

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Köln
(Direktor: Prof. Dr. med. et phil. H. HEINLEIN)

Über die Bildung organischer Substanzen bei der Kollidonspeicherung

Von
G. HÜBNER

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 14. Dezember 1959)

In früheren Untersuchungen haben wir nachgewiesen, daß das Kollidon (K.), der als Plasmaexpander wirksame Bestandteil des Blutersatzmittels „Periston“, im Organismus in erheblichem Ausmaß cellulär gespeichert wird (HEINLEIN und HÜBNER). Neben einer Speicherung in Leber, Nieren und Milz war besonders das sog. RES im weiteren Sinne, das Bindegewebe betroffen. Bei der Untersuchung alter K.-Ablagerungen war von uns in Übereinstimmung mit anderen Autoren (FRESEN und WEESE, BARNER u. a.) festgestellt worden, daß diese alten Ablagerungen häufig von einer eisenpositiven Hülle umgeben waren. Wir konnten zudem die Feststellung machen, daß alte K.-Ablagerungen PAS-positiv reagieren. Angeregt durch die Untersuchungen von GEDIGK u. Mitarb. über die Zusammensetzung und die formale Genese des Hämosiderins, über die Speicherung von Schwermetallverbindungen und von Kieseläurederivaten stellten wir systematische Untersuchungen darüber an, ob es auch bei der K.-Speicherung in den speichernden Zellen zur Bildung organischer Substanzen kommt. Das K. als reaktionsträges chemisch genau charakterisiertes organisches körperfremdes Kolloid, das zudem für die Zelle ein indifferenter Stoff ist, schien uns besonders geeignet, die Vorgänge zu untersuchen, die bei der cellulären Stoffspeicherung kolloidaler Stoffe ablaufen.

Material und Methoden

Wir untersuchten die Organe von Ratten und Mäusen, die wir zum Teil bereits zu unseren früheren Untersuchungen herangezogen hatten (HEINLEIN und HÜBNER, HÜBNER). Diese Tiere hatten das K. in Form der handelsüblichen Lösung „Periston“ (Bayer) entweder intravenös, intraperitoneal oder subcutan appliziert erhalten. In dem Präparat liegt das K. als 3,5%ige Lösung vor. Die Tiere hatten Dosen von 0,3—3,0 g K. pro kg Körpergewicht erhalten. Zwei Ratten war die hohe Dosis von 15 g/kg Körpergewicht in zahlreichen aufeinanderfolgenden Injektionen zugeführt worden. Das Intervall zwischen der K.-Gabe und dem Tod des Tieres lag zwischen 14 Std und 2 Jahren, wobei die beiden Tiere mit der erwähnten hohen Dosierung 1½ bzw. 2 Jahre nach der letzten Injektion getötet worden waren. Wir untersuchten weiter die Organe eines Hundes, der etwa 2 Jahre nach einer K.-Gabe von 1 g/kg Körpergewicht verstarb und die Organe einer zur Sektion gekommenen Frau, die bei einer chronischen Pankreatitis mit rezidivierenden Pankreasfettgewebsnekrosen in den letzten 2 Monaten vor dem Tode insgesamt 1700 cm³ Periston N in mehrfachen aufeinanderfolgenden Infusionen erhalten hatte.

Nach unseren früheren Erfahrungen erschien uns das subcutane Bindegewebe und die Leber als für unsere Untersuchungen besonders geeignet; in einzelnen Fällen kamen jedoch auch andere Organe, wie Nebennieren, Nieren, Lymphknoten oder Pankreas zur Untersuchung. Die Organe wurden im allgemeinen 18—24 Std in Formalin fixiert und in der üblichen Weise in Paraffin eingebettet. Von jedem Organ fixierten wir zudem ein Stück zum Nachweis des K. in dem von JANCSÓ angegebenen Fixierungsgemisch.

Bei den angewandten *histochemischen Methoden* richteten wir uns im allgemeinen nach den von GEDIGK (1, 2) mitgeteilten methodischen Angaben.

