

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Heidelberg  
(Direktor: Prof. Dr. E. RANDEARTH)

## Histochemische und polarisationsoptische Untersuchungen am Amyloid\*,\*\*

Von

PAUL BERND DIEZEL und ALBRECHT PFLEIDERER jr.

Mit 3 Textabbildungen, davon 2 farbigen  
in 7 Einzeldarstellungen

(Eingegangen am 20. Juni 1959)

Seit der Beschreibung amyloider Abscheidungen im Gewebe durch VIRCHOW (1854 a, b, c, d) war die stoffliche Bestimmung dieser Strukturen mehrfach Gegenstand chemischer und histochemischer Untersuchung.

DIVRY und FLORKIN (1927) beobachteten als erste, daß die durch Kongorot rot angefärbten amyloiden Strukturen bei Betrachtung im polarisierten Licht, unter Verstärkung der Doppeltbrechung, grün aufleuchten. Dieser Farbwechsel wurde seitdem von mehreren Untersuchern bestätigt (ROMHÁNYI 1943, 1949, 1956, LADEWIG 1945, MISSMAHL und HARTWIG 1953, 1954, MISSMAHL 1955, 1957, PFEIFFER 1953, JOHANSSON und PFEIFFER 1954) und von MISSMAHL (1957) als für das Amyloid spezifisch bezeichnet.

Der Verstärkung der Formdoppeltbrechung des Amyloids durch die Färbung mit Kongorot soll die Bildung eines Amyloid-Kongorotkomplexes nach Art eines sog. Wienerischen Mischkörpers zugrunde liegen (LADEWIG 1945, JOHANSSON und PFEIFFER 1954). Auch ohne Färbung zeigen amyloide Strukturen im polarisierten Licht eine Formdoppeltbrechung, die durch Behandlung mit Säuren verstärkt wird (HASS und SCHULZ 1940). Der Anisotropie amyloider Strukturen liegt nach MISSMAHL und HARTWIG (1953) die Anwesenheit maskierter, reticulärer Fasern zugrunde. Dagegen führte ROMHÁNYI (1956) die Doppeltbrechung auf eine dem Amyloid eigene micellare Struktur zurück. KRÜCKE (1959) untersuchte kürzlich die Doppeltbrechung des Amyloids erneut; er konnte jedoch nicht entscheiden, ob eine Faser- oder Amyloiddoppeltbrechung vorliegt. Zur Färbung des Amyloids wurden außer Kongorot auch andere Azofarbstoffe verwandt. DIVRY (1927 und 1952) konnte mit Bismarckbraun ebenfalls eine Grünfärbung im polarisierten Licht erzielen. Trypanrot und Trypanblau wurden von LADEWIG (1945) benutzt. DIEZEL (1957, 1958 a und b, 1959) berichtete über ein mit Kongorot vergleichbares, färberisches Verhalten der Farbstoffe Evans-Blau, Amidoschwarz 10B, Direkttiefschwarz, Chlorantinlichtrot, Baumwollbraun, Chlorantinlichtgrün, Trypanblau und Methylorange an amyloiden Strukturen bei allgemeiner Amyloidose und seniler Demenz (senile Drusen im Gehirn). Die Farbwertveränderungen am Amyloid im polarisierten Licht nach Färbung mit Evans-Blau und Amidoschwarz 10B konnte KRÜCKE (1959) bestätigen, und auch SEITELBERGER (1958) erhielt mit Amidoschwarz 10B an den amyloiden Strukturen bei seniler Demenz die gleichen Färbeergebnisse. Die Farbtonänderung der genannten Azofarbstoffe, die nur im polarisierten Licht auftritt, wird auf eine gerichtete An- oder Einlagerung des Farbstoffes in formdoppeltbrechende Strukturen zurückgeführt.

Nachdem uns bei einer Prüfung der Farbwertveränderungen von Azofarbstoffen das dichroitische Verhalten des Amyloids bei mehreren Farbstoffen aufgefallen war, lag es nahe, das Verhalten des Amyloids gegen eine große Zahl von

\* Herrn Professor Dr. E. RANDEARTH zum 60. Geburtstag gewidmet.

\*\* Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt. Für Mitarbeit danken wir der technischen Assistentin Frl. H. TIMMER-MANN.

Farbstoffen systematisch zu prüfen und dabei auf Farbänderungen im polarisierten Licht zu achten. Gleichzeitig sollen die Befunde einer gründlichen baustein histochemischen Untersuchung am Amyloid mitgeteilt werden. Die Methodik unserer histochemischen Untersuchung kann bei PEARSE (1954) und DIEZEL (1957) nachgelesen werden.

### Eigene Untersuchungen

a) **Baustein histochemische Untersuchung des Amyloids** (Tabelle 1). Die histochemischen Reaktionen zum Nachweis der *Eiweißkörper* fallen am Amyloid positiv aus (Tabelle 1). Die starke Rotfärbung bei der gekoppelten Tetrazoniumreaktion weist auf einen hohen Gehalt aromatischer Aminosäuren. Da die Reaktion nach 24stündiger Benzoylierung deutlich abgeschwächt verläuft, ist nach DANIELLI ein relativer Histidinmangel anzunehmen. Der positive Ausfall der Ninhydrin-Schiff-Reaktion zeigt den Gehalt eiweißgebundener  $\text{NH}_2$ -Gruppen, der der Millon-schen Reaktion die Anwesenheit von Tyrosin. Die Anwendung der Säurehydrolyse und die von Trypsin und Papain führt zu keiner Änderung der Tetrazoniumreaktion. Wenn somit kein Zweifel bestehen kann, daß im Amyloid Eiweißkörper vorhanden sind, so ist doch eine nähere Differenzierung (innerhalb) der Proteine und Proteide mit histochemischer Methodik bis heute nicht möglich.

Der positive Ausfall der PAS-Reaktion kann nach dem Ergebnis des Acetylierungs- und Bromierungstestes auf die Anwesenheit von *Kohlenhydraten* zurückgeführt werden. Die PAS-Positivität läßt sich weder mit Hyaluronidase noch mit Diastase beseitigen, ist jedoch nach Einwirkung von Papain abgeschwächt.

Die Bialsche Probe zum Nachweis der Neuraminsäure am Schnittpräparat fällt an amyloiden Strukturen positiv aus. Dieser Befund steht im Einklang mit den Angaben von KLENK und FAILLARD (1955). Läßt man Papain auf den Schnitt einwirken, wird die Bialsche Probe negativ, während Trypsin, Hyaluronidase und Diastase auf den positiven Ausfall keinen Einfluß haben. Der positive Ausfall der PAS-Reaktion beruht wenigstens zum Teil auf der Anwesenheit von Neuraminsäure. Dafür spricht die Abschwächung der PAS-Reaktion nach Papainandauung.

Es darf jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß möglicherweise im Amyloid noch Glykoproteide enthalten sind. Diese Glykoproteide konnten nicht näher charakterisiert werden. Eine angedeutete Metachromasie bei Toluidinblau-, Methylenblau- sowie Thioninfärbung und eine schwache Anfärbung mit Alcianblau und der Reaktion nach HALE lassen an ein schwach saures Glykoproteid denken. Eine Sulfatierung mit Verstärkung der Toluidinblau metachromasie gelang jedoch nicht; die Metachromasie konnte sogar vollständig verhindert werden.

Die Reaktionen zum Nachweis von *Lipoiden* fallen negativ oder schwach positiv aus. Ein nennenswerter Gehalt an Lipoiden besteht wohl nicht. Wie unsere Extraktionsversuche ergeben haben, sind weder die PAS-Reaktion noch die Kongorotfärbung auch nach langdauernder Einwirkung von Fettlösungsmitteln (Frischschnitte!) beeinflussbar. Triglyceride sind sicher nicht vorhanden. Die Anwesenheit von Lipoproteiden, wie sie kürzlich von RUKAVINA, BLOCK und CURTIS (1956) bei zahlreichen Gliedern einer Familie mit allgemeiner (primärer) Amyloidose beschrieben wurde, kann dagegen nicht ausgeschlossen werden (schwach positive Anfärbung mit Nilblau).

b) **Untersuchung der Formdoppeltbrechung des Amyloids.** Mit dem elliptischen Kompensator (Leitz) wurde mit Hilfe des Meßverfahrens nach BRACE die Größe der Doppeltbrechung amyloider Strukturen am ungefärbten Schnittpräparat, nach dem Ablauf einiger histochemischer Reaktionen und nach Anfärbung mit verschiedenen Farbstoffen bestimmt (Meßergebnisse Tabelle 2).

