Weitaus am stärksten reagiert N, wobei am Objektträger schwarzbraune Farb-

töne entstehen und lebhafte Blasenbildung (Stickstoff) zu verzeichnen ist. Bei Zusatz von FA-Lösungen oder nachträglicher FA-Anwendung am Objektträger gibt A keine klare Reaktion mehr und auch N reagiert abgeschwächt. Damit steht im Einklang, daß die Diazoreaktion, wie in der Einleitung erwähnt, an frisch FA-fixierten Nebennierenmarkzellen praktisch negativ ausfällt und nur makroskopisch an der dicken Gewebsscheibe eine dunkelrotviolette Tönung zur Folge hat.

Bei HT ist die Probe nur im Modell sowohl ohne als auch mit FA positiv. Ihr negativer Ausfall im unfixierten Gewebe erklärt sich durch rasches Herauslösen des Stoffes durch die Farblösung.

### Besprechung der Ergebnisse

*Adrenalin* zeigt, wie schon lange bekannt ist, deutliche reduzierende Eigenschaften und fällt dementsprechend *in vitro* aus ammoniakalischer Silberlösung das Silber sofort aus. Wenn man aber, um den histologischen Bedingungen nahezukommen, zuerst FA einwirken läßt, dann entstehen zunächst bei einem dem Gewebe entsprechenden  $p_{\text{H}}$  Reaktionsprodukte, welche schwach gelblich sind und hellblau fluorescieren, welche nach Entfernen des FA durch Lüften nicht immer reduzieren, die aber *in Wasser leicht löslich* sind. Sie werden daher bei Einwirken von Wasser, wäßrigen Fixationsmitteln usw. ausgeschwemmt, selbstredend auch aus dem Gewebe, wenn die übliche Massonsche Methode angewendet wird. Erst diese Beobachtung macht die in der Literatur bisher nicht erklärte Tatsache verständlich, daß man nämlich histologisch in adrenalin-reichem Gewebe niemals eine Argentaffinität beobachten kann (HAMPERL 1932). Auch in Müllerscher Flüssigkeit tritt *in vitro* und daher auch im Gewebe mit A kein Niederschlag auf. Andererseits ist leicht einzusehen, daß frische A- und ebenso N- und C-haltige Gewebe Silberlösungen unmittelbar reduzieren („primäre Silberreaktionen“ von KUTSCHERA-AICHBERGEN, OGATA u. OGATA, GIROUD u. LEBLOND).

*Noradrenalin* reagiert als primäres Amin mit FA im Alkalischen wesentlich rascher als A, führt mikroskopisch aber auch erst nach etwa einer Stunde zur Niederschlagsbildung, mikroskopisch nach Minuten zur Entstehung gelbbrauner hellfluoreszierender Krume! Auch dieses Reaktionsprodukt N-FA reduziert Silberlösungen sehr leicht (Abb. 3/I). Da aber die Niederschlagsbildung mit FA nicht sofort einsetzt, ist bei der Gewebsfixierung in der üblichen 10%igen wäßrigen FA-Lösung seine Entstehung *in situ*, d. h. in den Zellen verzögert oder gar in Frage gestellt. Sehr wahrscheinlich erfolgt nämlich das Herauslösen des N durch die FA-Lösung ziemlich rasch und noch vor der Bildung der Niederschläge, da offensichtlich die ersten Reaktionsprodukte zwischen N und FA, erkenntlich an der Gelbfärbung und anfänglichen Fluoreszenz, noch wasserlöslich sind und erst dann in unlösliche Derivate übergehen. Auch ERÄNKÖ (1955) vermutete eine teilweise Löslichkeit des Produktes im Wasser.

Eigene Versuche zeigten, daß der aus 1 ml des Ansatzes a mit N abzentrifugierte 24-Std-Niederschlag nach neuerlichem Aufschwemmen mit 5%iger  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Lösung auch bei mehrfach wiederholtem Abzentrifugieren nicht mehr in Lösung ging. Ausschlaggebend scheint also nicht die Löslichkeit dieses endgültigen Reaktionsproduktes, als vielmehr seine langsame Entstehung zu sein.

