

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

Histochemischer Nachweis von Succinodehydrogenase in Biopsien von menschlichem Hirngewebe

Von

REINHARD L. FRIEDE *

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 31. Januar 1959)

Die histochemische Verteilung von Succinodehydrogenase-Aktivität (SDA) im Hirngewebe wurde bereits von mehreren Autoren an Hand der Tetrazoliumreaktion beschrieben; eine umfassende Darstellung der Verteilung von SDA im Hirn von Nagetieren erfolgte durch SHIMIZU und MORIKAWA (1957). Die Ergebnisse der Tetrazoliumreaktion im Hirngewebe lassen sich wesentlich verbessern, wenn die Schnitte bei einer Gewebstemperatur von -3 bis -1°C angefertigt werden (FRIEDE 1958). Diese besondere Schneidetechnik verhindert das Auftreten von Artefakten (grobe Kristallisation von Fromazan, diffusible und abgeschwächte Reaktion) die bisher vielfach als normale Reaktion aufgefaßt wurden; eine ausgezeichnete Darstellung feinerer Details, z. B. der Dendriten oder der Struktur des Neuropils, wird so erreicht. Ein Atlas der Verteilung von SDA im Gehirn des Meerschweinchens, dargestellt mit obiger verbesserter Technik, weist eine weitgehende Differenzierung des Musters der Enzymverteilung in den verschiedenen Kernen nach (FRIEDE 1959).

Histochemische Befunde über die Verteilung von SDA im menschlichen Hirn sind selten (MUSTAKALLIO 1954, BAAR 1957), da es schwierig ist, genügend frisches Material zu erhalten. Im ungekühlten Gewebe nimmt SDA sehr rasch nach dem Tode ab (KENT 1957). Im folgenden sind Befunde der SDA-Verteilung in einem Material von 33 menschlichen Biopsien zusammengestellt.

Material und Methodik

14 der 33 Biopsien waren vom Großhirncortex, 4 vom Kleinhirncortex und 15 von Hirntumoren. Von den 14 Großhirnbiopsien standen von 4 Fällen zwei Gewebsproben von verschiedenen Gegenden des Operationsfeldes zur Verfügung und von einem Fall drei Gewebsproben. Sechs von den Excisionen schlossen neben Cortex und Mark auch Tumorgewebe ein. Fast alle Biopsien waren Rindenexcisionen aus der Nachbarschaft von Hirntumoren (mit Ausnahme einer temporalen Epilepsie). Das Material wurde an der Neurochirurgischen Universitätsklinik Freiburg gesammelt und konnte unmittelbar von der Operation zur Verarbeitung gebracht werden. Die oben erwähnte, verbesserte Technik für SDA wurde ausschließlich angewandt. Die Details der Schneidetechnik und die erforderliche Konstruktion des Gewebshalters am Mikrotom wurden kürzlich ausführlich beschrieben (FRIEDE 1958). Schnitte von unfixiertem Gewebe, 60 Miera dick, wurden unmittelbar in folgendes Inkubationsmedium übertragen: gleiche Teile von 0,25% Lösung von Tetrazolpurpur, Bayer (4,4-bis (3,5-diphenyl-2-tetrazoliumbiphenyl)chlorid), 1% Lösung von Natriumsuccinat und 0,1 M Phosphat-Puffer, pH 7,8. Nach zweistündiger Inkubation bei 38°C wurden die Schnitte durch Eingießen in Formalin fixiert und mit Glycerin-Gelatine eingeschlossen. Die mit Tetrazolpurpur erhaltenen Ergebnisse wurden mit denen des neueren Nitro BT (NACHLAS

* Aero Medical Laboratories, Wright Air Development Center, Dayton, Ohio.

u. Mitarb. 1957) verglichen; die Reaktion mit Nitro BT fällt stärker aus, was besonders in Gegenden geringer Enzymaktivität wertvoll ist; die Verteilung beider Reaktionen ist jedoch identisch, so daß die beschriebenen Ergebnisse unvermindert gültig bleiben. Ein großes Vergleichsmaterial von Meerschweinchen, Ratten und Katzen stand zur Verfügung.