Dabei ergab sich, daß die PAS-Reaktion und die Acetylierung keinen Einfluß auf die Formdoppeltbrechung haben und daß sich auch durch die gekoppelte Tetrazoniumreaktion nur eine sehr geringe Verstärkung erzielen läßt. Die An-

Tabelle 1

Färbung	Amyloid		Bindegewebe	
	Anfärbung	Doppeltbrechung	Anfärbung	Doppeltbrechung
<b>1. Reaktionen zum Nachweis der Eiweißkörper</b>				
Gek. Tetrazoniumreaktion . . . . .	+	+	+	+
Millonsche Reaktion . . . . .	+	+	+	+
Ninhydrin-Schiff (unfix. Schnitt) . .	+	+	+	+
Bialsche Reaktion am Schnittpräparat	+	+	Ø	+
<b>2. Reaktionen zum Nachweis der Kohlenhydrate</b>				
Best-Carmin (unfix. Schnitt) . . . .	Ø	Ø	Ø	Ø
PAS-Reaktion wäßrig . . . . .	+	+	+	+
alkoholisch . . . . .	+	+	+	+
Acetylierung — PAS . . . . .	Ø	+	Ø	+
Bromierung — PAS . . . . .	+	+	+	+
Acetylierung — Verseifung — PAS .	+	+	+	+
<b>3. Extraktionen mit Fermenten</b>				
Trypsin 1Std — gek. Tetraz. . . .	+	+	+	+
— Bial . . . . .	+	Ø	Ø	+
— PAS . . . . .	++	+(blau)	++	+
— Kongorot				
(fix. Schnitt) . .	+	++ (grün)	+	+(grün)
(unfix.) . . . .	+	++ (grün)	Ø	+(rot)
Papain 12 Std — gek. Tetraz. . . .	+	+	+	+
— Bial (fix. Schnitt) . .	Ø	Ø	Ø	Ø
1 Std — Bial (unfix. Schnitt) . .	Ø	Ø	Ø	+
12 Std — PAS (fix. Schnitt) . .	+	+	+	+
— PAS (unfix. Schnitt) . .	(+)	+	+	+
— Kongorot				
(fix. Schnitt) . .	+	++ (grün)	+	+(grün)
(unfix.) . . . .	+	++ (grün)	+	+(rot)
Hyaluronidase 3 Std — PAS . . . .	+	+	+	+
Diastase $\frac{1}{2}$ Std — PAS . . . . .	+	+	+	+
<b>4. Einführung verschiedener Radikale</b>				
Methylierung — Kongorot . . . . .	++	(+)	+	+
Benzoylierung 24 Std — gek. Tetraz. .	(+)	Ø	+	+(blau)
16 Std — Kongorot . . . . .	Ø	(+)	Ø	+
24 Std — Kongorot . . . . .	Ø	(+)	Ø	+
36 Std — Kongorot . . . . .	Ø	Ø	Ø	+
Acetylierung — Kongorot . . . . .	+	++ (grün)	Ø	+
Nitrierung (Lillie) — Kongorot . . .	+	++ (grün)	Ø	+(rot)
Sulfatierung (Gomori) — Kongorot . .	Ø	Ø	Ø	+
— Toluidinblau wäßrig . . . . .	hellblau	Ø	rotviolett	+(blau)
Sulfatierung (MOORE u. a.)				
— Kongorot . . . . .	(+)	(+) (grün)	Ø	+
— Toluidinblau . . . . .	blau	(+) (rot)	rot	+(blau)

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Färbung	Amyloid		Bindegewebe	
	Anfärbung	Doppeltbrechung	Anfärbung	Doppeltbrechung
5. Säurehydrolyse				
$1/10$ n HCL 30 min — gek. Tetraz. . . .	+	+	+	+
— Bial . . . . .	+	Ø	Ø	+
— PAS (fix.) . . . .	+	+	+	+
— PAS (unfix.) . . .	++	(+)	++	+
— Kongorot (fix.) .	+	++ (grün)	+	+(grün)
— Kongorot (unfix.)	+	++ (grün)	Ø	+(rot)
6. Reaktionen zum Nachweis der Fette und Lipide				
Sudanschwarz . . . . .	(+)	+(grau)	Ø	+
Sudanschwarz — nach 24 Std Pyridin	(+)	+	(+)	+
Scharlachrot . . . . .	Ø	+(grün)	Ø	+(rot)
Sudan III . . . . .	(+)	+(grün)	Ø	+(rot)
Nilblau . . . . .	violett	orangerot	hellblau	hellblau
PFAS — Reaktion . . . . .	(+)	+	(+)	+
UV — Schiff (BELT u. HAYES) . . .	(+)	+	(+)	+
7. Extraktionen mit Lipoidlösungsmitteln				
Methylalkohol 12 Std, 24 Std	}	++ (grün)	Ø	+
— Kongorot . . . . .				
Äthylalkohol 70 %, 100 %, 12 Std,				
24 Std — Kongorot . . . . .				
Äther 24 Std — Kongorot . . . . .	}			
Chloroform 24 Std — Kongorot . . .				
8. Sonstige Färbemethoden				
Kongorot in Zucker . . . . .	+	++ (grün)	(+)	+(rot)
in Caedax . . . . .	+	++ (grün)	Ø	+
				(ungefärbt)
Alcianblau . . . . .	(+)	+	(+)	+
Eisenbindung nach HALE . . . . .	(+)	+	(+)	+
Toluidinblau Zucker . . . . .	rotviolett	rot:orange	hellblau	hellblau
Caedax . . . . .	hellblau	ziegelrot	hellblau	hellblau

färbung mit Chlorantinitrot, Evans-Blau, Amidoschwarz und Methylenblau führt dagegen unter Farbwertänderung zu einer Verstärkung der Formdoppeltbrechung, die sich nach Art und Stärke mit der durch Kongorot erzielten vergleichen läßt.

In der Tabelle 2 fällt auf, daß die gemessene Doppelbrechung durch die eingeführten Substanzen entweder praktisch unverändert bleibt (PAS, Tetrazonium, Kresylviolett in Caedax) oder aber stets etwa in derselben Größenordnung verstärkt wird (Kongorot, Chlorantinitrot, Amidoschwarz, Evans-Blau, Eosin, Methylenblau in Zucker und Caedax und Kresylviolett in Zucker eingeschlossen). Es kann daraus geschlossen werden, daß weder die Farbe noch die chemische Struktur der eingelagerten Farbstoffe für die Verstärkung der Doppelbrechung verantwortlich ist. Der Gedanke liegt nahe, die Ursache der Doppelbrechungsverstärkung in allgemeineren physikalischen Ursachen zu suchen, die allen in die Strukturen eingeführten Stoffen gemeinsam sind.

Nach Kongorot- und Chlorantinitrotfärbung (ebenso auch nach Eosinfärbung) lassen sich bei Betrachtung im polarisierten Licht gelbe und grüne Stellen am Amyloid unterscheiden. Interessant ist, daß bei den gelben Stellen

Tabelle 2\*. Die Stärke der Doppeltbrechung

Färbung	Amyloid (Gangunterschied in mμ)		Bindegewebe (Gangunterschied in mμ)	
	in Zucker	in Caedax	in Zucker	in Caedax
Ungefärbt . . . . .	4	5	8	12
PAS . . . . .	4	4	6	13
Tetrazonium . . . . .		11		8
Benzoylierung/Kongorot 36 Std.		0		9
Sulfatierung/Kongorot . . . . .	0		7	
Nitrierung/Kongorot (gelb) . . . .	39		12	
Kongorot (gelb) . . . . .	32	32		
Kongorot (grün) . . . . .	14	15	7	10
Chlorantinlichtrot (gelb) . . . . .	34	35		
Chlorantinlichtrot (grün) . . . . .	15	13		37
Amidoschwarz . . . . .	35	21	12	
Evans-Blau . . . . .	36	12	13	16
Eosin . . . . .	31	16	8	17
	(gelbe Stelle)	(grüne Stelle)		
Methylenblau . . . . .	42	34	15	
Kresylviolett . . . . .	22	6	7	26

\* Die Bestimmung des Gangunterschiedes erfolgte mit dem elliptischen Kompensator der Firma Leitz nach dem Meßverfahren von BRACE. Die Zahlenangaben verstehen sich in mμ und stellen Mittelwerte aus mindestens 10 Einzelmessungen dar.