Diese speziellen, vom histochemischen Standpunkt aus ungünstigen Bedingungen für die Bildung des unlöslichen N-FA-Produktes stehen nun mit folgenden Erfahrungstatsachen im Einklang:

1. Lebensfrische Scheiben von tierischem (nicht von menschlichem) Nebennierenmarkgewebe, mit wäßrigem FA fixiert, zeigen makroskopisch zwar die von SCHULZ (1938) beschriebene gelbe Verfärbung (durch das entstandene N-FA-Produkt, — aber die Zellen geben eine negative Diazo- und keine positive argentaffine Reaktion (Schwärzung); man sieht vielmehr nur eine diffuse bräunliche

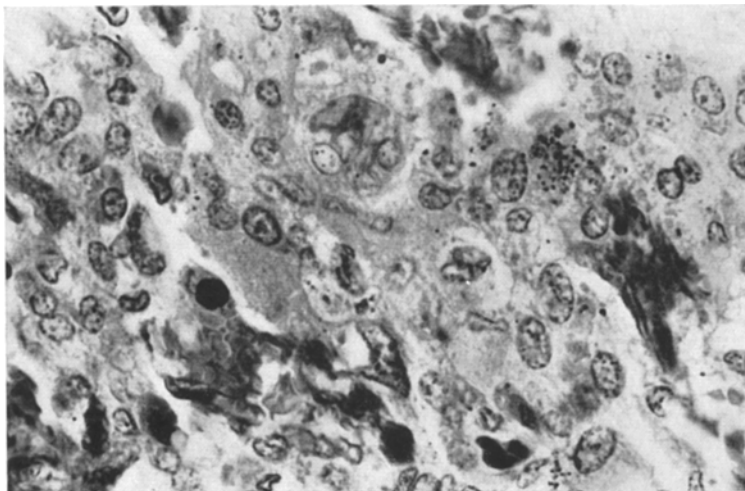


Abb. 5. E 5601/53, 70jähr. weibl. Phäochromocytom der linken Nebenniere. Wäßriges Formol, Argentaffinreaktion nach MASSON-HAMPERL. Vereinzelt argentaffine Granula in Tumorzellen, argentaffine Sekretkugeln in Capillaren. Geringe diffuse braune Tönung der Tumorzellen und Capillarwände. 540fach

Tönung des Gewebes, wie wir vermuten infolge zu geringer Konzentration und diffuser Verteilung des N-FA-Reaktionsprodukts im Gewebe.

2. Wie den Pathologen längst bekannt, aber bisher nicht erklärt ist, nehmen wäßrige FA-Lösungen, in welchen N-reiche Gewebe, vor allem Phäochromocytome fixiert und aufbewahrt werden, binnen wenigen Tagen eine zunehmende gelbbraune Tönung an und werden trübe. Die Farbe rührt offenbar von jenem in unseren Modellversuchen beobachteten gelbbraunen Niederschlagsprodukt des N mit FA her, welches (vom histochemischen Standpunkt aus betrachtet, bedauerlicherweise) eben erst dann entsteht, nachdem die Hauptmasse des N durch die FA-Lösung aus dem Gewebe ausgeschwemmt wurde. In Übereinstimmung damit sind die Tumorzellen der Phäochromocytome selbst bei hohem N-Gehalt und bei rechtzeitiger FA-Fixierung nach Anwendung der Masson-Hamperlschen Methode zumeist frei von argentaffinen Einlagerungen; wir konnten solche nur gelegentlich nachweisen und deuten sie als jene in der Tiefe der Gewebsblöcke verbliebenen Reste des N, welche doch noch in situ mit FA reagiert haben, ausgefällt wurden und dann das Silbernitrat reduziert haben (Abb. 5).

Wenn somit wegen der langsamen Ausfällung des N durch wäßriges FA das Massonsche Verfahren zum Nachweis des Noradrenalins in Gewebszellen praktisch