Der am Mikrotom verbliebene Rest des Gewebes wurde in Paraffin eingebettet. Sorgfältig orientierte und mit Einarson's Chromalaun-Gallocyanin gefärbte Schnitte stellten das cytologische Bild im unmittelbar angrenzenden Gewebe dar. Außerdem wurden andere, benachbarte Gewebeproben für Gefrier- und Paraffinschnitte verarbeitet (Chromalaun-Gallocyanin, Sudan III, Sudanschwarz). Eine simultane Darstellung von SDA und Fett ließ sich durch vorsichtiges Gegenfärben der SDA-Schnitte mit Sudanschwarz erzielen. Da die Schnitte dick sind, ist es notwendig die Färbungsintensität sorgfältig zu kontrollieren um ein Überdecken der Färbungen zu vermeiden.

Ergebnisse

A. Großhirncortex. Die Befunde sind im folgenden summarisch zusammengestellt, wobei angezeigt wird, wie oft sich der betreffende Befund im Gesamtmaterial erheben ließ.

Normale Verteilung von Succinodehydrogenase (8 Fälle). Es ist gerechtfertigt, einen Befund als normale Verteilung von SDA zu bezeichnen, wenn Gewebe benutzt wurde, das operativen Manipulationen nur wenig ausgesetzt war, wenn dieses Gewebe meist binnen weniger als 15 min geschnitten und incubiert war und wenn in solchen Schnitten die Verteilung von SDA dieselbe war wie im Tiermaterial unter optimalen Bedingungen.

Im normalen menschlichen Großhirncortex fand sich folgende Verteilung von SDA: Die erste Brodmannsche Schicht zeigte vielfach schwache SDA, diffus verteilt im Neuropil. Die zweite bis vierte Schicht waren nicht zu unterscheiden, sondern bildeten ein breites Lager von starker, diffus verteilter SDA im Neuropil. Keine Nervenzellen waren im Neuropil erkennbar, da die SDA der Zellkörper die des Neuropils nicht übertraf. Die fünfte und sechste Schicht waren scharf abgesetzt durch schwächere SDA im Neuropil. Die Nervenzellen dieser Schichten, besonders der fünften, traten durch starke SDA deutlich hervor. Das Marklager zeigte keine Reaktion.

Studien der Verteilung von SDA im Großhirncortex des Meerschweinchens zeigten eine deutliche areale Gliederung des Cortex; die Zusammenstellung dieser Ergebnisse befindet sich in Arbeit. Das verfügbare menschliche Material war zu fragmentarisch, um areale Unterschiede zu beschreiben. Unterschiede in der Verteilung von SDA wurden jedoch in Biopsien von verschiedenen cytoarchitektonischen Arealen gefunden und schienen dem Verhalten der homologen Regionen am Meerschweinchenhirn zu entsprechen.

Verminderte Succinodehydrogenaseaktivität. Die Feststellung einer Verminderung von SDA in einer Biopsie erfordert größte Skepsis. Es dürfte jedoch gerechtfertigt sein, eine Verminderung von SDA festzustellen, wenn: a) benachbarte Rindenpartien im gleichen Schnitt normale Verteilung von SDA zeigten und die Abnahme der SDA in deutlicher Beziehung zu der Entfernung des im Schnitt enthaltenen Tumorgewebes stand; b) wenn die Abnahme durch einen großen Schnitt gleichmäßig festzustellen war, sich keinerlei Beziehungen zu den Schnittkanten oder zu Manipulationen ausgesetzten Partien fand, keinerlei Hinweise auf Artefakte zu finden waren, und wenn völlig gleich behandelte, aber

entfernt entnommene Biopsien vom gleichen Hirn normale SDA zeigten; c) wenn sich gleichzeitig mit verminderter SDA auch vermehrte SDA in Gegenden fand, wo normalerweise keine SDA zu finden ist, wie im Marklager.