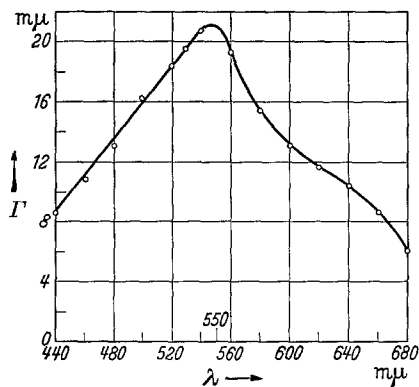


Abb. 1. Stärke der Doppeltbrechung des Amyloids nach Färbung mit Kongorot (Schnitteindeckung in Caedax), gemessen in monochromatischem Licht bei verschiedenen Wellenlängen. Es ergibt sich durch die Farbstoffan- oder -einlagerung eine selektive Verstärkung der Doppeltbrechung zwischen 530 und 560 mμ. Diesem Ergebnis entspricht die grüne bis grüngelbe Farbe amyloider Strukturen im polarisierten Licht nach Kongorotfärbung. Die Stärke der Doppeltbrechung ist definiert als Gangunterschied dividiert durch die Schichtdicke des Objekts

die Doppeltbrechung durchschnittlich doppelt so groß ist wie bei den grünen. Dies steht in Übereinstimmung mit der Auffassung, daß die gelben Stellen eine größere Schichtdicke als die grünen haben (Schichtdickeneffekt, SCHÖLL, BENNHOLD und DIEZEL 1959).

Papain-, Trypsin- und HCl-Einwirkung führen zu keiner Änderung der Doppeltbrechung. Dagegen läßt sich die Formdoppeltbrechung des Amyloids durch eine 16stündige Benzoylierung teilweise und durch eine 36stündige vollständig aufheben. Auch nach Sulfatierung ist die Doppeltbrechung amyloider Strukturen nicht mehr nachweisbar; eine Anfärbung mit Kongorot gelingt nicht mehr. Damit ist die Bialsche Probe zum Nachweis der Neuraminsäure, der Benzoylierungs- und der Sulfatierungseffekt mit Änderung der Formdoppeltbrechung und besonders dem Verlust der Farbwertänderung des Kongorots von Rot nach Grün im polarisierten Licht für das Amyloid charakteristisch.

Die Stärke der Doppeltbrechung des Amyloids nach Färbung mit Kongorot und Einschluß in Caedax wurde in Anlehnung an die Untersuchungen von WÄLCHI (1945) an der Viscosefaser und von MISSMAHL am Amyloid im monochromatischen

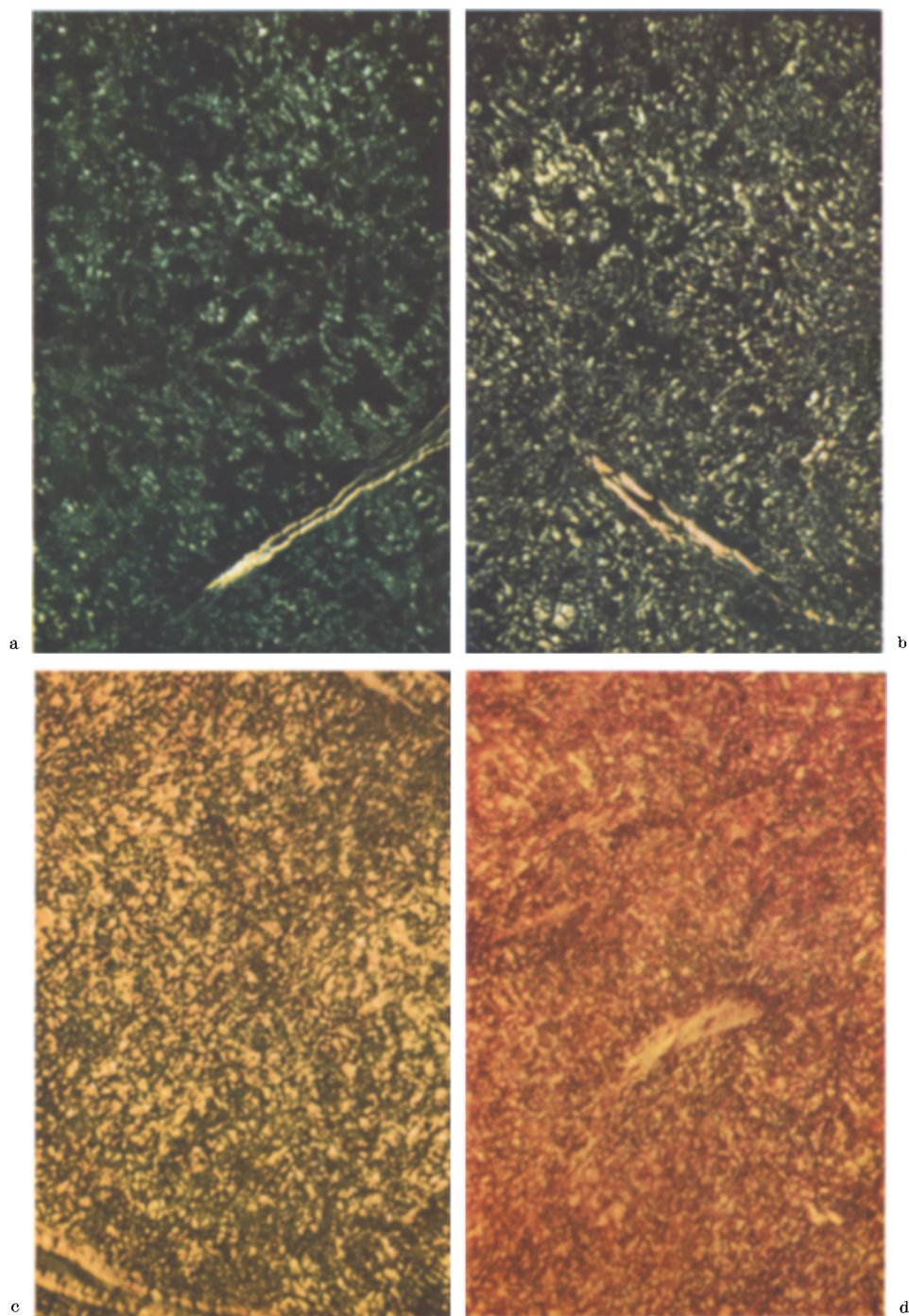


Abb. 2 a—d. Knotiges Amyloid der Leber (S. Nr. 812/55). Kongorotfärbung, Eindeckung in Caedax, Betrachtung im polarisierten Licht. a Schnittdicke 10  $\mu$ ; b Schnittdicke 20  $\mu$ ; c Schnittdicke 50  $\mu$ ; d Schnittdicke 100  $\mu$ . Mit zunehmender Schnittdicke ändert sich der Farbton von Grün über Gelbgrün, Gelb nach Rot (Schichtdickeneffekt im polarisierten Licht). Die 4 Schnitte wurden auf einem Objektträger aufgezogen und in einem Färbegang gefärbt

Licht bei verschiedenen Wellenlängen gemessen. Aus jeweils 10 Einzelmessungen wurde das Mittel gebildet. Dabei ergab sich eine Kurve mit einem Gipfel zwischen 530 und 560 m $\mu$ , also im Grün-Gelb (Abb. 1). Das Auftreten des grünen Farbtons im polarisierten Licht nach Färbung amyloider Strukturen mit Kongorot kann daher mit der selektiven Verstärkung der Doppelbrechung des Lichtes im Bereich von 500—580 m $\mu$  (Grün und Gelb) erklärt werden (SCHÖLL, BENNHOLD, DIEZEL 1959). Der grüne Farbton kongorot gefärbter Amyloidstrukturen verschwindet, wenn das Schnittpräparat eine größere Schnittdicke erlangt. Es ändert sich die Farbe von Grün über Gelbgrün, Gelb nach Rot. Es kommt dann der dem Kongorot eigene Farbwert auch im polarisierten Licht zum Vorschein. Man kann diesen Vorgang als Schichtdickenwirkung im polarisierten Licht bezeichnen (Abb. 2a—d). Wie Kongorot verhalten sich auch andere Farbstoffe, z. B. Chlorantinlichtrot und Eosin (vgl. Tabelle 2).