nicht geeignet ist, gelingt der histologische N-Nachweis mittels FA dennoch, nämlich nach dem Vorgang ERÄNKÖS (1954, 1955) *fluoreszenzmikroskopisch*. Dieser fixiert tierische Nebennieren 24 Std lang mit FA und deckt nach kurzem Wässern in Glycerin ein. Hellgrün fluorescierende Inseln im Markgewebe enthalten, wie er an Parallelschnitten chromatographisch und biologisch beweisen konnte, N, während das nichtfluorescierende übrige Markgewebe vorwiegend A enthält. Eine endgültige Erklärung für diesen Befund ERÄNKÖS ist heute noch nicht möglich. Sie dürfte darin zu suchen sein, daß das nach unseren Beobachtungen nur zögernd entstehende fluorescierende N-FA-Produkt nach 24 Std in den Zellen topographisch etwa richtig, doch in solchen Mengen gebildet wird, daß es zu seinem sehr empfindlichen fluoreszenzmikroskopischen Nachweis, jedoch nicht zur Argentaffin-Reaktion ausreicht. Ferner fällt offenbar mit ins Gewicht, daß ERÄNKÖ 40  $\mu$  dicke, also schlecht auswaschbare Schnitte verwendet, nach der Formolfixierung nur kurz wässert und gleich in Glycerin einschließt, so daß das schwer lösliche N-FA-Produkt nicht komplett ausgeschwemmt wird, während es bei der histologischen Methode auf Argentaffinität aus den wesentlich dünneren Schnitten beim Wässern vor der Einstellung in die Silberlösung offenbar vollständig entfernt wird.

Noch ein weiterer, uns vorläufig nicht klar deutbarer Befund soll hier kurz erwähnt werden: während wir in den Modellversuchen auf Objektträgern (s. S. 88) bei N, so wie bei HT durch FA-Dämpfe — offensichtlich wegen der verhinderten Abschwemmung noch löslicher Reaktionsprodukte durch Wasser und wegen der langen FA-Einwirkung — jedesmal eine positive argentaffine Reaktion erhielten (vgl. Abb. 3/II), gelang es auch bei wiederholten Versuchen mit frischem Nebennierengewebe vom Menschen oder der Katze niemals, nach der gleichen Fixierungsweise ein positives Resultat zu erzielen. Warum in dem Falle trotz tagelanger FA-Dampfeinwirkung die Bildung unlöslicher N-FA-Produkte offenbar unterblieben ist, bleibt vorläufig unklar.

Nach all diesen Erfahrungen *spielen beim Problem der Fixierung der Katechole offensichtlich die Lösungsbedingungen der Reaktionsprodukte mit FA die ausschlaggebende Rolle*.

Ein saures  $p_H$  verhindert die Bildung unlöslicher N-FA-Produkte überhaupt (Tabelle 1 und 2).

Müllersche Flüssigkeit bildet mit N in vitro einen braunen unlöslichen Niederschlag; *er* ist das Substrat der positiven Chromreaktion im Gewebe. Vorausgehende Einwirkung von wäßrigem FA verhindert diese Reaktion infolge Lösung des N in der FA-Flüssigkeit und dies ist der Grund, warum eine sekundäre Chromierung des FA-fixierten Nebennierenmarkes nicht möglich ist. BORBERG (1913) sah die beste Chromierung des Nebennierenmarkes bei Einlegen in Müllersche Flüssigkeit und nachträglicher FA-Fixierung nach frühestens 24 Std. Es ist die Frage, ob es sich dabei im Gewebe nur um die — BORBERG damals noch unbekannten — Noradrenalin-Oxydationsprodukte, die *rasch* entstehen, handelte, oder ob auch Adrenalin unter den Bedingungen im Gewebe zu derartigen unlöslichen Derivaten führen kann; die in vitro-Versuche zeigen zumindest die vorherrschende Wirkung des Noradrenalins.

*Vitamin C* bildet mit FA keinen Niederschlag und es reduziert auch nicht mehr, sobald es mit FA zusammengebracht wurde, da es durch diesen zerstört wird (TONUTTI 1940). Es ist daher der empfindlichste der vier untersuchten Stoffe; nach FA-Fixierung sind die Bedingungen zu seiner Darstellung nicht mehr gegeben, wie schon lange bekannt ist. Es ist verständlich, daß Vitamin C im Gewebe nur unter der Voraussetzung einer unmittelbaren, primären Einwirkung die Silbernitratlösung zu reduzieren vermag [Prinzip der Methoden von KUTSCHERA-AICHBERGEN (1922), OGATA u. OGATA (1923), GIROUD und LEBLOND (1934) zum Nachweis stark reduzierender Substanzen]. Wie WIMMER schon 1939 feststellte, fluoresciert Vitamin C weder als Reinsubstanz noch in wäßriger Lösung. Die Fluoreszenzerscheinungen ascorbinsäure-reicher Parenchym- und Endothelzellen, welche er bei Ratten nach subcutaner Einverleibung von Vitamin C in FA-fixierten Gefrierschnitten beobachtete, werden von WIMMER auf fluoroskopische Eigenschaften der „Trägersubstanz“ des Vitamins (TONUTTI 1937) zurückgeführt.