Der K.-Nachweis ist wegen der guten Löslichkeit des K. in den üblichen Fixierungsmittern schwierig. Bei der von uns benutzten Nachweismethode wird es durch eine hochkonzentrierte Ammoniumsulfatlösung gefällt. Die methodischen Besonderheiten des K.-Nachweises im Schnitt erlauben nicht, daß an demselben Schnitt neben dem K.-Nachweis weitere histochemische Untersuchungen ausgeführt werden können. Die histochemischen Reaktionen müssen daher am Paraffinschnitt erfolgen, an dem das K., besonders bei jüngeren Ablagerungen, aus den speichernden Zellen durch die bei der Paraffineinbettung verwendeten wäßrigen und alkoholischen Medien wieder herausgelöst ist. Es müssen immer Vergleichsschnitte zur Untersuchung herangezogen werden, um die Lage der k.-speichernden Zellen genau festzustellen. Diese lassen sich allerdings auch am paraffineingebetteten Material bei einiger Übung auf Grund ihrer morphologischen Besonderheiten leicht erkennen. Besonders günstige Verhältnisse ergeben sich bei den stark speichernden Histiozyten des subcutanen Bindegewebes. Diese fallen durch zahlreiche kugelige, etwa bis $2\text{ }\mu$ große Vacuolen auf, die das ganze Cytoplasma erfüllen und nur den Kern freilassen. Sie entsprechen in Form, Größe und Anordnung genau den K.-Kugeln, die beim K.-Nachweis in diesen Zellen zu erkennen sind. Es war uns stets möglich, die k.-speichernden Zellen auch am paraffineingebetteten Material aufzufinden. Analog liegen die Verhältnisse bei den Kupfferschen Sternzellen der Leber, den speichernden Reticulumzellen der Milz und der Lymphknoten und bei den Histiocyten im Interstitium der übrigen Organe. Bei älteren K.-Ablagerungen ergab sich eine andere methodische Schwierigkeit. Hier war das K. häufig auch noch im Paraffinschnitt zu erkennen, wenn es mit einem zum K.-Nachweis geeigneten Farbstoff, wie Kernechtrot oder Kongorot, angefärbt wurde. Wir fanden eine Erscheinung, auf die schon HÜSSELMANN in seinen Untersuchungen hingewiesen hatte, nämlich die, daß in diesen Fällen das im Schnitt verbliebene K. aus den speichernden Zellen nicht mehr herausgelöst werden konnte. Stundenlanges Behandeln der Schnitte in wäßrigen und alkoholischen Lösungen sowie mit verdünnten Säuren konnte das K. im Schnitt nicht mehr in Lösung bringen. Je größer der zeitliche Abstand zu der Injektion wurde, desto leichter konnte das K. im Paraffinschnitt nachgewiesen werden, und desto fester wurde es im Gewebe gebunden. Diese schwere Löslichkeit des K. in älteren Ablagerungen kann in Parallel gesetzt werden mit der Tatsache, daß das *in vitro* mit Ammoniumsulfat gefallte K. ebenfalls nicht mehr gelöst werden kann. Wir haben darauf bereits in früheren Untersuchungen hingewiesen (HÜBNER). Diese Unlöslichkeit des gefallten K. erlaubt die Anwendung verschiedener Farbstoffe beim K.-Nachweis frischer Speicherungen. Es drängt sich bei diesen Beobachtungen die Vermutung auf, daß die mit der Zeit abnehmende Löslichkeit des K. in der speichernden Zelle auf ähnlichen Vorgängen beruht, wie die Ausfällung des K. *in vitro* durch Salzlösungen. Schon HÜSSELMANN hat darauf hingewiesen, und wir möchten uns seiner Meinung anschließen, daß das K. in der speichernden Zelle einem zunehmenden Wasserentzug ausgesetzt ist. Es dürfte sich um eine Alterung des K. handeln, wobei der Wasserentzug *in vitro* durch die Salzlösung, in den Zellen durch die umliegenden Eiweiße und Elektrolyte eintritt. Hat diese Fällung erst ein bestimmtes Ausmaß erreicht, dann ist sie irreversibel. Für eine chemische Veränderung des K. in der Zelle oder für einen Abbau des Fremdstoffes haben wir keinen Anhalt finden können. Der stets gleiche Ausfall der Farbreaktionen an frischen und älteren K.-Ablagerungen spricht unseres Erachtens dagegen. Wir sahen das K. im übrigen in allen untersuchten Organen cellulär gespeichert, amorphe Ablagerungen, wie sie JECKELN, HÜSSELMANN und SCHÖN im Interstitium der Organe sahen, konnten wir nicht beobachten.

Bei der Anwendung histochemischer Färbeverfahren muß noch auf die Eigenschaft des K. hingewiesen werden, zahlreiche Farbstoffe adsorptiv zu binden. SCHOLTAN hat die Verhältnisse bei der Farbstoffbindung an das K. genau untersucht; im histologischen Schnitt wurde die Affinität des K. zu verschiedenen Farbstoffen ebenfalls in zahlreichen, auch eigenen, Untersuchungen festgestellt (JECKELN, SCHÖN, HÜSSELMANN, Literatur s. bei HEINLEIN und HÜBNER). Wir haben daher, besonders in den Fällen, bei denen das K. nicht völlig aus dem Schnitt herausgelöst wurde, uns dagegen zuichern gesucht, daß das positive Färbeergebnis bei den histochemischen Untersuchungen nicht durch eine Adsorption des verwendeten Farbstoffes an das K. verursacht war. Durch Modellversuche ließ sich feststellen, daß eine Anfärbung des K. bei der PAS-Färbung nicht stattfindet. Der negative Ausfall der PAS-Reaktion nach vorhergehender Acetylierung erbrachte noch eine zusätzliche Sicherung.

Dasselbe gilt sinngemäß für die Tetrazoniumreaktion. Für Methylenblau und Toluidinblau konnten wir die Angaben SCHOLTANS über eine fehlende Adsorption dieser Stoffe an das K. bestätigen. Anders liegen die Verhältnisse bei der Verwendung von Astrablau. Das K. wird durch das Astrablau angefärbt, so daß ein positiver Ausfall der Astrablaufärbung keine Rückschlüsse über etwa vorliegende saure Mukopolysaccharide gestattet. Die Affinität des K. zu kolloidalen Eisenhydroxydlösungen bedarf einer gesonderten Betrachtung. Zellen, in denen noch K. vorhanden ist, färben sich bei der Behandlung mit kolloidalem Eisen folgenden Berliner Blau-Reaktion blau an, wobei allerdings häufiger das K. nur in Form einer