In 9 Fällen war eine auffallende Abnahme der SDA im Cortex festzustellen. Verminderte SDA wurde besonders in Cortexpartien gefunden, die dem Tumor nahe lagen, während entferntere Partien normale SDA aufwiesen. Die Abnahme war diffus oder fleckig und betraf Nervenzellen und Neuropil in gleicher Weise,

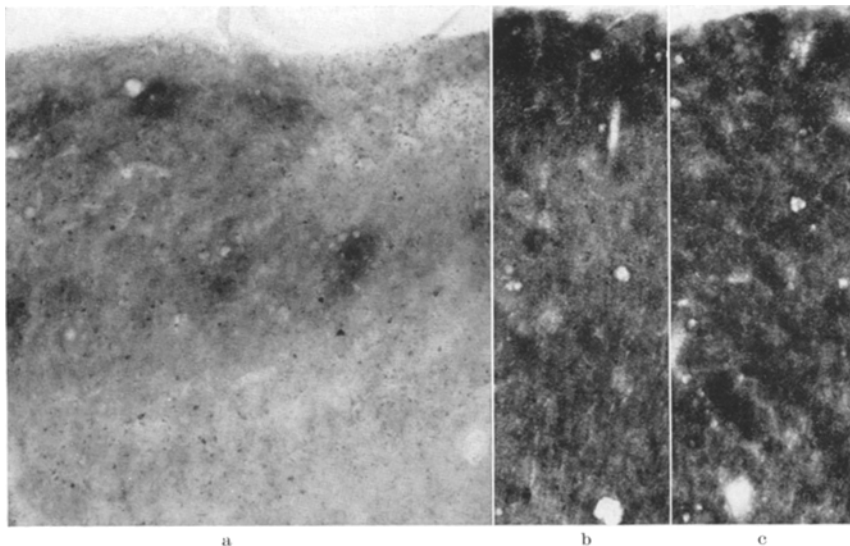


Abb. 1a—c. Fleckige Verminderung der Succinodehydrogenaseaktivität im Großhirncortex in Abhängigkeit von der Entfernung eines Glioblastoms. (Der Schnitt zeigt die oberen vier Schichten; die fünfte Schicht ist gänzlich sichtbar in a und nur am unteren Rand sichtbar in b und c). a Cortexpartie etwa 5 mm entfernt von der Infiltrationszone des Tumors in den Cortex. Inseln stärkerer Enzymaktivität sind zurückgeblieben, dazwischen negative Zonen und verstreute Nervenzellen mit starker Reaktion; fast völliger Enzymverlust in der unteren Bildhälfte. b Derselbe Schnitt, etwa 15 mm entfernt vom Tumor; fleckige Aufleuchtung im Neuropil. c Derselbe Schnitt etwa 20 mm entfernt vom Tumor (gemessen an der Cortexoberfläche); starke Aktivität, aber noch etwas ungleichmäßig verteilt. 42 ×

so daß die Region abgeblaßt aussah. In 6 Fällen fanden sich jedoch außerdem verstreut Nervenzellen mit starker SDA, die gegen die abgeschwächte SDA des umgebenden Neuropils einen deutlichen Kontrast bildeten. Solche Zellen dürften mit hyperchromatischen Zellen identisch sein, da sich solche in benachbarten Paraffinschnitten in gleicher Verteilung und Häufigkeit fanden. In einer der Biopsien war nirgends SDA in Nervenzellen zu finden; benachbarte Schnitte zeigten einen weitgehenden Chromatinverlust des gesamten Zellbestandes. Abgesehen von solchen Befunden waren die Veränderungen im Zellbild geringfügig; Verschiebungen im SDA-Gehalt scheinen daher ein relativ empfindlicher Indicator von Gewebsschädigung zu sein.

Beziehungen zwischen Succinodehydrogenase und Fettablagerung. In 7 Fällen waren Fetttröpfchen im Neuropil und fettige Degeneration von Nervenzellen in den dem Tumor angrenzenden Cortexpartien festzustellen. Die SDA in diesen Gewebspartien verhielt sich invers zur Verteilung und Intensität der Fettablagerung. Gegenden mit dichter Fettdeposition zeigten beinahe völligen

Schwund von SDA. Mit der Verminderung der Fetttropfchen wurde auch die SDA-Reaktion stärker. Pyramidenzellen mit starker SDA ließen nie Fett erkennen, während fettig degenerierte Pyramidenzellen keine SDA erkennen ließen; Übergänge zwischen diesen Extremen wurden beobachtet. Fettablagerung war demnach regelmäßig mit verminderter SDA verbunden, aber verminderte SDA, auf der anderen Seite, zeigte nicht notwendigerweise Fettdeposition an.