*Hydroxytryptamin* reduziert ammoniakalische Silberlösung in vitro weniger rasch als A, N und C. Auf Zugabe von FA und HT erfolgt im schwach alkalischen Milieu, wesentlich rascher als bei N, eine *sofortige* Trübung und Niederschlagsbildung. Dieser Niederschlag, das HT-FA-Reaktionsprodukt, ist amorph, gelb, dunkelt im Laufe der Zeit nach, dürfte daher einer fortlaufenden chemischen Umwandlung unterliegen. Er zeigt intensive Gelbfluoreszenz, haftet ziemlich fest auf der Mattglasplatte und kann auch von nachträglich gelatinierten Objektträgern nicht mehr ausgewaschen werden. Durch diese Eigenschaften, insbesondere aber durch seine rasche Entstehung schafft dieses Reaktionsprodukt HT-FA erst jene bei den anderen 3 Wirkstoffen nicht vorhandenen günstigen Voraussetzungen sowohl für eine topographisch richtige Lokalisierung des HT im Gewebe, als auch für seine nachfolgende histologische Darstellung mit Farbstoffen (s. PATZELT), bzw. durch die kennzeichnenden speziellen Reaktionen (Argentaffin- und Diazo-Reaktion, Chromierung und Fluoreszenz). *FA fixiert demnach nicht nur das Eiweiß der Zellen, sondern auch HT selbst*, A und C dagegen überhaupt nicht und N nur in histochemisch nicht verwertbarem Umfang. FA stellt somit aus diesen Gründen, wie wir glauben erklärt zu haben, bei rechtzeitiger Anwendung *das* ideale Konservierungsmittel für die gelben und Carcinoidzellen und ihren Wirkstoff dar. Ein entsprechend leistungsfähiger Fixierer ist für A und C, aber auch für N bis heute nicht bekannt.

Sehr bemerkenswert ist bei dieser Sachlage noch, daß nach CLARA (1944) auch die Körnchen *unfixierter* basalkörniger Zellen des menschlichen Darms angesäuertes Silbernitrat zum Teil reduzieren sollen, ganz nach Art von Ascorbinsäure! Dieses Ergebnis sei nach diesem Autor (1957) „sicher auf keine Wirkung von Vitamin C zu beziehen“. Ob es sich bei diesem Effekt (der beim Meerschweinchen nicht zu beobachten ist, VETTER 1939) tatsächlich um eine Reduktion durch ein unverändertes HT in den Zellgranula handelt, muß erst exakt bewiesen werden. Zu unseren Versuchsergebnissen (vgl. S. 88 und Tabelle 3/II) steht eine solche angenommene primäre Silberreduktion durch das noch unveränderte HT in Einklang.

Auch eine Erklärung für die längst bekannte *Gelbfärbung* (OBERNDORFER) und Eigenfluoreszenz des formolfixierten Carcinoidgewebes ist nunmehr möglich,

weil nämlich, wie wir zeigen konnten, HT mit FA das in den Modellversuchen dargestellte gelbe unlösliche Produkt in den dicht gepackten Tumorzellen in situ bildet und dieses zum Unterschied von A und N durch die Fixierungsflüssigkeit aus den Zellen nicht ausgeschwemmt wird. Der gleiche Vorgang ist verantwortlich für die von einigen Autoren (s. PATZELT, SCHULZ) beschriebene inkonstante Gelbfärbung der Granula FA-fixierter gelber Zellen, der Mutterzellen der Carcinomide.

In Müllerscher Flüssigkeit mit FA-Zusatz tritt ebenfalls sofortige Niederschlagsbildung ein. Der Einfluß des Bichromats bei dieser Reaktion dürfte, wie die papierchromatographischen Untersuchungen von LEMBECK und KLEMENTSCHITZ (1955) über die Wirkung von FA auf HT annehmen lassen, vor allem in der Beschleunigung oxydativer Vorgänge bei der Reaktion zwischen HT und FA zu suchen sein. Bei Einwirkung von Müllerscher Flüssigkeit allein auf HT entsteht das unlösliche Reaktionsprodukt erst nach Viertelstunden bis Stunden (S. 90), also zu einer Zeit, in der HT aus den leicht zersetzlichen enterochromaffinen Granula der gelben und der Carcinoidzellen im wesentlichen schon ausgetreten ist — und offenbar so kann erklärt werden, warum eine primäre Chromierung der gelben Zellen nicht möglich ist (vgl. S. 84).