c) Untersuchungen über die Farbwertänderung von 47 Farbstoffen am Amyloid (Tabelle 3 und 4). In der Tabelle 3 sind die Farbstoffe aufgeführt, die zur Färbung amyloider Strukturen Verwendung fanden. Von den Farbstoffen wurden wäßrige Lösungen hergestellt, die Gewebsschnitte nach der Färbung teils in Zucker, teils in Caedax eingedeckt und im Mischlicht sowie polarisierten Licht untersucht. Die Farbstoffe entstammen 8 verschiedenen Stoffgruppen und lassen sich folgendermaßen zusammenstellen:

- I. Acridinfarbstoffe
- II. Azofarbstoffe a) Monoazofarbstoffe  
b) Disazofarbstoffe  
c) Trisazofarbstoffe
- III. Indigoide
- IV. Oxazinfarbstoffe
- V. Phthalocyaninfarbstoffe
- VI. Thiazinfarbstoffe
- VII. Triarylmethanfarbstoffe
- VIII. Xanthenfarbstoffe a) Fluoresceine  
b) Rhodamine

Die in der Tabelle aufgeführten 47 Farbstoffe verhalten sich an amyloiden Strukturen nicht einheitlich. Unter Berücksichtigung des Farbwertes im Mischlicht und polarisierten Licht sowie des färberischen Verhaltens gegen kollagene Bindegewebsfasern lassen sich die Farbstoffe in verschiedene Gruppen einteilen (Tabelle 4). Einen Farbwechsel am Amyloid bei Betrachtung im polarisierten Licht der sowohl nach Eindeckung in Zucker als auch nach Caedax feststellbar ist, zeigen Azofarbstoffe, Thiazinfarbstoffe, Fluoresceine und Acridinorange. *Von diesen geben nur die Azofarbstoffe einen gleichartigen Farbwechsel im polarisierten Licht am kollagenen Bindegewebe und hier auch nur dann, wenn man den Schnitt entwässert und in Caedax eindeckt.* Aus dieser Gruppe weisen außer Kongorot auch Janusgrün, Ponceau d. X., Chlorantinlichtgrün sowie Baumwollbraun keine Farbwertänderung am kollagenen Bindegewebe auf. Oxazinfarbstoffe mit Ausnahme des Gallocyanins und Triarylmethanfarbstoffe mit Ausnahme des Methylgrüns geben die Farbwertänderungen im polarisierten Licht nur nach Eindeckung in Zucker. Aus der Gruppe der von uns untersuchten Farbstoffe läßt sich mit den Indigoiden und dem Phthalocyaninfarbstoff Alcianblau am Amyloid keine Farbwertänderung im polarisierten Licht erzielen. Die Indigoide führen



jedoch am kollagenen Bindegewebe im polarisierten Licht zu einem markanten Farbwechsel, der mit Indigocarmin nach Eindeckung in Zucker und mit Pikroindigocarmin nach Eindeckung in Caedax auftritt.

Einen mit dem Kongorot vergleichbaren Farbwechsel am Amyloid geben zahlreiche andere Farbstoffe verschiedener Farbstoffklassen. Es entsprechen sich nicht nur die Farbwerte in ihrem Wechsel (Rot wird jeweils Gelb: Grün—dichroitisch) sondern auch das Ausmaß der Doppelbrechung. So läßt sich z.B. am

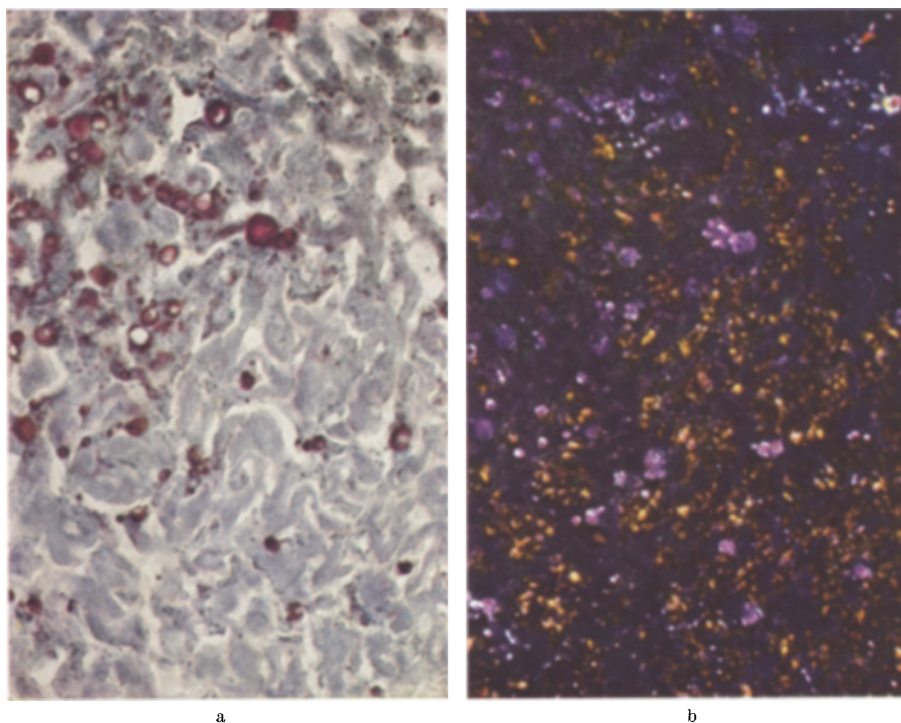


Abb. 3 a u. b. Amyloid der Leber (S. Nr. 123/58). Färbung mit Nilblau, Eindeckung in Zucker. a Mischlicht: Neutralfette sind mit Nilblau rot angefärbt. Amyloide Strukturen erscheinen blaß hellblau. b Gleiche Stelle wie a, jedoch im polarisierten Licht: Die amyloiden Strukturen leuchten unter Verstärkung der Doppelbrechung und Änderung des Farbwertes orange-gelb auf. Die Neutralfette behalten ihren tiefroten Farbton

gefärbten Schnittpräparat zwischen Kongorot einerseits und Ponceau, Chlorantinitrot, Siriusrot, Diphenylechtrot, Thiazinrot, Acridinorange, Eosin und Phloxin andererseits kein Unterschied feststellen.

Interessant ist das Verhalten von Nilblau. Nilblau färbt im Mischlicht Neutralfette rot und Lipide blau. Auch die amyloiden Strukturen sind blaß-hellblau angefärbt. Im polarisierten Licht leuchten die Neutralfette mit ihren Fettsäuren in dem gleichen roten Farbton auf, in dem sie auch im Mischlicht erscheinen. Die amyloiden Strukturen ändern jedoch ihren Farbcharakter. Unter Verstärkung der Doppelbrechung sind sie orange-gelb gefärbt (Abb. 3a). Das für Amyloid charakteristische Verhalten der Kongorotfärbung muß somit auf zahlreiche andere Farbstoffe ausgedehnt werden. Kresylviolett bildet eine Ausnahme. Während die amyloiden Strukturen bei Eindeckung in Zucker im polarisierten