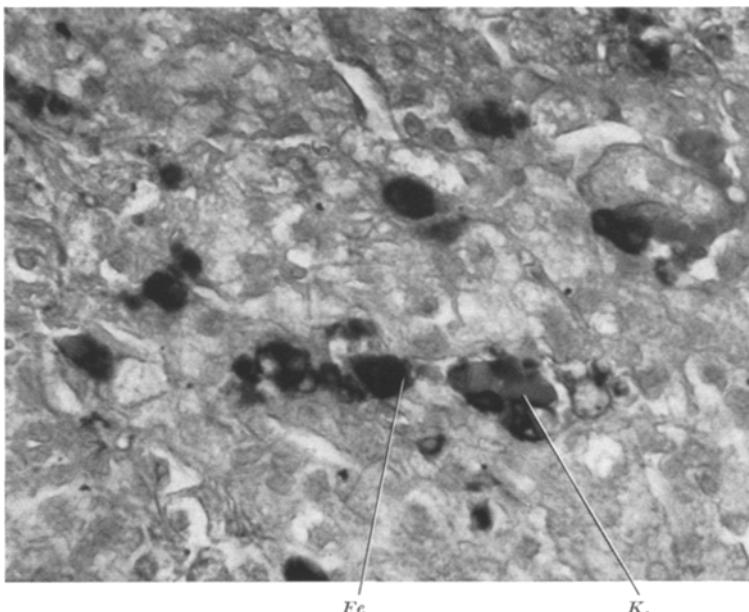


Abb. 1. Nebenniere. Hund H. K.-Speicherung 2 Jahre nach K.-Infusion. Kolloidale Eisenfärbung nach HALE. Kernechtrot. Vergr. 525mal. K. durch Kernechtrot angefärbt umgeben von eisenpositiver Hülle; an anderen Stellen direkt mit Eisen (Fe) beladen

Hülle als diffus angefärbt erscheint. Diese Hülle entsprechen weitgehend den Eisenhüllen, die man bei der Berliner Blau-Reaktion um ältere K.-Ablagerungen erkennt. Die Eisenbindungsreaktion ist daher, ebenso wie die Astrablaufärbung, für die histochemische Beurteilung der untersuchten Zellen nur von geringem Wert. Es bleibt allerdings die Frage zu erörtern, ob die eisenpositiven Hüllen um K.-Ablagerungen nur auf einer Affinität des K. zum kolloidalen Eisenhydroxyd besteht, oder ob noch andere Stoffe anwesend sind, die für den positiven Ausfall dieser Reaktion zusätzlich verantwortlich zu machen sind. Die eisenpositive Hülle wies keine Eigenfarbe auf (Abb. 1).

Ergebnisse

Alte K.-Ablagerungen. Es handelt sich hier um die Fälle, bei denen die vorausgegangene K.-Gabe länger als $\frac{1}{2}$ Jahr zurücklag. Das K. liegt in den Histiozyten der Subcutis bei diesen alten Ablagerungen in länglichen Zellen mit längsovalen Kernen. Die Zellen sind des öfteren zu Zellgruppen angeordnet. In ihrem Cytoplasma finden sich zahlreiche verschieden große Körnchen von K., die sowohl nach Spezialfixierung mit Ammoniumsulfat wie auch im Paraffinschnitt gut nachweisbar sind. Das Cytoplasma einzelner Zellen ist nur mit wenigen oder nur mit einer einzigen großen K.-Kugel völlig angefüllt. Ein Herauslösen des K. aus den Zellen ist nicht möglich. In der Leber sieht man das K. außer in mäßig

zahlreichen Kupfferschen Sternzellen in großen, bis zu $35\text{ }\mu$ großen blasigen Gebilden, die manchmal in der Nähe der Glissonschen Felder, häufiger aber auch innerhalb der Läppchen liegen. In diesen Gebilden sind oft mehrere Kerne, aber keine sicheren Zellgrenzen zu erkennen. Die Kerne liegen oft randständig. Es läßt sich also nur schwer entscheiden, ob es sich um mehrkernige Riesenzellen oder aber um zahlreiche dicht zusammenliegende zusammengesinterte k.-beladene Einzelzellen handelt. Es finden sich in diesen Gebilden größere und kleinere Vacuolen, die meist schon im Paraffinschnitt eine eindeutige K.-Färbung geben. Sie sind häufig von der erwähnten eisenpositiven Hülle umgeben. Bisweilen erscheint das K. auch aus den Vacuolen herausgelöst, diese erscheinen dann optisch leer. Ähnliche Speichergebilde sieht man in den Lymphknoten. Je nach dem untersuchten Organ ist der Ausfall der Eisenreaktion verschieden. Schon BARNER wies darauf hin, daß in der Niere dem K. kein Eisen angelagert ist, selbst dann nicht, wenn man es vorher zusammen mit einer kolloidalen Eisenlösung injiziert hat. Auch wir konnten in der Niere, der Nebenniere und im Herzmuskel nur sehr wenig oder gar kein Eisen an das K. angelagert finden, während es an den Ablagerungen in Leber, Milz und Lymphknoten reichlich vorhanden war. Wir möchten uns der Meinung von BARNER anschließen, daß das im Blute zirkulierende Eisen bereits im RES abgefangen wird, ehe es z. B. in der Niere mit dem K. reagieren könnte. Diese alten Ablagerungen geben eine positive PAS-Reaktion, und zwar ist in selteneren Fällen die ganze k.-haltige Vacuole PAS-positiv, oder häufiger findet sich um die K.-Vacuolen ein PAS-positiver Saum. Der positive Ausfall der PAS-Reaktion ist durch vorangehende Acetylierung zu unterdrücken, er tritt nach Verseifung mit KOH wieder in Erscheinung. Der Ausfall der PAS-Reaktion wird durch Vorbehandlung der Schnitte mit Diastase nicht beeinflußt. Die Methylenblaubindung liegt in den speichernden Zellen und den größeren Speichergebilden bei p_H 3,6—4,0; sie verschiebt sich nach Vorbehandlung mit Hyaluronidase auf p_H 4,6. Eine Affinität der betroffenen Zellen zum Toluidinblau kann ebenfalls festgestellt werden; sie werden blau angefärbt. Eine Metachromasie konnte nur einmal, und zwar in der Leber des untersuchten Hundes, festgestellt werden. Eine positive Astrablaureaktion ist ebenfalls festzustellen. Bei der Eisenbindungsreaktion nach HALE, der eine Entfernung des im Gewebe vorhandenen Eisens vorangeht, sind die Ablagerungen selten diffus, häufig in der Art der oben beschriebenen Eisenhülle eisenpositiv. Mit Sudan III war gelegentlich eine schwache Anfärbung der Ablagerungen festzustellen, während die Färbung mit Sudanschwarz deutlich positiv ausfiel. Die Anordnung der sudanophilen Substanz entsprach der bei der PAS-Reaktion oben beschriebenen. Die Perameisensäure-Schiff-Reaktion verlief negativ. Beim Nachweis von Eiweißstoffen war die Millon-Reaktion in den k.-beladenen Zellens schwach positiv. Die Tetrazoniumreaktion fiel deutlich positiv aus, und zwar sowohl in den Einzelzellen als auch in den größeren K.-Ablagerungen in der Leber. Diese Reaktion konnte durch vorherige Benzoylierung unterdrückt werden. Bei der Hämatoxylin-Eosinfärbung waren die Ablagerungen blaßblau bis taubenblau anzufärben, was auf die von uns früher beschriebene Affinität des K. zum Hämatoxylin zurückzuführen ist. (Das Eosin wird ebenfalls vom K. adsorptiv gebunden, jedoch vom Hämatoxylin überdeckt.) Bei der van Gieson-Färbung waren die Ablagerungen schmutzig-gelb-grau (Abb. 2—5).