Wir möchten hier das für die histologische Praxis so bedeutungsvolle *inverse Verhalten von HT und N gegenüber FA und Bichromatlösungen* nochmals kurz zusammenfassen: Bichromat reagiert fast sofort mit N, aber langsam mit HT, ist somit zu dessen histochemischer Darstellung allein ungeeignet; FA dagegen reagiert sofort nur mit HT, und ist deshalb sein ideales Fixierungsmittel, es reagiert aber nur langsam mit N, gar nicht mit A; FA kann daher lediglich zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung von N, aber nicht von A mit Erfolg benutzt werden (ERÄNKÖ 1954, 1955).

Obleich somit unter den 4 untersuchten Substanzen A, N, C und HT einzig HT zufolge seiner raschen und histochemisch günstigen Wechselwirkung mit FA zur argentaffinen Reaktion befähigt ist, kommt dieser Reaktion für HT gleichwohl nur eine kennzeichnende, aber nicht spezifische Bedeutung zu, da sie bekanntlich auch bei melanotischen und anderen Pigmenten positiv ausfällt. Es seien hier nur kurz die wichtigsten Zusammenhänge mit den *Melaninen* erwähnt. Ihre chemische Konstitution ist vor allem wegen ihrer Schwerlöslichkeit noch nicht bekannt. Man denkt an Derivate, die durch Polymerisation von Oxydationsprodukten der Di-hydroxyphenylverbindungen entstehen und selbst reversible Oxydations-Reduktions-Systeme besitzen (s. LERNER und FITZPATRICK 1950). Die für die Argentaffinität in Betracht kommenden Faktoren der Leukoform bzw. des schwarzen Pigments sind demnach Di-hydroxyphenyl-Gruppierungen. Auch bei den HT-FA-Verbindungen liegen unlösliche melaninähnliche Pigmentstoffe vor, deren Reduktionsvermögen auf der Anwesenheit phenolischer OH-Gruppen beruht. Der gemeinsame Faktor ist jeweils ein unlösliches, silberausfällendes Derivat. Wie nun am positiven Ausfall der argentaffinen Reaktion an den Zellen der Haut, z. B. nach Fixierung in absolutem Alkohol klar zu erkennen ist (unveröffentlichte eigene Untersuchungen), ist dieses reduzierende Derivat im Melanin bzw. im farblosen Promelanin schon von vorneherein im Gewebe vorhanden; bei HT dagegen muß erst die Formoleinwirkung

vorausgehen, um ein unlösliches reduktionsfähiges Substrat in topographisch richtiger Lokalisation im Gewebe zu schaffen.

Über die chemischen Reaktionen, die bei FA-Einwirkung an den 4 Wirkstoffen ablaufen, liegen derzeit noch keine gesicherten Ergebnisse vor. A, N und HT bieten dem FA an der Aminogruppe, an den in ortho-Stellung zur phenolischen OH-Gruppe liegenden aktiven C-Atomen, HT ferner auch am  $\alpha$ -C-Atom verschiedene Angriffspunkte. Die dabei entstehenden Derivate neigen, wie unsere Versuche zeigen, zur Bildung unlöslicher Polymerisate, was ihre Konstitutionsaufklärung erheblich erschwert. Bei HT werden als Vorstufen dieser Polymerisate Chinone vermutet (LEMBECK und KLEMENTSCHITZ 1955), andererseits haben BARTER und PEARSE (1955) die Ansicht vertreten, daß sich Harmalinderivate bilden; GOMORI (1948, 1950) hat eine Kondensation zu bakelitähnlichen Harzen angenommen. Um diese einander widersprechenden Meinungen endgültig zu klären, sind eingehende spezielle Untersuchungen notwendig.

### Zusammenfassung

1. Vier Substanzen, die in vitro ammoniakalische Silberlösung reduzieren, nämlich Adrenalin, Noradrenalin, Ascorbinsäure und Hydroxytryptamin wurden im Modellversuch den bei der Versilberung nach MASSON-HAMLERL gegebenen Bedingungen unterzogen, wobei zunächst die Wirkung des Formaldehyds eingehend studiert wurde.