Die Fetttropfchen in diesen Schnitten waren nicht oder nur sehr schwach durch diffundiertes Formazan gefärbt, da dessen Fettlöslichkeit schlecht ist.

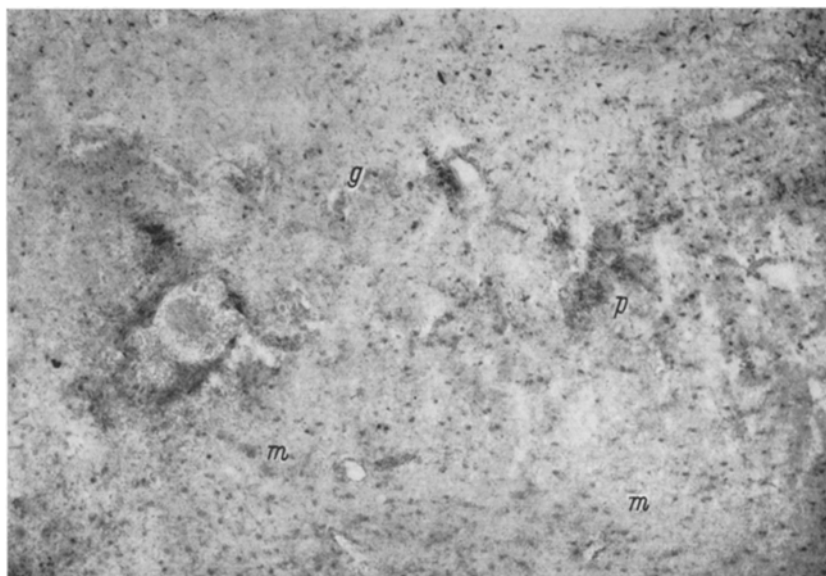


Abb. 2. Randzone eines Glioblastoms im Marklager. Enzymaktivität in verstreuten Zellen im Tumorgewebe *g* und in Gefäßproliferationen *p*. Bei *m* die Übergangszone des Tumors ins hochgradig ödematöse Marklager. Die am unteren Bildrand dargestellten Zellen mit mäßiger Aktivität erstrecken sich weit ins ödematöse Marklager und waren mit gemästeter Glia zu identifizieren. Die etwas stärker reagierenden Zellen im Tumorgewebe waren nicht eindeutig identifizierbar. 42 ×

Die beschriebene inverse Verteilung ist daher nicht durch Fettlöslichkeit des Reaktionsproduktes vorgetäuscht. Dasselbe ließ ich auch bei Untersuchungen über die Enzymverteilung in fettig degenerierten Lebern (Tetrachlorkohlenstoff) feststellen, wo eine inverse Verteilung von Fett und SDA innerhalb des Leberläppchens beobachtet wurde.

Succinodehydrogenaseaktivität in gemästeter Glia des Marklagers. Das normale Marklager läßt keine SDA erkennen. In 5 der Biopsien fand sich jedoch in dem den Tumor angrenzenden, aber noch nicht vom Tumor infiltrierten Marklager SDA in größeren, rundlichen Zellen, die durch ihre Verteilung dem Marklager ein getigertes Aussehen verliehen. Diese Zellen waren offenbar identisch mit gemästeten Gliazellen in hochgradig ödematösen Partien, da sich solche ausschließlich bei diesen 5 Biopsien und in gleicher Verteilung und Häufigkeit in den benachbarten Paraffinschnitten fanden (Abb. 2).

Succinodehydrogenaseaktivität in der unmittelbaren Tumorrandzone. In der Randzone infiltrierender Glioblastome fanden sich reichlich multiforme, rund-

liche bis langgestreckte Zellen mit starker SDA. Infolge der Schnittdicke und der Zelldichte dieser Partien ließ sich nicht mit Sicherheit ermitteln ob solche Zellen mit starker SDA Tumorelemente oder Reste normalen Gewebes waren. Gefäßproliferationen in der Tumorrandszone waren durch vermehrte SDA beinahe elektiv dargestellt. Normale Gefäße des Marklagers weisen keine oder fast keine SDA auf.