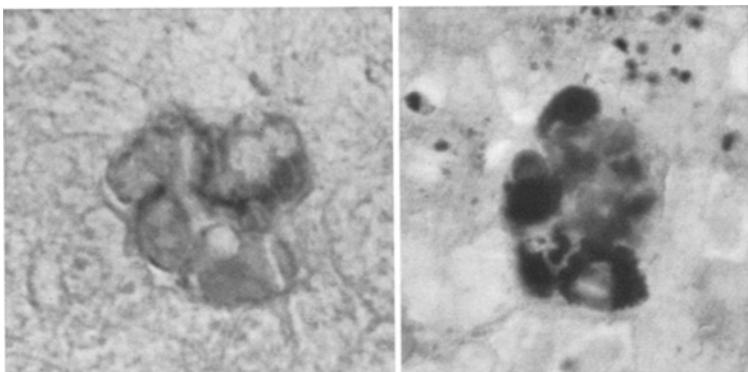


Abb. 2

Abb. 3

Abb. 2. Leber. Hund H. Großvacuoläre K.-Speicherung zwischen den Leberzellbalken 2 Jahre nach K.-Infusion. PAS-Färbung. Vergr. 870mal. PAS-positive Substanz umhüllt die K.-Vacuolen

Abb. 3. Leber. Hund H. Großvacuoläre K.-Speicherung zwischen den Leberzellbalken 2 Jahre nach K.-Infusion. Sudanschwarz. Vergr. 870mal. Lipoide in der Umgebung der K.-Vacuolen

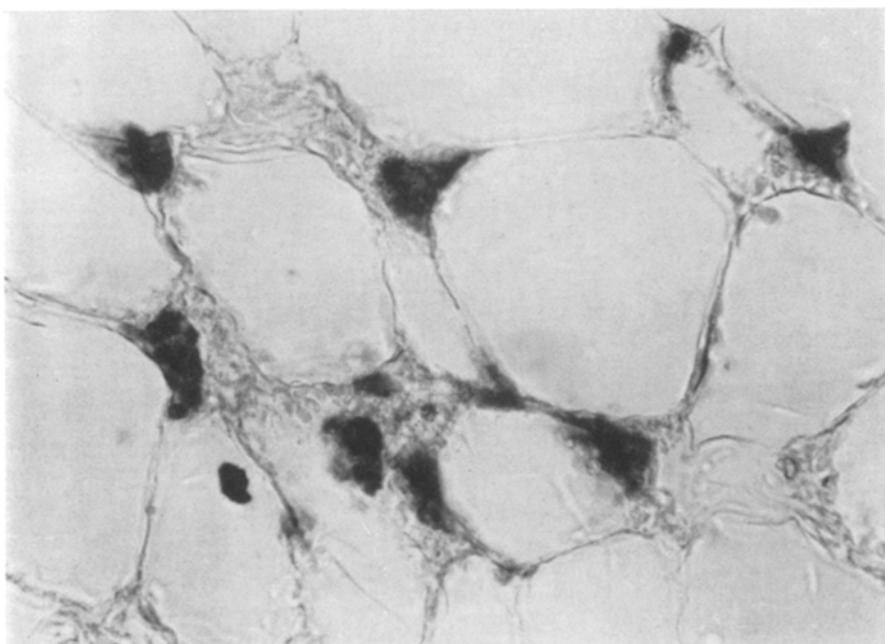


Abb. 4. Pararenales Fettgewebe. Ratte 118. 656 Tage nach der letzten K.-Injektion intraperitoneal. PAS-Färbung. Vergr. 525mal. K.-Ablagerung in den Makrophagen umgeben von PAS-positiver Substanz

Histochemische Untersuchungen zur formalen Genese der K.-Ablagerungen.
Bei der Untersuchung jüngerer K.-Ablagerungen ergibt sich folgendes Bild: 14 Std nach der Injektion finden sich in den zahlreichen speichernden Histiozyten des subcutanen Bindegewebes viele runde bis $2\text{ }\mu$ große Vacuolen, die nur den Kernbereich freilassen. Das Erscheinungsbild der Zellen ist bei lokaler Injektion dasselbe wie bei intravenöser oder intraperitonealer Injektion. Ebenso

ergeben sich keine Unterschiede zwischen den Speicherzellen der Subcutis und denen im Interstitium der parenchymatösen Organe, sowie den Kupfferschen Sternzellen der Leber oder den Reticulumzellen der Milz und der Lymphknoten. Die Zellen zeigen eine schwach positive PAS-Reaktion, und zwar ist die PAS-färbunggebende Substanz in Form von kleinen Körnchen oder diffus zwischen den Vacuolen angeordnet. Die Vacuolen, aus denen das K. herausgelöst ist, sind dagegen PAS-negativ. Die PAS-Reaktion war durch Acetylierung zu unterdrücken, nach Verseifung trat sie wieder auf. Die Tetrazoniumreaktion zeigt eine tiefrotbraune diffuse Anfärbung des nicht von Vacuolen eingenommenen