2. Die der Versilberung vorangehende Einwirkung von wäßrigem Formaldehyd führt im schwach alkalischen Milieu bei Noradrenalin und Hydroxytryptamin zur Bildung unlöslicher, noch immer stark reduzierender Derivate. Aber nur bei Hydroxytryptamin erfolgt *sofortige* Niederschlagsbildung; bei Noradrenalin tritt sie nur langsam auf, wodurch es im allgemeinen zu einer Ausschwemmung noch vor der Fällung kommt. Adrenalin und Ascorbinsäure geben mit Formaldehyd keine histochemisch verwertbaren Niederschläge und scheiden aus dem Grunde als Substrate für die Massonsche Reaktion aus.

3. Aus dieser verschieden raschen Fällungsgeschwindigkeit von Hydroxytryptamin und Noradrenalin durch Formaldehyd erklärt sich, daß die argentaffine Reaktion im Gewebe *nur* bei Hydroxytryptamin positiv ausfällt und den Wirkstoff in den Zellkörnchen richtig lokalisiert, während Noradrenalin zufolge seiner verzögerten Ausfällung aus den Zellen austritt und so die Voraussetzung für die argentaffine Reaktion noradrenalinhaltiger Zellen in der Regel nicht mehr gegeben ist.

4. Die Argentaffinität hydroxytryptaminhaltiger Zellen geht daher nicht unmittelbar auf dieses, sondern auf sein durch Wechselwirkung mit dem Formaldehyd entstandenes gelbfluoreszierendes wasserunlösliches Reaktionsprodukt zurück.

5. Die Modellversuche geben damit eine Erklärung, warum die argentaffine Reaktion und warum die Chromierbarkeit und Eigenfluoreszenz der gelben bzw. der Carcinoidzellen nur nach vorausgegangener Formolfixierung möglich ist, ferner darüber, warum bei dieser Fixierung die 3 anderen Wirkstoffe trotz ihres starken Reduktionsvermögens histochemisch keine positive Argentaffin-

reaktion geben, sondern nur bei unmittelbarer Einwirkung von Silberlösungen auf das frische Gewebe reduzieren („primäre Silberreaktion“).

6. Die Versuche machen es ferner verständlich, warum an phäochromen Zellen nur eine primäre Chromierung möglich ist und weshalb die Chrombräunung der gelben Zellen nur bei vorauslaufender oder gleichzeitiger Formaldehydeinwirkung gelingt.

### Summary

1. Four substances which reduce ammoniacal silver solution in vitro (adrenaline, noradrenaline, ascorbic acid and hydroxytryptamine) were tested in model experiments by the argentaffine reaction, according to the conditions prescribed by MASSON and HAMPERL. The action of formaldehyde was exhaustively studied.

2. The pretreatment of noradrenaline and hydroxytryptamine by a weakly alkaline formol solution prior to the argentaffine reaction leads to the formation of insoluble yet strongly reducing compounds. However, only with hydroxytryptamine an immediate precipitate is formed. With noradrenaline the precipitate forms only slowly, — consequently it usually is washed away before the precipitation occurs. Adrenaline and ascorbic acid produce no histochemically detectable precipitates in formol and may be excluded therefore as substrates for the MASSON reaction“.

3. From these different rates of precipitation of hydroxytryptamine and noradrenaline by formol, it is easily explained why the argentaffine reaction in tissues is seen *only* with hydroxytryptamine, and why the active substance localizes in the cellular granules. In contrast, as a consequence of its delayed precipitation noradrenaline diffuses out of the cells, and the argentaffine reaction, presumably so characteristic of noradrenaline-rich cells, — generally does not occur.

4. The argentaffinity of cells containing hydroxytryptamine is therefore not directly related to the hydroxytryptamine per se, but to the insoluble yellow fluorescent compound formed from it and the formol.

5. These model experiments explain why the argentaffine reaction, as well as the chromaffine reaction and fluorescence of carcinoid cells occur only after pretreatment in formol. These experiments also clarify why with this fixation the other 3 substances studied give histochemically no positive argentaffine reaction in spite of their strong reducing powers, unless acted directly on by silver solutions in unfixed tissue, under the requisites of the „primary silver reaction“.

6. The experiments explain furthermore why pheochrome cells give only a primary chromaffine reaction, whereas the yellow (enterochromaffine) cells require pre- or simultaneous formol fixation for this reaction.