Tabelle 3

Farbstoffe	Einschlussmittel	Amyloid		Kollagenes Bindegewebe		Farbstoffkonzentration	Färbedauer
		Mischlicht	Polarisiertes Licht	Mischlicht	Polarisiertes Licht		
<i>Acridinfarbstoffe</i>							
Acridinorange . . .	Zu. <sup>1</sup>	rot	gelb: grün	hellgelb	ungefärbt	1:400	7 Std
	Cae. <sup>2</sup>	blaßorange	gelb: grün	blaßorange	blaßhellgelb	1:400	7 Std
	Zu.	orange	gelb: grün	blaßgelb	blaßgelb	1:40000	7 Std
Atebrin . . . . .	Zu.	blaßhellgelb	blaßhellgelb	blaßhellgelb	ungefärbt	1:400	7 Std
	Cae.	blaßgelb	blaßhellgelb	blaßgelb	ungefärbt	1:400	7 Std
<i>Monocazofarbstoffe</i>							
Chrysoidin G . . .	Zu.	hellgelb	blaßhellblau	hellgelb	blaßhellgelb	1:400	30 min
	Cae.	hellbraun	blaßgelbgrün	hellbraun	ungefärbt	1:400	30 min
Janusgrün B . . .	Zu.	blaugrün	rot	hellblau	blau	1:400	5 min
	Cae.	blau	blaßrot	blau	hellblau	1:400	5 min
Orange G . . . . .	Zu.	blaßorange	blaßhellgrün	blaßorange	blaßhellgelb	1:400	7 Std
	Cae.	blaßorange	blaugrün	blaßorange	blaßblaugrün	1:400	7 Std
Methylorange . . .	Zu.	hellgelb	blaugrün	blaßgelb	blaßhellgelb	1:400	7 Std
	Cae.	hellgelb	blaugrün	hellgelb	blaugrün	1:400	7 Std
Ponceau 2 R . . .	Zu.	hellrot	gelb: grün	blaßhellrot	ungefärbt	1:400	7 Std
	Cae.	blaßrot	blaßgrün	blaßrot	ungefärbt	1:400	7 Std
Thiazinrot R . . .	Zu.	rot	gelb: grün	ungefärbt	ungefärbt	1:400	7 Std
	Cae.	rot	gelb: grün	rot	gelb: grün	1:400	7 Std
	Zu.	rot	gelb: grün	ungefärbt	ungefärbt	1:40000	7 Std
	Zu.	blaßrot	gelb: grün	ungefärbt	ungefärbt	1:400000	7 Std
Prontosil solubile	Zu.	hellgelb	hellgrün	hellgelb	blaßhellgrün	1:400	23 Std
	Cae.	ungefärbt	ungefärbt	ungefärbt	ungefärbt	1:400	9 Std
	Zu.	blaßhellgelb	blaßblaugrün	blaßhellgelb	blaßhellgelb	1:40000	23 Std
<i>Disazofarbstoffe</i>							
Bismarckbraun . .	Zu.	hellbraun	hellbraun	hellbraun	hellbraun	1:400	2 Std
	Cae.	hellbraun	gelbgrün	hellbraun	gelbgrün	1:400	2 Std
Chlorantinlichtrot	Zu.	rot	gelb: grün	hellrot	hellgelb		
	Cae.	rot	gelb: grün	hellrot	gelb: hellgrün		
Evans-Blau . . . .	Zu.	hellblau	rot	hellblau	hellblau	1:400	7 Std
	Cae.	hellblau	rot	hellblau	orangerot	1:400	7 Std
Geigyblau 536 med.	Zu.	blau	gelbrot: dunkelrot	rotviolett	blau	1:400	7 Std
	Cae.	blau	dunkelrot	rotviolett	orangerot	1:400	7 Std
Kongorot . . . . .	Zu.	rot	gelb: grün	rot	rot	1:200	20 mir
	Cae.	hellrot	gelb: grün	blaßhellrot	ungefärbt	1:200	20 mir
Amidoschwarz 10 B . . . .	Zu.	blaßblau	rot	blaßblau	blaßblau		
	Cae.	blaugrün	gelb: rot	blaugrün	gelb: rot		
Ölrot O . . . . .	Zu.	ungefärbt	ungefärbt	ungefärbt	ungefärbt	1:400	6 1/2 St
	Cae.	ungefärbt	ungefärbt	ungefärbt	ungefärbt	1:400	6 1/2 St
Sudan III . . . . .	Zu.	blaßhellrot	blaßhellgrün	ungefärbt	ungefärbt	1:400	20 mir
	Cae.			ungefärbt	ungefärbt	1:400	20 mir
Sudanschwarz B	Zu.	blaßhellgrau	(blaßhellrot)	ungefärbt	ungefärbt	1:100	20 mir
	Cae.	ungefärbt	ungefärbt	ungefärbt	ungefärbt	(70% Alkohol)	
Trypanblau . . . .	Zu.	blaßblaurot	ziegelrot	blaßrotviolett	hellblau	1:400	6 1/2 St
	Cae.	hellblau	gelb: rot	hellblau	gelb: rot	1:400	6 1/2 St
Dianilblau . . . .	Zu.	hellblau	ziegelrot	ungefärbt	ungefärbt	1:400	7 Std
	Cae.	blaßrotviolett	rot	blaßrotviolett	rot	1:400	7 Std
		lettrotbraun		lettrotbraun			
Siriusrot . . . . .	Zu.	rot	gelb: grün	blaßrot	blaßrot		
	Cae.	rot	gelb: grün	rot	gelb: grün		
Benzoechtrot . . .	Zu.	hellrot	hellgelb: hellgrün	hellrot	hellrot		
	Cae.	hellrot	blaßhellgelb	hellrot	blaßhellgelb		

<sup>1</sup> Zu. = Zucker; <sup>2</sup> Cae. = Caedax.

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Farbstoffe	Einschlussmittel	Amyloid		Kollagenes Bindegewebe		Farbstoffkonzentration	Färbedauer
		Mischlicht	Polarisiertes Licht	Mischlicht	Polarisiertes Licht		
Baumwollbraun .	Zu.	hellbraun	hellblaugrün	hellbraun	hellbraun	1:400	30 min
Diphenylechtrot	Cae.	braun	grün: braun	braun	grün: braun	1:400	30 min
	Zu.	rot	gelb: grün	ungefärbt	ungefärbt	1:400	30 min
	Cae.	rot	gelb: grün	rot	gelb: grün	1:400	30 min
<i>Trisazofarbstoffe</i>							
Direkttief-							
schwarz E . .	Zu.	blauschwarz	hellrot	grauschwarz	grau	1:100	2 Std
	Cae.	grauschwarz	hellrot	grauschwarz	blaßhellrot	1:100	2 Std
Sambesischwarz .	Zu.	blaßgrau-schwarz	hellrot	blaßgrau	blaßgrau	1:400	6½ Std
	Cae.	grauschwarz	hellrot	grauschwarz	hellrot	1:400	6½ Std
Chlorantinlichtgrün 5 GLL .	Zu.	blaßgelbgrün	blaßhellblau	blaßgelbgrün	blaßgelbgrün	1:400	7 Std
	Cae.	hellgrün	blau	hellgrün	hellgrün	1:400	7 Std
<i>Indigoidfarbstoffe</i>							
Indigocarmin . .	Zu.	hellblau	blaßrot	hellblau	carminrot	1:400	15 Std
	Cae.	ungefärbt	ungefärbt	ungefärbt	ungefärbt	1:400	15 Std
Pikro-Indigocarmin . . .	Zu.	gelb	gelb	blaugrün	blaugrün	1:400	1 Std
	Cae.	gelbgrün	gelbgrün	blau	rot	1:400	1 Std
<i>Oxazinfarbstoffe</i>							
Kresylviolett . .	Zu.	rotviolett	grün	hellblau	hellblau	1:100	10 min
	Cae.	blauviolett	dunkelrot	hellblau	ungefärbt	1:100	10 min
Paraffinschnitt	Zu.	hellrotviolett	hellrotviolett	hellblau	hellblau	1:100	10 min
Nilblau . . . .	Zu.	violett	orange	hellblau	hellblau		5 min
	Cae.	ungefärbt	ungefärbt	ungefärbt	ungefärbt		5 min
24 Std Pyridin-N.	Zu.	rotviolett	ziegelrot	rotviolett	ungefärbt		
Gallocyanin . .	Zu.	ungefärbt	ungefärbt	ungefärbt	ungefärbt	1:400	23 Std
	Cae.	ungefärbt	ungefärbt	ungefärbt	ungefärbt	1:400	23 Std
Coelestinblau . .	Zu.	—	—	—	—	—	—
	Cae.	—	—	—	—	—	—
<i>Phthalocyanin-farbstoffe</i>							
Alcianblau . . .	Zu.	hellgrün	hellgrün	hellgrün	hellgrün	1:200	1 Std
	Cae.	blaugrün	blaugrün	blaugrün	blaugrün	1:200	1 Std
<i>Thiazinfarbstoffe</i>							
Thionin . . . .	Zu.	rotviolett	orange: rot	blaßblau	blaßblau	1:1000	30 sec
	Cae.	rotviolett	orange: rot	hellblau	hellblau	1:1000	30 sec
Methylenblau . .	Zu.	rotviolett	orange: rot	hellblau	hellblau	1:100	30 sec
	Cae.	blaßhellblau	carminrot	blaßhellblau	hellblau	1:100	30 sec
Azur I . . . .	Zu.	blaßhellblau	ziegelrot	ungefärbt	ungefärbt	1:100	15 min
	Cae.	blau	hellrot	blau	hellblau	1:100	15 min
Toluidinblau . .	Zu.	rotviolett	orange: rot	hellblau	hellblau	1:100	10 sec
	Cae.	hellblau	ziegelrot	hellblau	hellblau	1:100	10 sec
<i>Triarylmethan-farbstoffe</i>							
Gentianaviolett .	Zu.	rotviolett	tief-dunkelblau	rotviolett	rot	1:400	3 sec
	Cae.	rotviolett	tief-dunkelrot	rotviolett	rotviolett	1:400	3 sec
Methylviolett .	Zu.	rotviolett	hellblau	rotviolett	hellrot	1:400	1 sec
	Cae.	rotviolett	rot	blaßviolett	rotviolett	1:400	1 sec
Kristallviolett .	Zu.	rotviolett	dunkelblaugrün	blauviolett	blauviolett	1:400	1 min
	Cae.	blaßviolett	rotviolett	blaßviolett	blaßviolett	1:400	1 min