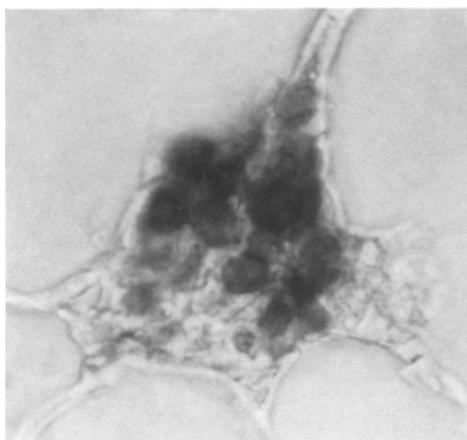


Abb. 5

Abb. 5. Pararenales Fettgewebe. Ratte 118. 656 Tage nach der letzten intraperitonealen K.-Injektion PAS-Färbung. Vergr. 2100mal. Makrophage mit zahlreichen von PAS-positiver Substanz umgebenen K.-Vacuolen

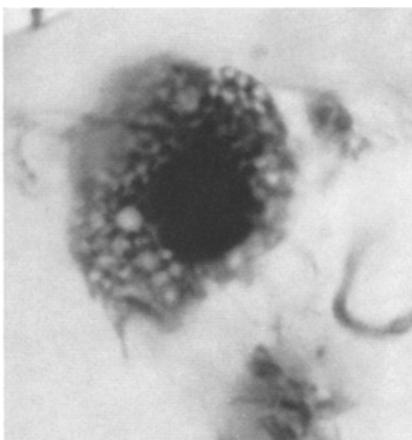


Abb. 6

Abb. 6. Makrophage im subcutanen Bindegewebe, Maus P4. 91 Tage nach subcutaner Injektion von K. Tetrazoniumreaktion. Vergr. 2100mal. Die Proteine sind in der Umgebung der K.-Vacuolen nachweisbar

Cytoplasmas. Die Methylenblaubindung liegt in diesen Zellen bei p_H 6,5. Alle anderen histochemischen Reaktionen verlaufen negativ.

Nach einer Woche hatte sich das morphologische Bild der einzelnen k.-speichernden Zellen nicht geändert. Die PAS-Reaktion war stärker positiv geworden, und ließ ebenso wie vorher die Bezirke, die die Vacuolen einnahmen, frei. Die Methylenblaubindung war geringfügig bis auf p_H 5,9 abgesunken, die übrigen Reaktionen waren weiterhin negativ bei unveränderter Tetrazoniumreaktion. Nach etwa 3 Wochen trat erstmalig eine geringe Sudanophilie auf, die sich ebenfalls auf das vacuolenfreie Cytoplasma der Speicherzellen beschränkte. Nach etwa 2 Monaten war die Sudanschwarz-Reaktion stärker positiv bei etwa gleich stark gebliebener PAS-Reaktion. Die Säurebindung lag nun bei p_H 4,5. Nach etwa 3—4 Monaten konnte erstmalig die oben beschriebene großvacuolige K.-Ablagerung in der Leber beobachtet werden. Dabei ließ sich das K. im Paraffinschnitt noch zum Teil nachweisen, während es an anderen Vacuolen herausgelöst war. An diesen Gebilden konnte jetzt erstmalig die mehrfach beobachtete eisenpositive Hülle nachgewiesen werden. Bei gleicher Stärke der Sudanophilie und

der PAS-Reaktion war jetzt eine Methylenblaubindung bei p_H 4,1 festzustellen. Mit Toluidinblau ließen sich die Ablagerungen in der Leber ebenso wie in den speichernden Zellen der anderen Organe leicht anfärben. Eine Metachromasie konnte nicht beobachtet werden. Die Tetrazoniumreaktion zeigte in den K.-Ablagerungen eine diffuse positive Reaktion, die manchmal um die K.-Kugeln in den Speichergebilden in der Leber besonders intensiv ausfiel. Sie war, ebenso wie an allen anderen Fällen, durch vorherige Benzoylierung zu unterdrücken. Ähnliches konnte man in den k.-speichernden Histiocyten der Subcutis beobachten, bei denen zu diesem Zeitpunkt die K.-Vacuolen häufig zu einigen wenigen größeren Bläschen zusammengeflossen waren. Mit diesen Befunden haben wir den zeitlichen Anschluß zu den oben erhobenen Befunden an alten K.-Ablagerungen gefunden (Abb. 6).