### Literatur

- BACHMANN, R.: Die Nebenniere. In v. MÖLLENDORFF-BARGMANN'S Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Bd. VI, Teil 5. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1954. — BACQ, Z. M.: Metabolism of adrenaline. *Pharmacol. Rev.* **1**, 1 (1949). — BARTER, R., and PEARSE, A., G. EVERSON: Detection of 5-hydroxytryptamine in mammalian



enterochromaffine cells. *Nature (Lond.)* **172**, 810 (1953). — Mammalian enterochromaffine cells as the source of serotonin (5-hydroxytryptamine). *J. Path. Bact.* **68**, 25 (1955). — BENDITT, E. P., and R. L. WONG: On the concentration of 5-hydroxytryptamine in mammalian enterochromaffine cells and its release by reserpine. *J. exp. Med.* **105**, 509 (1957). — BORBERG, N. C.: Das chromaffine Gewebe. Nebennierenuntersuchungen. II. Skand. Arch. Physiol. **28**, 91 (1913). — BOURNE, G. H.: Vitamin C in the adrenal gland. *Nature (Lond.)* **131**, 874 (1933). — CLARA, M.: Untersuchungen über die basalkörnten Zellen des Schweines (*Sus scrofa dom.*). *Z. mikr.-anat. Forsch.* **30**, 467 (1932). — Über die Diazokupplungsreaktion zum Nachweis der ortho- und para-Phenole in der histologischen Technik. *Z. wiss. Mikr.* **51**, 316 (1934). — Histotopochemische Untersuchungen über das Vitamin C in der Schleimhaut des Magen-Darm-Kanals beim Menschen. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **54**, 358 (1944). — Über die Morphologie und Histochemie der basalkörnten Zellen. *Acta neuroveg. (Wien)* **16**, 294 (1957). — CLARA, M., u. F. CANAL: Histochemische Untersuchungen an den Körnchen in den basalkörnten Zellen des Darmepithels. *Z. Zellforsch.* **15**, 801 (1932). — CORDIER, R.: Recherches morphologiques et expérimentales sur la cellule chromoargentaffine de l'épithélium intestinal des vertébrés. *Arch. Biol. (Liège)* **36**, 427 (1926). — CORDIER, R., et L. LISON: Etude histochemique de la substance chromoargentaffine de la cellule de Kultschitzky. *Bull. Histol. appl.* **7**, 140 (1930). — ERÄNKÖ, O.: Histological sampling, chromatographic separation, and determination of adrenaline and noradrenaline in the adrenal medulla. *Ann. Med. exp. Fenn.* **32**, 392 (1954). — Distribution of fluorescing islets, adrenaline and noradrenaline in the adrenal medulla of the cat. *Acta endocr. (Kbh.)* **18**, 180 (1955). — Distribution of adrenaline and noradrenaline in the adrenal medulla. *Natur (Lond.)* **175**, 88 (1955). — ERÖS, G.: Eine neue Darstellungsmethode der sog. „gelben“ argentaffinen Zellen des Magen-Darm-Traktes. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **54**, 385 (1932). — ERSPAMER, V.: Pharmacology of indolealkylamines. *Pharmacol. Rev.* **6**, 425 (1954). — FEYRTER, F.: Carcinoid and Carcinom. *Ergebn. allg. Path. path. Anat.* **29**, 305 (1934). — Über die peripheren endokrinen (parakrinen) Drüsen des Menschen, 2. Aufl., Wien u. Düsseldorf: Wilhelm Maudrich 1953. — GADDUM, J. H., and H. O. SCHILD: A sensitive physical test for adrenaline. *J. Physiol. (Lond.)* **80**, 9P (1934). — GIROUD, A., et C. P. LEBLOND: Recherches histochemiques sur l'acide ascorbique ou vitamine C. *Bull. Histol. appl.* **11**, 365 (1934). — GOMORI, G.: Chemical character of the enterochromaffin cells. *Arch. Path. (Chicago)* **45**, 48 (1948). — HAMPERL, H.: Über die „gelben (chromaffinen)“ Zellen im Epithel des Verdauungstraktes. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **2**, 506 (1925). — Was sind argentaffine Zellen? *Virchows Arch. path. Anat.* **286**, 811 (1932). — Über argyrophile Zellen. *Virchows Arch. path. Anat.* **321**, 482 (1952). — HEINRICH, P., u. W. SCHULER: Stabilisierte Diazoniumsalze als Reagentien zur Bestimmung von Dioxibenzolderivaten. *Helv. chim. Acta* **31**, 320 (1948). — JEPSON, J. B., and B. J. STEVENS: A fluorescence test for serotonin and other tryptamines. *Nature (Lond.)* **172**, 772 (1953). — KUTSCHERA-AICHEBERGEN, H.: Nebennierenstudien. Frankfurt. *Z. Path.* **28**, 262 (1922). — LEMBECK, F.: 5-Hydroxytryptamine in a carcinoid tumor. *Nature (Lond.)* **172**, 910 (1953). — LEMBECK, F., u. W. KLEMENTSCHITZ: Papierchromatographische Untersuchungen über die Reaktionsprodukte des Oxytryptamins mit Formaldehyd. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak.* **225**, 129 (1955). — LERNER, A. B., and T. B. FITZPATRICK: Biochemistry of melanin formation. *Physiol. Rev.* **30**, 91 (1950). — MASSON, P.: La glande endocrine de l'intestin chez l'homme. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **158**, 59 (1914). — OGATA, T., u. A. OGATA: Über die Henlesche Chromreaktion der sog. chromaffinen Zellen und den mikrochem. Nachweis des Adrenalins. *Beitr. path. Anat.* **71**, 376 (1923). — PATZELT, V.: Der Darm. In v. MÖLLENDORFFS Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Bd. 5, Teil 3, S. 1. Berlin: Springer 1936. — RATZENHOFER, M.: Zur Histochemie der Carcinoid. *Acta histochem. (Jena)* **1**, 53 (1954). — RATZENHOFER, M., u. F. LEMBECK: Über den Gehalt an 5-Oxytryptamin in Carcinoiden des Darmtraktes. *Z. Krebsforsch.* **60**, 169 (1954). — ROMEIS, B.: Taschenbuch der mikroskopischen Technik, 14. Aufl. München u. Berlin: R. Oldenbourg 1943. — SCHACK, L.: Über die Gelben Zellen im menschlichen Wurmfortsatz. *Beitr. path. Anat.* **90**, 441 (1932). — SCHMIDT, J. E.: Beiträge zur normalen und pathologischen Histologie einiger Zellarten der Schleimhaut des menschlichen Darmkanals. *Arch. mikr. Anat.* **66**, 12 (1905). — SCHULZ, F.: Zur Histochemie des Nebennierenmarkes. *Beitr. path. Anat.* **101**, 32 (1938). — SHEPHERD, D. M., G. B. WEST and V. ERSPAMER: Detection of 5-hydroxytryptamine by paperchromatography. *Nature (Lond.)* **172**, 357 (1953). — TEHVER,