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Farbstoffe	Einschlußmittel	Amyloid		Kollagenes Bindegewebe		Farbstoffkonzentration	Färbedauer
		Mischlicht	Polarisiertes Licht	Mischlicht	Polarisiertes Licht		
Methylgrün . . .	Zu. Cae.	hellgrün blaßhellgrün	hellgrün blaßhellgrün	hellgrün blaßhellgrün	hellgrün blaßhellgrün	1:400 1:400	2 sec 2 sec
<i>Xanthenfarbstoffe:</i> <i>Fluoresceine</i>							
Pyronin . . . . .	Zu. Cae.	—	—	—	—	—	—
Phloxin . . . . .	Zu. Cae.	rot rosa	gelb:grün gelb:grün	rot rosa	hellrot rosa	1:400 1:400	1 min 1 min
Eosin . . . . .	Zu. Cae.	hellrot hellrot	gelb:grün gelb:grün	hellrot hellrot	hellrot hellrot	1:100 1:100	2 min 3 min
<i>Rhodamine</i>							
Rhodamin B . . .	Zu. Cae. Zu.	rot blaßrot blaßrot	orange:rot blaßrot blaßrot	rot blaßrot ungefärbt	rot blaßrot ungefärbt	1:400 1:400 1:40 000	15 min 15 min 15 min

Tabelle 4

Farbwechsel am Amyloid		Farbwechsel am Kollagen		Kein Farbwechsel
Zucker	Caedax	Zucker	Caedax	
I. <i>Acridinfarbstoffe</i>				
Acridinorange . . .	Acridinorange	—	—	—
—	—	—	—	Atebrin
II. <i>Azofarbstoffe</i>				
a) <i>Monoazo-</i>				
Chrysoidin G . . .	(Chrysoidin G)	—	—	—
Janusgrün B . . .	Janusgrün B	—	—	—
Orange G . . . . .	Orange G	—	Orange G	—
Methylorange . . .	Methylorange	—	Methylorange	—
Ponceau 2R . . . .	Ponceau 2R	—	—	—
Thiazinrot R . . .	Thiazinrot R	—	Thiazinrot R	—
Prontosil . . . . .	(Prontosil)	—	(Prontosil)	—
b) <i>Disazo-</i>				
Chlorantinlichtrot	Bismarckbraun	—	Bismarckbraun	—
Evans-Blau . . . .	Chlorantinlichtrot	—	(Chlorantinlichtrot)	—
Geigyblau 536 . . .	Evans-Blau	—	Evans-Blau	—
Kongorot . . . . .	Geigyblau 536	—	Geigyblau 536	—
Amidoschwarz B . .	Kongorot	—	(Kongorot)	—
—	Amidoschwarz B	—	Amidoschwarz B	—
(Sudan III) . . . .	—	—	—	Ölrot 0
(Sudanschwarz) . .	Sudan III	—	—	—
Trypanblau . . . .	Trypanblau	—	Trypanblau	—
Dianilblau . . . . .	Dianilblau	—	Dianilblau	—
Siriusrot . . . . .	Siriusrot	—	Siriusrot	—
Benzoechtröt . . . .	—	—	—	—
Baumwollbraun . . .	Baumwollbraun	—	—	—
Diphenylechtröt . .	Diphenylechtröt	—	Diphenylechtröt	—
c) <i>Trisazo-</i>				
Direkttiefschwarz	Direkttiefschwarz	—	Direkttiefschwarz	—
Sambesischwarz . .	Sambesischwarz	—	Sambesischwarz	—
Chlorantinlichtgrün 5 GLL . .	Chlorantinlichtgrün 5 GLL	—	—	—
III. <i>Indigoide</i>				
—	—	Indigo-carmin	—	—
—	—	—	Pikroindigocarmin	—

Tabelle 4 (Fortsetzung)

Farbwechsel am Amyloid		Farbwechsel am Kollagen		Kein Farbwechsel
Zucker	Caedax	Zucker	Caedax	
IV. <i>Oxazinfarbstoffe</i>				
<i>Kresylviolett</i> . . . .	<i>Kresylviolett</i>	—	—	—
<i>Nilblau</i> . . . . .	( <i>Nilblau</i> )	—	—	—
—	—	—	—	Gallo-
<i>Coelestinblau</i> . . . .				cyanin
V. <i>Phthalocyanin-</i> <i>farbstoffe</i>				
—	—	—	—	Alcianblau
VI. <i>Thiazinfarbstoffe</i>				
<i>Thionin</i> . . . . .	<i>Thionin</i>	—	—	—
<i>Methylenblau</i> . . . .	<i>Methylenblau</i>	—	—	—
<i>Azur I</i> . . . . .	<i>Azur I</i>	—	—	—
<i>Toluidinblau</i> . . . .	<i>Toluidinblau</i>	—	—	—
VII. <i>Triarylmethanfarb-</i> <i>stoffe</i>				
<i>Gentianaviolett</i> . . .	—	—	—	—
<i>Methylviolett</i> . . . .	—	—	—	—
<i>Kristallviolett</i> . . . .	—	—	—	—
—	—	—	—	Methyl-
VIII. <i>Xanthenfarbstoffe</i>				
a) <i>Fluoresceine</i>				
<i>Pyronin</i> . . . . .				
<i>Eosin</i> . . . . .	<i>Eosin</i>	—	—	—
<i>Phloxin</i> . . . . .	<i>Phloxin</i>	—	—	—
b) <i>Rhodamine</i>				
—	—	—	—	Rhod-
				amin B

Licht grün aufleuchten, erscheinen sie nach Schnittentwässerung und Caedax-einschluß dunkelrot.

### Diskussion

In Übereinstimmung mit der Literatur konnten wir bausteinhistochemisch im Amyloid neben einem Eiweißkörper eine Kohlenhydratkomponente nachweisen. Die positive Bialsche Reaktion am Schnittpräparat entspricht einem Gehalt an Neuraminsäure. Dies steht in Einklang mit der Beobachtung von KLENK und FAILLARD (1955). Da es gelingt, nach Papaineinwirkung auf den unfixierten Gefrierschnitt die Bialsche Probe und die PAS-Reaktion wesentlich abzuschwächen bzw. zum Verschwinden zu bringen, kann man diskutieren, ob die PAS-Positivität vorwiegend auf dem Gehalt an Neuraminsäure beruht. Der Ausfall der gekoppelten Tetrazoniumreaktion nach Benzoylierung weist auf einen relativ geringen Gehalt von Histidin hin und steht damit in Übereinstimmung zu den Angaben von EPPINGER (1922) und LETTERER, GEROK und SCHNEIDER (1955). Lipide haben sich mit unserer Methodik nicht mit genügender Sicherheit nachweisen lassen.