Besprechung

Wir können nach unseren Untersuchungen feststellen, daß bei der Speicherung des K. sich in den stoffaufnehmenden Zellen verschiedene organische Substanzen histochemisch feststellen lassen. Der positive Ausfall der Tetrazoniumreaktion deutet darauf hin, daß sich in den speichernden Zellen Proteine finden. Wenn auch diese Reaktion nur auf das Vorhandensein von Tyrosin, Histidin und Tryptophan hinweist, so kann unter Berücksichtigung der Tatsache, daß diese Aminosäuren im paraffineingebetteten Material herausgelöst sind, geschlossen werden, daß diese Aminosäuren in Form von Proteinen vorliegen. Das Unterdrücken des positiven Reaktionsausfalls durch vorhergehende Benzoylierung deutet darauf hin, daß der positive Ausfall nicht durch andere Stoffe (purin- oder pyrimidinhaltige Substanzen) hervorgerufen wird (PEARSE). Bereits kurze Zeit nach der K.-Aufnahme kann in den Zellen eine deutlich positive PAS-Reaktion festgestellt werden. Diese wird durch eine Vorbehandlung der Schnitte mit Diastase nicht unterdrückt, sie kann durch vorhergehende Acetylierung gehemmt und nachfolgende Verseifung wieder hervorgerufen werden. Diese positive PAS-Reaktion wird durch Glykole und nicht durch Aminoalkohole oder Äthylengruppen hervorgerufen [Literatur bei GEDIGK (1, 2)]. Die nachgewiesenen polysaccharidhaltigen Stoffe dürften der Gruppe der Glyko- oder Mucoproteine zuzurechnen sein, wenn es sich nicht um Mucopolysaccharide handelt. An älteren K.-Ablagerungen ist durch die Sudanschwarz-Reaktion das Vorliegen von Lipiden feststellbar. Ferner lassen die älteren und besonders die ältesten beobachteten cellulären K.-Ablagerungen eine mäßig starke Basophilie erkennen. Die Methylenblaubindung liegt bei p_H 4,0 und verschiebt sich nach Vorbehandlung der Schnitte mit Hyaluronidase auf p_H 4,6. Bei der Frage, welche Stoffe für die saure Reaktion der organischen Substanzen, die wir histochemisch nachgewiesen haben, verantwortlich sind, kann es sich zunächst sowohl um saure Mucopolysaccharide wie auch um saure Lipide handeln. Ein Hinweis für das Vorliegen saurer Mucopolysaccharide könnte der (wenn auch nicht sehr ausgeprägte) Einfluß der Hyaluronidase-Einwirkung auf die Basophilie sein. Die sonst zum Nachweis saurer Mucopolysaccharide herangezogenen histochemischen Methoden ergaben bei unseren Untersuchungen keine verlässlichen Resultate. Die K.-Ablagerungen zeigten zwar eine Affinität zum Toluidinblau, ließen jedoch keine Metachromasie erkennen. Die Färbung mit Astrablau verlief bei alten Ablagerungen positiv; wir haben aber schon weiter oben darauf hingewiesen, daß das K. eine deutliche

Affinität zum Astrablau besitzt, und die untersuchten alten Ablagerungen noch häufig K. enthalten. Die gleichen Verhältnisse finden wir bei der Eisenbindungsreaktion nach HALE. Die K.-Ablagerungen ließen sich zwar im Bereich ihrer Hülle, bisweilen auch im Bereich der ganzen Vacuole mit Eisen beladen; man kann aber nicht mit Sicherheit aussagen, ob dies auf der Affinität der organischen Substanzen zum kolloidalen Eisen beruht, und damit das Vorhandensein saurer Mucopolysaccharide anzeigt, oder ob es sich nur um die Affinität des nicht völlig aus dem Schnitt herausgelösten K. zum kolloidalen Eisen handelt. Das Auftreten der Basophilie fällt zeitlich etwa mit der beginnenden Nachweisbarkeit der Lipide zusammen. Es könnte dies als Hinweis darauf gewertet werden, daß die Basophilie durch saure Lipide hervorgerufen wird. Da sich das Lipoïd nicht aus dem Schnitt herauslösen läßt — dieselbe Feststellung traf übrigens GEDIGK (3, 5—8) bei der Untersuchung der Trägersubstanz der Schwermetallpigmente — kann eine Prüfung der Basophilie am fettfreien Schnitt nicht erfolgen, wodurch möglicherweise eine weitere Differenzierung ermöglicht würde. Nach unseren vorliegenden Untersuchungen kann also eine definitive Entscheidung darüber, ob die Basophilie der Träger- und Hüllsubstanzen in unserem Falle auf dem Vorliegen saurer Mucopolysaccharide oder saurer Lipoide beruht, nicht getroffen werden. Über den zeitlichen Ablauf im Auftreten der nachgewiesenen organischen Substanzen in den k.-speichernden Zellen kann folgendes ausgesagt werden:

Es lassen sich in den speichernden Zellen zu jedem untersuchten Zeitpunkt Eiweißstoffe nachweisen. Bereits einen Tag nach der Verabreichung des K. treten Polysaccharide in der speichernden Zelle auf; die Intensität der dies anzeigenigen PAS-Reaktion hat nach 2—3 Wochen ihren Höhepunkt erreicht. Sie ist in gleicher Stärke auch in den alten Ablagerungen zu erkennen. Im Laufe von Wochen kommt es dann zusätzlich zum Auftreten von Lipoiden und zu einer zunehmenden Basophilie in den speichernden Zellen. Über die Herkunft der organischen Substanzen kann folgendes ausgesagt werden: Wir fanden keine Anhaltspunkte dafür, daß die beobachteten Stoffe in der Umgebung der Zellen entstehen und dann in diese eingebaut werden. Auch besteht kein Anlaß anzunehmen, daß die beobachteten Substanzen in der nachgewiesenen Form mit dem K. in die Zelle eingeschleust werden könnten, nachdem SCHOLTAN darauf hingewiesen hat, daß das K. zwar eine große Anzahl niedermolekularer Stoffe adsorbiert, daß aber eine Bindung höher molekularer Stoffe, z. B. von Eiweißen, nicht erfolgt.