J.: Über die enterochromaffinen Zellen der Haussäugetiere. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **21**, 462 (1930). — TONUTTI, E.: Über die Bindung des Vitamin C an eine Trägersubstanz in der Zelle. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **42**, 221 (1937). — Die Vitamin C-Darstellung im Gewebe und ihre Bedeutung zur funktionellen Analyse von Histosystemen. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **48**, 1 (1940). — VETTER, J.: Untersuchungen über die Zahl der basalgranulierten Zellen beim Meerschweinchen mit verschiedener Vitamin C-Anreicherung. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **45**, 255 (1939). — VIALLI, M., e V. ERSPAMER: Cellule enterochromaffini e cellule basigranulose acidofile nei vertebrati. *Z. Zellforsch.* **19**, 743 (1933). — Sulle reazioni chimiche colorate dell'enteramina. I. Ricerche su estratti acetonicici di mucosa gastro-intestinale. II. Presenza di sostanze enteraminosimili al di fuori della mucosa gastro-intestinale. *Arch. Sci. biol. (Bologna)* **28**, 101, 122 (1942). — WIMMER, K.: Die Stellung des Reticuloendothels im Vitaminstoffwechsel nach lumineszenzmikroskop. Beobachtungen am lebenden Tier. *Erg.-Bd. zum 88. Bd. des Anat. Anz.* **42** (1939).

Prof. Dr. M. RATZENHOFER,  
Pathologisches Institut der Universität Graz (Österreich)

Doz. Dr. F. LEMBECK  
Pharmakologisches Institut der Universität Graz (Österreich)