BRAUNSTEIN und BUEGER (1959) haben die Metachromasie mit Kristallviolett und die mit Toluidinblau nach Pepsineinwirkung auf die Anwesenheit eines carboxylgruppenhaltigen Mukopolysaccharids zurückgeführt. Auf Grund der histochemischen Befunde enthalte das Amyloid Proteine, Kohlenhydrate

(oder Glykoproteide) und saure Mukopolysaccharide. Unseres Erachtens erlaubt die histochemische Methodik keine so weitgehende Folgerung. Als gesichert kann lediglich gelten: Amyloid besteht vorwiegend aus einem gerichteten, orientierten Eiweißkörper, der Neuraminsäure enthält, und dem geringe Mengen eines noch nicht näher bestimmten Kohlenhydrates neutraler oder schwach saurer Natur beigegeben sind. Das entspricht auch den chemischen Analysen von GILES und CALKINS (1955) sowie CALKINS und COHEN (1958). Über die Natur des Eiweißkörpers gehen die Meinungen auseinander. VAZQUES und DIXON (1956) sowie WAGNER (1958) vermuten die Anwesenheit eines Globulins, während CALKINS und COHEN (1958), MILLS u. Mitarb. (1959) sowie COHEN und CALKINS (1959) ausdrücklich betonen, daß der Eiweißkörper im Amyloid sich nicht von  $\gamma$ -Globulin oder Kollagen ableiten lasse.

Uns hat besonders die Frage beschäftigt, ob die *positive Formdoppeltbrechung des Amyloids* auf der Anwesenheit maskierter Bindegewebsfasern (MISSMAHL) beruht oder ob die amyloide Struktur als solche auf Grund ihres Gehaltes an besonderen Eiweißen oder Kohlenhydraten die Ebene des polarisierten Lichtes dreht. Die Formdoppeltbrechung läßt sich mit keinem der geprüften Fermente (Trypsin, Papain, Hyaluronidase, Diastase) zum Verschwinden bringen. Bemerkenswert erscheint uns ihr Verlust durch Einführung eines Benzolringes in die amyloide Struktur (Benzoylierung). Aus der nachfolgenden Tetrazoniumreaktion kann angenommen werden, daß die Benzoylierung an Eiweißkörpern abläuft. Wir möchten diesen Befund dahingehend verwerten, daß die unabhängig von jeder Färbung vorhandene Formdoppeltbrechung amyloider Strukturen auf der Anwesenheit bestimmt aufgebauter, *gerichteter Eiweißkörper* beruht. Diese werden offenbar durch die Benzoylierung verändert. Gleichzeitig erfährt die Anfärbung mit Kongorot und mit Farbstoffen, die sich wie Kongorot verhalten, eine Änderung: Die charakteristischen Farbwertänderungen bleiben aus. Vermutlich ist daher, neben der Doppeltbrechung, auch die Anfärbung mit den in Tabelle 3 und 4 zusammengestellten Farbstoffen in erster Linie auf den Eiweißanteil des Amyloids zurückzuführen.

Einen der Benzoylierung entsprechenden Effekt konnten wir nur mit der Sulfatierung nach GOMORI erzielen. Nach der Sulfatierung färben sich die amyloiden Strukturen mit Toluidinblau nicht, wie zu erwarten, metachromatisch rot-violett, sondern hellblau an. Die in unserem Schnittpräparat enthaltenen Leberzellen und Bindegewebsfasern geben den von GOMORI (1954) beschriebenen Sulfatierungseffekt: eine verstärkte Metachromasie nach Toluidinblaufärbung.

Schließt man sich der von WÄLCHI (1945) herausgearbeiteten Vorstellung über die Kongorotfärbung an, dann wird die Farbwertänderung nach Grün im polarisierten Licht und die Verstärkung der Doppeltbrechung durch eine Farbstoffeinlagerung in capilläre Hohlräume hervorgerufen. Der Farbstoff lagert sich in Form stäbchenförmiger Micellen parallel zur Faserachse. Die von WÄLCHI an der Cellulose gewonnenen Ergebnisse können unseres Erachtens auf die amyloiden Strukturen übertragen werden. Unsere Messungen der Doppeltbrechung (Bestimmung des Gangunterschiedes) des Kongorots an amyloiden Strukturen bei verschiedenen Wellenlängen (Abb. 1) stimmen mit denen WÄLCHIS an der Viscosefaser überein. Möglicherweise verfügt die amyloide Struktur wie die Cellulose über submikroskopische Capillarräume, in die der Farbstoff eingelagert

wird. Durch die Einführung des Benzolringes einerseits und die Sulfatierung andererseits könnten diese Räume verändert werden.

Unsere Untersuchungen geben keinen Hinweis darauf, daß die Doppelbrechung des Amyloids auf der Doppelbrechung maskierter reticulärer Fasern beruht. Die reticulären Fasern haben nicht nur eine andere positive Formdoppelbrechung, sondern verhalten sich auch anders gegen die geprüften Farbstoffe (vgl. Tabelle 2—4).

Die charakteristische Farbstoffeinlagerung und Doppelbrechung ist somit in der amyloiden Struktur selbst begründet. Da die amyloide Struktur vorwiegend aus einem Eiweißkörper aufgebaut ist und da sich die für das Amyloid charakteristischen Verhaltensweisen (Kongorotfärbung, Doppelbrechung) ändern, wenn dieser durch chemische Reaktionen in seiner Struktur geändert wird, darf vermutet werden, daß die Eigentümlichkeiten, die das Amyloid pathologisch-histologisch und histochemisch charakterisieren, auf der Anwesenheit eines Eiweißkörpers beruhen, der in dieser Form in den Geweben sonst nicht zu beobachten ist. Zugrunde liegt wohl ein besonders strukturierter Eiweißkörper, der als Paraprotein im Sinne RANDERATHs (1947 und 1950) aufgefaßt werden kann. Hier anschließend könnte der amyloiden Struktur eine teils allgemeine teils nur örtlich abgelaufene Störung in der Eiweißkörpersynthese zugrunde liegen.

**Nachtrag.** Nach Abschluß der Arbeit werden wir mit den elektronenmikroskopischen Untersuchungen von COHEN und CALKINS (1959) bekannt. Experimentell erzeugtes Amyloid (Caseingaben) in den Glomerula der Niere beim Kaninchen, subcutane Amyloidablagerungen bei allgemeiner (primärer) Amyloidose und Nierenamyloid bei sekundärer Amyloidose zeigen übereinstimmend eine feine faserige Struktur, die deutlich von der kollagenen Faser unterschieden ist. Die Fasern sind teilweise zu Bündeln geordnet. Für das experimentell erzeugte Amyloid wird die Faserlänge mit 1200 bis 5000 Å und die Breite mit 50—120 Å angegeben. Menschliches Amyloid enthält Fasern bis zu 16000 Å Länge. Diese Befunde stehen im Einklang mit den Ergebnissen der polarisationsoptischen Untersuchung. Die elektronenmikroskopisch dargestellten Fasern könnten dem oben beschriebenen „gerichteten Eiweißkörper“ entsprechen, der für die positive Formdoppelbrechung des Amyloids verantwortlich gemacht wird. In einer soeben erschienenen Studie über die experimentelle Amyloidose beim Kaninchen beschreiben COHEN, CALKINS und LEVENE (1959) histochemische und polarisationsoptische Befunde, und diskutieren eine innere micellare Ordnung des Amyloids derart, daß eine submikroskopische Einheit parallel zu ihrer Längsachse gelagert sei. — GOUYUO (1959) versucht, auf Grund einer vergleichenden Betrachtung der Ergebnisse der Literatur Unterschiede zwischen den amyloiden Strukturen bei sog. primärer und sekundärer Amyloidose herauszuarbeiten. — Vergleichende Absorptionsmessungen im ultravioletten und sichtbaren Licht ergaben keine Unterschiede zwischen dem Amyloid bei sekundärer Amyloidose und bei Myelom. Die Absorption lag bei 2,800 Å (GUEFT 1959).

### Zusammenfassung

1. Bausteinhistochemisch besteht das Amyloid aus einem Eiweißkörper mit einer Kohlenhydratkomponente. Der Eiweißkörper enthält Neuraminsäure, die nach Papainwirkung aus den amyloiden Strukturen verschwindet.

2. Polarisationsoptisch verfügt das Amyloid über eine positive Formdoppelbrechung, die durch Benzoylierung und Sulfatierung aufgehoben werden kann. Mit dem Verlust der Formdoppelbrechung geht die Anfärbung mit Kongorot verloren. Die positive Formdoppelbrechung des Amyloids beruht auf der besonderen Anordnung (Ausrichtung) des Eiweißkörpers. Bei Prüfung des kongorotgefärbten Amyloid im monochromatischen Licht erfährt die Doppelbrechung eine maximale Verstärkung zwischen 540 und 560 m $\mu$ .

3. Der für das Amyloid nach Kongorotfärbung charakteristische Farbwechsel im polarisierten Licht wird auch bei zahlreichen anderen Farbstoffen beobachtet. Die Zunahme der Doppelbrechung entspricht dabei der nach Kongorotanfärbung.