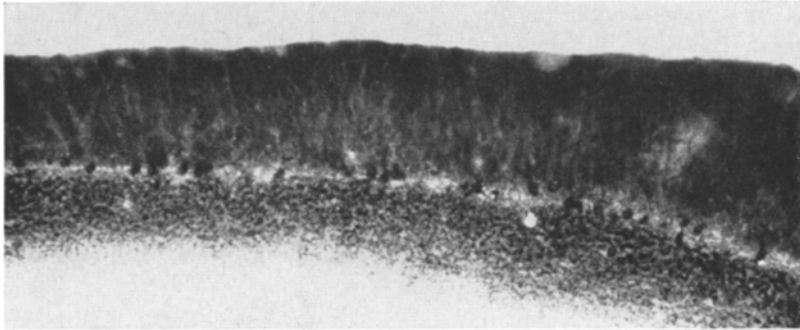


Abb. 3

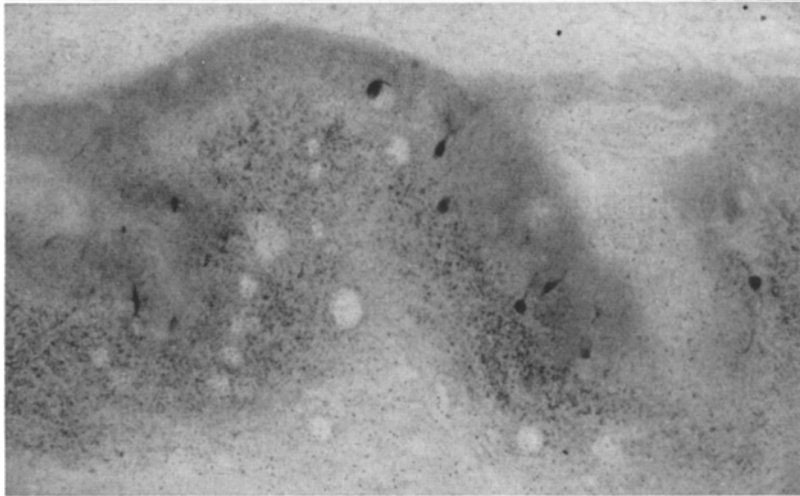


Abb. 4

Abb. 3. Annähernd normale Verteilung von Succinodehydrogenase im menschlichen Kleinhirncortex. 42 ×

Abb. 4. Stark verminderte Reaktion in einer sklerotischen Kleinhirntonsille; in einzelnen Purkinje-Zellen ist noch starke Enzymaktivität nachzuweisen. 42 ×

B. Kleinhirncortex. Unter 4 verfügbaren Kleinhirnbipsien wies nur eine starke SDA auf; diese Präparate waren kaum von solchen vom Meerschweinchen oder der Katze zu unterscheiden. Die Molekularschicht zeigte SDA diffus im Neuropil. Die SDA der Körnerschicht war deutlich stärker als die der Molekularschicht und war unregelmäßig, granuliert angeordnet. Sehr starke SDA fand sich in den Purkinje-Zellen während das Gewebe zwischen denselben fast negativ reagierte. Das Marklager war negativ. Zwei der Biopsien zeigten eine diffuse Verminderung von SDA in allen Schichten. Die vierte Biopsie, die von einer durch Einklemmung sklerotischen Kleinhirntonsille stammte (Hydrocephalus), zeigte völligen Schwund von SDA in der Molekularschicht und starke

Reduktion in den Zellschichten; einige Purkinje-Zellen mit normaler SDA und eine leichte Granulierung der Körnerschicht waren noch zu erkennen (Abb. 4).

C. Tumoren. Biopsien von 13 Tumoren wurden untersucht, darunter 4 Gliome, 6 Meningeome, 1 Medulloblastom, 1 Plexuspapillom und 1 Osteoklastom. Alle Tumorbiopsien zeigten sehr schwache oder keine SDA. Häufig fanden sich jedoch Zellinseln oder verstreute Zellen mit mäßiger SDA, besonders in den Meningeomen. Eine grobe Beziehung zwischen Malignität und SDA schien erkennbar, insofern als 3 Glioblastome und das Medulloblastom am wenigsten SDA zeigten. Der Gelegenheitsbefund eines Osteoklastoms scheint erwähnenswert, da alle Osteoklasten elektiv durch SDA dargestellt waren.