Im folgenden sollen unsere Untersuchungsergebnisse mit den Befunden verglichen werden, die von GEDIGK u. Mitarb. (3—8) bei der Ablagerung von Hämosiderin, von anderen Schwermetallpigmenten und von Siliciumdioxyd-derivaten erhoben wurden. GEDIGK stellte fest, daß das Hämosiderin in der Zelle nach Entfernen des Eisenbestandteils durch Salzsäureeinwirkung einen organischen Bestandteil zurückläßt, der seiner Meinung nach aus Proteinen, Lipoiden und vor allem aus Polysacchariden besteht. Er glaubt, die vorgefundenen Polysaccharide als Mucopolysaccharide ansprechen zu können, und zwar wegen der Basophilie der Trägersubstanz in älteren Schwermetallablagerungen als saure Mucopolysaccharide. Diesen von ihm als organische „Trägersubstanz“ angesprochenen eisenfreien Restkörper des Eisenpigmentes (bzw. den schwermetallfreien Restkörper von anderen Schwermetallablagerungen) konnte er genau

an den Stellen in der Zelle lokalisieren, an denen er zuvor am gleichen Schnitt das Eisenpigment nachgewiesen hatte. Die schwermetallfreie Trägersubstanz ließ sich erneut mit jeweils anderen Schwermetallen beladen. Ähnliche organische Substanzen wies er auch nach Injektion von Siliciumdioxydderivaten und Quarzstaub nach. Größere Schwermetall- oder Quarzeinschlüsse in der Zelle waren häufig von einer Hülle umgeben, die in ihrer Zusammensetzung der beschriebenen Trägersubstanz entsprach. Die Trägersubstanz bildete sich um so rascher, je kleiner die zugeführten Stoffpartikel waren, sie war am frühesten nach Verarbeitung kolloidalen Lösungen zu erkennen. GEDIGK nimmt an, daß die neugebildete Trägersubstanz die zugeführten basischen Schwermetallverbindungen bindet, sozusagen „neutralisiert“, und die sauren Siliciumdioxydderivate in Form von Esterbildung in gleicher Weise „unschädlich“ für die Zelle und ihren Stoffwechsel macht. Er betrachtet die „Bildung von Mucopolysacchariden bei der Verarbeitung schwer resorbierbarer Fremdkörper als eine Art Abwehrleistung der ortständigen Mesenchymzellen“.

Mit diesen Befunden stimmen unsere Untersuchungsergebnisse in einigen Punkten überein: Auch in den k.-speichernden Zellen finden wir Polysaccharide, Proteine und Lipide. In alten Ablagerungen zeigt sich zudem eine mäßig ausgeprägte Basophilie. Eine Metachromasie können wir, ebenso wie GEDIGK, nicht feststellen (GEDIGK nahm an, daß bei seinem Material die Vorbehandlung mit Salzsäure die Metachromasie unterdrücke). Die organischen Substanzen treten in unserem Material rascher auf. Dies hängt möglicherweise mit dem relativ niedrigen Molekulargewicht des K. (etwa 30000) zusammen. Die von uns beobachtete Basophilie ist schwächer als bei GEDIGKS Befunden, ist aber ebenfalls durch Vorbehandlung mit Hyaluronidase zu beeinflussen. Der wichtigste Unterschied, den wir feststellen konnten, scheint uns aber die Tatsache zu sein, daß wir die organischen Substanzen bei frischer Speicherung und älteren Ablagerungen nur selten an dem Ort lokalisieren konnten, an dem das K. nachweisbar war. Sie traten dagegen fast immer in der Umgebung des aufgenommenen Fremdstoffes auf, und umgaben frische und alte Ablagerungen in Form einer Hüllsubstanz. Dies Verhalten sah GEDIGK nur bei großen und amorphen Stoffpartikeln.

Versuchen wir nun die Besonderheiten zu erklären, die sich bei der Bildung organischer Substanzen in k.-speichernden Zellen im Gegensatz zu den bei der Ablagerung von Schwermetallen und Kiesel säurederivaten entstehenden Trägersubstanz ergeben, so ist folgendes anzunehmen: Das K. ist im Vergleich zu den eben genannten Stoffen ein relativ indifferentes Kolloid mit verhältnismäßig kleinem Molekulargewicht. Es wird bei lokaler Applikation ebenso wie bei intravenöser Injektion in den Speicherzellen zahlreicher Organe rasch in tropfiger Form aufgenommen. Die Aufnahme des K. und seine vacuolare Aussonderung in der Zelle erfolgt innerhalb weniger Stunden. Das indifferenten und fast neutral reagierende K., das zudem im Stoffwechsel der Zelle weder verarbeitet noch abgebaut werden kann, wirkt in dieser wie ein relativ harmloser Fremdkörper. Diese „Fremdkörpervacuolen“ werden allmählich von der Zelle mit den von uns nachgewiesenen neugebildeten organischen Stoffen umgeben. Es treten zuerst Proteine und Polysaccharide auf, wobei letztere Muco- oder Glykoproteine oder auch Mucopolysaccharide sein können. Diese Stoffe können wir als „Hüllsubstanz“ (im Gegensatz zu dem von GEDIGK geprägten Begriff „Trägersubstanz“)

bezeichnen. Die später zu beobachtende Basophilie ist wegen der „Harmlosigkeit“ des Fremdstoffes geringer als z. B. bei gespeicherten Schwermetallverbündungen. Eine „Neutralisierung“ als Schutzwirkung im Sinne von GEDIGK ist nicht erforderlich. Immerhin halten wir es für bemerkenswert, daß bei der Speicherung eines weitgehend indifferenten neutralen organischen Kolloids in den stoffaufnehmenden Zellen eine ähnliche Neubildung organischer Substanzen auftritt, wie sie auch bei der Bildung von Schwermetallpigmenten nach der Injektion basischer Schwermetallösungen und bei der Applikation von sauer reagierenden Kieselsäurederivaten zu beobachten ist. Diese Stoffe zeigen bei der histochemischen Differenzierung eine große Ähnlichkeit. Morphologische und histochemische Unterschiede lassen sich wie folgt erklären:

Bildet das aufgenommene Kolloid für die Zelle lediglich einen indifferenten Fremdkörper, so wird sie diesen mit der neugebildeten Substanz umhüllen. Bedroht der aufgenommene Stoff durch seine chemische Eigenart zusätzlich die Integrität der Zelle, so werden die neugebildeten Stoffe in einer Weise modifiziert, daß die schädigenden Einflüsse des gespeicherten Fremdstoffes „neutralisiert“ werden. Der in die Zelle aufgenommene Stoff wird an die „Trägersubstanz“ gebunden, wobei es sich unseres Erachtens eher um eine gegenseitige Adsorption zweier Kolloide, als um eine echte chemische Bindung handelt.