4. Die kollagene und reticuläre Bindegewebsfaser verhält sich grundsätzlich anders als das Amyloid.

### Summary

Histochemically, amyloid is composed of protein with a carbohydrate component. The protein contains neuraminic acid which disappears with papain digestion.

In polarization studies amyloid discloses a double refraction that can be abolished only by benzoylation and sulfuration. With the loss of the double refraction, the affinity for the congo red stain is also lost. The double refraction is undoubtedly related to a special positioning of the protein fraction. When the amyloid is stained with congo red and studied in monochromatic light, the double refraction reveals a maximal intensity between 540—560 m $\mu$ .

The characteristic change in color of amyloid stained with congo red that occurs in polarized light is also observed with numerous other dyes, and the increase in the double refraction seen with them is similar to that after congo red staining.

The collagen and reticular connective tissue fibers react different from the amyloid.

### Literatur

- BRAUNSTEIN, H., and L. BUERGER: A study of the histochemical and staining characteristics of amyloid. *Amer. J. Path.* **35**, 791—800 (1959). — CALKINS, E., and A. S. COHEN: Chemical composition of amyloid. *J. clin. Invest.* **37**, 882—883 (1958). — CALKINS, E., A. S. COHEN and D. GITLIN: Immunochemical determination of gamma globulin content of amyloid. *Fed. Proc.* **17**, 431 (1958). — COHEN, A. S., and E. CALKINS: Electron microscopic observations on a fibrous component in amyloid of diverse origins. *Nature (Lond.)* **183**, 1202—1203 (1959). — COHEN, A. S., E. CALKINS and CH. I. LEVENE: Studies on experimental amyloidosis. I. Analysis of histology and staining reactions of caseininduced amyloidosis in the rabbit. *Amer. J. Path.* **35**, 971—989 (1959). — DIEZEL, P. B.: Die Stoffwechselstörungen der Sphingolipide. *Monographien Neurol. H.* 80 (1957). — Das normale und pathologische Altern des Gehirns. Diskussionsbemerkung. *Zbl. ges. Neurol. Psychiat.* **144**, 2 (1958a). — Die Metachromasie mit verschiedenen Farbstoffen im Mischlicht und im polarisierten Licht. *Acta histochem. (Jena) Suppl.* **1**, 134—139 (1958b). — DIEZEL, P. B., u. G. NEIMANIS: Über Farbwertänderungen von Azofarbstoffen. Ein Beitrag zum Problem der Metachromasie. *Histochemie* **1**, 151—170 (1959). — DIVRY, P.: La pathochimie générale et cellulaire des processus séniles et préséniles. *Proc. Intern. Congr. Neuropathology Rom*, Sept. 1952, S. 1—35. — DIVRY, P., et M. FLORKIN: Sur les propriétés optiques de l'amyloïde. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* **97**, 1808—1810 (1927). — EPPINGER, H.: Zur Chemie der amyloiden Entartung. *Biochem. Z.* **127**, 107—111 (1922). — GILES, R. B., and E. CALKINS: Studies of the composition of secondary amyloid. *J. clin. Invest.* **34**, 1476—1482 (1955). — GOMORI, G.: The histochemistry of mucopolysaccharides. *Brit. J. exper. Path.* **35**,



377—380 (1954). — GOUYGOU, C.: Substratum et conséquences anatomiques de l'amyloidose. *Rev. Pract. (Paris)* **9**, 1303—1314 (1959). — GUEFT, B.: The in situ absorption spectrums of hyalin, fibrinoid and amyloid substances. *Amer. J. Path.* **35**, 677—678 (1959). — HASS, G., and R. Z. SCHULZ: Amyloid; I. Methods of isolating amyloid from other tissue elements. *A.M.A. Arch. Path.* **30**, 240—259 (1940). — JOHANSSON, G. A., and H. H. PFEIFFER: On the amyloid-congo-red-complex in histological sections and the genesis of the amyloid substance. *Acta anat. (Basel)* **20**, 285—290 (1954). — KLENK, E., u. H. FAILLARD: Über das Vorkommen von Neuraminsäure im Lebereiweiß bei amyloider Degeneration. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **299**, 191—192 (1955). — KRÜCKE, W.: Die Paramyloidose. *Ergebn. inn. Med. Kinderheilk.* **11**, 299—378 (1959). — LADEWIG, P.: Double-refringence of the amyloid-congo-red-complex in histological sections. *Nature (Lond.)* **156**, 81—82 (1945). — LETTERER, E., W. GEROK u. G. SCHNEIDER: Vergleichende Untersuchungen über den Aminosäurebestand von Serum-Eiweiß, Lebereiweiß, Amyloid, Hyalin und Kollagen. *Virchows Arch. path. Anat.* **327**, 327—342 (1955). — MILLS, J. A., A. S. COHEN and E. CALKINS: Serum survival time of gamma globulin in human amyloidosis. *Fed. Proc.* **18**, No 1 (1959). — MISSMAHL, H. P.: Die im Amyloid vorkommende Doppelbrechung. *Acta anat. (Basel)* **25**, 73—77 (1955). — Polarisationsoptischer Beitrag zur Kongorotfärbung des Amyloid. *Z. Mikrosk.* **63**, 133—139 (1957). — MISSMAHL, H. P., u. M. HARTWIG: Polarisationsoptische Untersuchungen an der Amyloidsubstanz. *Virchows Arch. path. Anat.* **324**, 489—508 (1953). — Polarisationsoptische Untersuchungen über die Beziehungen zwischen den Drusen und Fibrillenveränderungen im Gehirn bei Alzheimerscher Erkrankung und drusenartigen Ablagerungen amyloider Substanz in anderen Organen. *Z. Nervenheilk.* **171**, 173—180 (1954). — PEARSE, A. G. E.: *Histochemistry, theoretical and applied*. London: J. & A. Churchill Ltd. 1954. — PFEIFFER, H. H.: Messungen der Doppelbrechung ( $\Delta n$ ) und des Dichroismus ( $\Delta k$ ) am Amyloid in Kulturen in vitro. *Exp. Cell. Res.* **4**, 181—187 (1953). — RANDERATH, E.: Zur pathologischen Anatomie der sog. Amyloidnephrose. Zugleich ein Beitrag zur Frage der allgemeinen Amyloidose als Paraproteinoase. *Virchows Arch. path. Anat.* **314**, 388—459 (1947). — Über die Morphologie der Paraproteinoasen. *Verh. dtsch. Path.* **32**, 27—77 (1950), Tagg. Sept. 1948. — ROMÁNYI, G.: Über die submikroskopische Struktur des Amyloids. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **80**, 411 (1943). — Über die submikroskopische Struktur des Amyloids. *Schweiz. Z. Path.* **12**, 253 bis 262 (1949). — Zur Frage der submikroskopischen Struktur des Amyloids. *Zbl. Path.* **95**, 130—138 (1956). — RUKAVINA, J. G., W. D. BLOCK and A. C. CURTIS: Familial primary systemic amyloidosis: An experimental, genetic and clinic study. *J. invest. Derm.* **27**, 111—131 (1956). — SCHÖLL, H., I. BENNHOLD u. P. B. DIEZEL: Über verschiedene Arten von Farbänderungen bei Azofarbstoffen. Ein Beitrag zur Metachromasie. *Histochemie* **1**, 315—330 (1959). — SEITELBERGER, F.: Polarisationsoptische Phänomene der Amyloid-Disazofarbstoff-Komplexe. *Naturwiss.* **45**, 40—41 (1958). — VAZQUES, J. J., and F. J. DIXON: Immunohistochemical analysis of amyloid by the fluorescence technique. *J. exp. Med.* **104**, 727—736 (1956). — VIRCHOW, R.: Weitere Mitteilungen über das Vorkommen der pflanzlichen Cellulose beim Menschen. *Zur Cellulose-Frage. Virchows Arch. path. Anat.* **6**, 268—271, 416—426 (1854). — WÄLCHI, O.: Die Einlagerung von Kongorot in Zellulose. *Naturw. Diss. Zürich* 1945. — WAGNER, B. M.: Nature of amyloid. *Fed. Proc.* **17**, 464 (1958).

Priv.-Doz. Dr. P. B. DIEZEL

Pathologisches Institut der Universität Heidelberg