Diskussion

Succinodehydrogenase findet sich gemeinsam mit Cytochromoxydase in den Mitochondrien. Die Verteilung beider Enzyme im Hirngewebe ist beinahe identisch (SHIMIZU, MORIKAWA und ISHI 1957). Beziehungen zwischen der Vascularisation und der Verteilung von Cytochromoxydase im Hirngewebe wurden beschrieben (CAMPBELL 1939). Pathologische Verminderung von SDA in einer Region dürfte beweisend sein für eine Störung des oxydativen Citronensäurecyclus (Krebs-Cyclus) und damit der Gewebsoxydation im weiteren Sinne.

Pathologische Verminderung von SDA fand sich in Cortexpartien in der Nachbarschaft von Hirntumoren. Diese Beobachtung ist in guter Übereinstimmung mit der Beobachtung einer pathologischen Glykogenanreicherung in solchen Regionen, gefunden in einem ähnlichen Excisionsmaterial (FRIEDE 1956). Verminderte Gewebsoxydation, Anreicherung von Glykogen, und eventuell verlangsamte EEG-Frequenzen könnten in einem ursächlichen Zusammenhang stehen.

Von besonderem Interesse ist die gegensätzliche Beziehung zwischen SDA und fettiger Degeneration. Eine ähnliche Gegensätzlichkeit zwischen fettiger Degeneration von Nervenzellen und deren Gehalt an Cytochromoxydase wurde von ROIZIN (1955) beobachtet. Histochemische Untersuchungen an fettig veränderten Nieren (AHLQUIST und TELKKA 1957) und Lebern (BAAR 1957, eigene Befunde) zeigten ebenfalls eine inverse Verteilung von Fett und SDA. Es ist möglich, daß die Blockierung des Krebs-Cyclus durch eine resultierende Stoffwechselablenkung auf der Stufe des Acetyl-Coenzym A zur Fettsynthese führt. Beobachtungen im Nervengewebe dürften besonders aufschlußreich sein, da Fett örtlich im Hirngewebe aufgebaut zu werden scheint (WAEELSCH, SPERRY und STOYANOFF 1940).

Während fettige Degeneration mit verminderter SDA einherging, war verminderte SDA nicht unbedingt mit Fettdeposition verbunden. Die Chromatolyse in motorischen Zellen nach Axonunterbrechung z. B. ist mit Verlust von SDA verbunden, wie sich in laufenden Untersuchungen zeigte. Chromatolyse hat jedoch keine Beziehungen zu fettiger Degeneration.

Überraschend war der Befund von SDA in gemästeten Gliazellen des Marklagers. Die vermehrte Enzymaktivität in solchen Zellen läßt es fraglich erscheinen, gemästete Gliazellen als degenerativ verändert aufzufassen. Normalerweise weist Glia keine SDA auf; lediglich während der Myelogenese wurde SDA

(FRIEDE 1957) und Cytochromoxydase (MARINESCU 1924) in der Glia gefunden. Der niedrige SDA-Gehalt von Tumorgewebe steht im Einklang mit der allgemeinen Biochemie von Tumorgewebe.

Die histochemische Reaktion für SDA scheint eine wertvolle Technik zu sein zur Feststellung leichter Gewebsveränderungen, besonders im Neuropil, das konventionellen Techniken schlecht zugänglich ist. Anwendung von mehr histochemischen Enzymtechniken dürfte weitgehendere Schlußfolgerungen ermöglichen hinsichtlich der biochemischen Grundlagen morphologischer Veränderungen.

Zusammenfassung

Succinodehydrogenaseaktivität wurde histochemisch in einem Material von 33 Biopsien vom menschlichen Großhirn, Kleinhirn und von Hirntumoren nachgewiesen.