Zusammenfassung

In kollidonspeichernden Zellen lassen sich im Tierversuch und beim Menschen organische Stoffe histochemisch nachweisen (Proteine, Polysaccharide und Lipide). Diese Substanzen umgeben das in die Zelle aufgenommene Kollidon in der Art einer Hülle. Bereits kurze Zeit nach der Injektion des Kollidons sind in den speichernden Zellen die Polysaccharide und Proteine nachweisbar, während die Lipidophilie frühestens nach 3 Wochen, die Basophilie erst nach etwa 2 bis 3 Monaten festgestellt werden kann. Diese organischen Substanzen unterscheiden sich histochemisch nicht wesentlich von der „Trägersubstanz“, die GEDIGK u. Mitarb. (3—8) nach Injektion von kolloiden Schwermetallösungen und Siliciumdioxydderivaten beobachten konnten. Dagegen können wir bei der Kollidonspeicherung Besonderheiten in der morphologischen Anordnung dieser Stoffe feststellen.

Wir können die Feststellung von GEDIGK (3), daß der Bildung einer Trägersubstanz „eine allgemeine (unspezifische) Zellreaktion bei der Speicherung nicht resorbierbarer anorganischer Fremdkörper zugrunde liegt“ durch unsere Untersuchungen bestätigen, und insofern erweitern, als daß auch organische, chemisch indifferenten Kolloide die Bildung ähnlicher organischer Substanzen hervorrufen.

Summary

Proteins, carbohydrates and lipids have been demonstrated with histochemical techniques in collidon storing cells in animals and in man. The collidon is surrounded by these substances in a capsule-like manner. The proteins and polysaccharides are demonstrable shortly after the injection of the collidon. The lipids do not appear before three weeks whereas basophilia appears in about 2—3 months. Histochemically there is no essential difference between these substances and the “carrier-substance” which GEDIGK et al. observed after the

injection of colloidal solutions of heavy metals and SiO_2 derivatives. A difference with collidon, however, was observed; we were able to detect particular features in the morphological arrangement of these substances. Our own experimentation has confirmed GEDIGK's idea that the formation of the carrier-substance is due to a nonspecific generalized cell reaction brought about by the intercellular storing of non-absorbable inorganic foreign bodies. We have broadened GEDIGK's concept by showing that colloids which are chemically indifferent organic substances can also give rise to organic compounds similar to the carrier-substance.

Literatur

- BARNER, F. R.: Über Eisen- und Periston-(Kollidon-)Speicherung. *Z. ges. inn. Med.* **7**, 1074 (1952). — FRESEN, O., u. H. WEESE: Das gewebliche Bild nach Infusion verschiedener Kollidonfraktionen (Periston N, Periston, hochviskoses Periston) beim Tier. *Beitr. path. Anat.* **112**, 44 (1952). — GEDIGK, P.: (1) Histochemische Darstellung von Kohlenhydraten. *Klin. Wschr.* **30**, 1057 (1952). — (2) Histochemische Methoden. In H. M. RAUEN, Biochemisches Taschenbuch. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1956. — (3) Die funktionelle Bedeutung des Eisenpigmentes. *Ergebn. allg. Path. path. Anat.* **1958**, 1. — GEDIGK, P., u. W. PROCH: (4) Über die Bildung von organischen Substanzen in Siliciumdioxydgranulomen. *Virchows Arch. path. Anat.* **328**, 513 (1956). — (5) Über die Speicherung von Schwermetallverbindungen in mesenchymalen Geweben. *Beitr. path. Anat.* **116**, 124 (1956). — GEDIGK, P., u. G. STRAUSS: (6) Zur Histochemie des Hämosiderins. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **37**, 240 (1953). — (7) Zur Histochemie des Hämosiderins. *Virchows Arch. path. Anat.* **324**, 373 (1953). — (8) Zur formalen Genese der Eisenpigmente. *Virchows Arch. path. Anat.* **326**, 172 (1954). — HEINLEIN, H., u. G. HÜBNER: Nachweis des Periston in Blut, Harn und Gewebe. *Beitr. path. Anat.* **119**, 301 (1958). — HÜBNER, G.: Morphologische und histochemische Untersuchungen zur Kollidonausscheidung durch die Nieren. *Beitr. path. Anat.* **122**, 106 (1960). — HÜSSELMANN, H.: Speicherungerscheinungen beim Menschen nach Periston. *Klin. Wschr.* **1952**, 801. — JANCSÓ, N.: Speicherung, Stoffanreicherung im Retikuloendothel und in der Niere. Budapest: Akadémiai Kiadó 1955. — JECKELN, E.: Über gewebliche Äußerungen des Säuglingsorganismus nach wiederholten Peristongaben. *Virchows Arch. path. Anat.* **322**, 529 (1952). — PEARSE, H. G. E.: Histochemistry, theoretical and applied. London 1953. — SCHÖN, H.: Organveränderungen beim Säugling nach Zufuhr von Periston. *Klin. Wschr.* **1949**, 463. — SCHOLTAN, W.: Über die Adsorptionsfähigkeit wasserlöslicher polymerer Verbindungen, insbesondere von Polyvinylpyrrolidon. *Makromolekulare Chemie* **11**, 131 (1953).

Dr. G. HÜBNER, Pathologisches Institut der Universität Köln
Köln-Lindenthal, Josef-Stelzmann-Str. 9