Eine pathologische Verminderung der Enzymaktivität wurde in Cortexpartien in der Nachbarschaft von Hirntumoren gefunden. Zwischen fettiger Degeneration von Nervenzellen und ihrer Enzymaktivität scheint eine inverse Beziehung zu bestehen; Fettanreicherung war stets mit vermindertem Enzymgehalt verbunden. Die Reaktion hyperchromatischer Zellen schien stärker als normal. Verstärkter Enzymgehalt wurde auch in gemästeter Glia des Marklagers gefunden. Sehr schwache Aktivität bestand in Tumorgewebe, jedoch nicht gleich schwach in allen Teilen desselben. Gefäßproliferationen in Glioblastomen waren durch verstärkte Enzymreaktion gekennzeichnet.

Summary

Succinic dehydrogenase was demonstrated histochemically in 33 biopsies of human cerebrum, cerebellum, and from brain tumors.

Enzyme activity was diminished in the cerebral cortex adjacent to brain tumors. An inverse relationship was found between fatty degeneration of neurons and their enzyme content: an increase in fat was consistently accompanied by loss of enzyme. Increased activity was found in hyperchromatic nerve cells and in swollen astrocytes of the edematous white matter. Except for occasional areas with stronger activity, the enzyme activity was found extremely weak in brain tumors. Vascular proliferations in brain tumors exhibited increased enzyme activity.

Literatur

AHLQUIST, J., and A. TELKKA: Succinic dehydrogenase activity in the kidneys of weanling rats injured by feeding of a choline deficient diet. *Acta path. microbiol.* **41**, 235—241 (1957). — BAAR, H. S.: Succinic dehydrogenase activity of normal and pathological tissues. *Schweiz. Z. Path.* **20**, 164—119 (1957). — CAMPBELL, A. C. P.: Variation in vascularity and oxidase content in different regions of the brain of the cat. *Arch. Neurol. Psychiat. (Chicago)* **41**, 223—242 (1939). — FRIEDE, R.: Über Beziehungen zwischen histochemischen Glykogenbefunden und der Hirnwellenfrequenz im EEG an einem Material von menschlichen Biopsien. *Arch. Psychiat. Nervenkr.* **194**, 213—237 (1956). — Die histochemische Reifung des Kleinhirnes der Ratte dargestellt durch das Verhalten der Succinodehydrase. *Arch. Psychiat. Nervenkr.* **196**, 196—204 (1957). — Improved technique for the histochemical demonstration of succinic dehydrogenase in brain tissue. *J. Histochem. Cytochem.* **6**, 347—351 (1958). —

Histochemical investigations on succinic dehydrogenase in the central nervous system. II. Atlas of the medulla oblongata of the guinea pig. *J. Neurochem.* (im Druck). — KENT, S. P.: The effect of post mortem autolysis on certain histochemical reactions. School of Aviation Medicine, Randolph AFB. Tech. Rep. 57-71 (1957). — MARINESCO, G.: Le rôle des ferments oxydants dans les phénomènes de la vie. Libro en Honor de D. Santiago Ramon y Cajal, Madrid 1922. — MUSTAKALLIO, K. K.: Histochemical demonstration of succinic dehydrogenase activity in human brain. *Ann. Med. exp. Fenn.* **32**, 175—177 (1954). — NACHLAS, M. N., K. C. TSOU, E. SOUZA, C. S. CHENG and A. M. SELIGMAN: Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase. *J. Histochem. Cytochem.* **5**, 420—436 (1957). — ROIZIN, L.: Oxidases and peroxidases of the central nervous system. *J. Neuropath. exp. Neurol.* **14**, 47—69 (1955). — SHIMIZU, N., and N. MORIKAWA: Histochemical studies of succinic dehydrogenase of the brain of mice, rats, guinea pigs, and rabbits. *J. Histochem. Cytochem.* **5**, 334—345 (1957). — SHIMIZU, N., N. MORIKAWA and Y. ISHI: Histochemical studies of succinic dehydrogenase and cytochrome oxidase of the rabbit brain, with special reference to the results in the paraventricular structures. *J. comp. Neurol.* **108**, 1—14 (1957). — WEALSCH, H., W. M. SPERRY and V. A. STOYANOFF: A study of the synthesis and deposition of lipids in brain and other tissues with deuterium as indicator. *J. biol. Chem.* **135**, 291—296 (1940).

Dr. REINHARD L. FRIEDE, 5764 Access Road, Dayton 31, Ohio, USA