

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Würzburg
(Direktor: Prof. Dr. H.-W. ALTMANN)

Über Mucopolysaccharide in der normalen Aorta und im Aortentransplantat des Hundes *

Von

H. CAIN und H. PFOB

Mit 9 Textabbildungen, davon 5 farbigen

(Eingegangen am 15. August 1961)

Im letzten Jahrzehnt haben Transplantationen am Gefäß-System zunehmende Bedeutung erlangt. Bei ihrer Entwicklung ist die moderne chirurgische Technik der biologischen Grundlagenforschung weit vorausgeeilt. Zwar hat die Histologie gezeigt, daß der Eingliederungsprozeß eines Pflanzstückes oft genug nicht nur zu dessen narbiger Substitution führt, sondern unter Umständen ein wohl differenziertes Ersatzgewebe hervorbringt, das funktionell erstaunlich hochwertig ist. Doch fehlt bis heute eine Klärung der zugrunde liegenden biochemischen Mechanismen. Daher haben wir versucht, die Neubildungsvorgänge am homologen und Kunststoff-Implantat der Aorta von der histochemischen und biochemischen Seite her unter dem Blickpunkt der Wundheilung näher zu analysieren. Besonders interessiert die Beteiligung der Mucopolysaccharide. Zudem erscheint das Arterientransplantat als günstiges Studienobjekt für das noch nicht restlos geklärte Zusammenspiel von Zellen, Grundsubstanzen und Fasern im wachsenden Bindegewebe überhaupt und speziell in verschiedenen alten und unterschiedlich hochwertigen bindegewebigen Ersatzstrukturen. Somit erhält unsere Fragestellung einen vorwiegend allgemeinbiologischen bzw. allgemeinpathologischen Akzent. Um die bei der Wundheilung in bunter Vielfalt auftretenden gestaltlichen und chemischen Befunde besser zu verstehen, wollen wir von den Verhältnissen an der normalen Aorta ausgehen.

Untersuchungsgut

Das Material verdanken wir der Liebenswürdigkeit von Herrn Priv.-Doz. Dr. G. CARSTENSEN (Chir. Univ.-Klinik Würzburg, Direktor: Prof. Dr. W. WACHSMUTH). An über 60 Hunden wurde in Intubationsnarkose ein Ersatz der Aorta abdominalis durchgeführt. Er erstreckte sich mitunter vom Nierenarterienabgang bis zur Trifurkation. Teilweise wurden homologe Segmente und teilweise Teflonprothesen implantiert. Die homologen Pflanzstücke waren bis zu ihrer operativen Verwendung meist mehrere Monate in dem schnell härtenden Kunststoff Palacos gelagert worden. Diese Konservierungsmethode (CARSTENSEN, CAIN u. CARSTENSEN) beruht auf dem von der Natur her bekannten Prinzip des Einschlusses von Insekten in Bernstein¹. Bisher haben wir 40 Tiere mit Überlebenszeiten von wenigen Tagen bis zu 2 Jahren nach Operation untersuchen können. Die übrigen Hunde leben noch und befinden sich in gutem Allgemeinzustand.

* Ein Teil der Ergebnisse dieser Untersuchungen wurde am 8. 6. 61 vor der Physico-Medica in Würzburg kurz vorgetragen.

¹ Das Einbettungsmittel Palacos wurde uns dankenswerterweise von der Fa. Kulzer & Co in Bad Homburg zur Verfügung gestellt.

Methodik

I. Akridinorange-Fluorochromierungen

Nativschnitte (20μ) aus dem Aortentransplantat und aus der normalen Empfänger-aorta wurden mit dem basischen Akridinorange (AO) gefärbt.

Farblösungen: AO stand. Bayer oder AO Chromagesellschaft zu 0,01 in 100 cm^3 Mc Ilvaine-Gemisch (PEARSE), pH 4,0, gelöst. Verwendung der Lösung nach 24stündigem Stehen bei Zimmertemperatur. Färbedauer 15 min. Auswaschen des überschüssigen Farbstoffs in farbfreier Pufferlösung, 10—20 min. Eindecken in Pufferlösung, sofortige Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop von Zeiss in Verbindung mit einem Quecksilber-Höchstdruckbrenner Osram H BO 200. Erregerfilter an der Leuchte: I und II, BG 12, $2 \times 3\text{ mm}$; Sperrfilter am Okular: obere Filterscheibe II, OG 4, untere Filterscheibe I, GG 4.

Alle Fluoreszenzbilder wurden auf Agfa-Color CK 20 aufgenommen. Belichtungszeiten: ohne Kondensorhilfslinse 40—80 sec, mit Kondensorhilfslinse 1—4 sec. Contax am Tragarm über dem Mikroskop, Photookular 9fach.

II. Chemische Untersuchungen

Um zu prüfen, welche Gewebssubstanzen der Aorta in qualitativer und quantitativer Hinsicht das Substrat der Gelb- bis Rot-Fluoreszenz darstellen, wurden unfixierte Nativschnitte (30μ) aus dem Transplantatbereich und von der Empfänger-Aorta zunächst einer Bebrütung mit gereinigter Ribonuklease und Hyaluronidase unterzogen¹.

1. Die RN-ase-Verdauung der Schnitte erfolgte in luftdicht abschließbaren Probegläsern bei 37°C und erstreckte sich über verschieden lange Zeiten (s. Abb. 4 und 5).

Zur Kontrolle der RN-ase-Wirkung wurde jedesmal auch ein Blindversuch angesetzt.

Enzymproben: 4,9 ml Phosphatpuffer von pH 7,0, 0,2 M; 0,1 ml 0,1%iger wäßriger Ribonuklease-Lösung; 10 Gefrierschnitte.

Mit dem Zeiss-Photometer haben wir die Extinktion jedes Überstandes bei $260\text{ m}\mu$ und bei $280\text{ m}\mu$ im UV-Licht gemessen. Damit wurden die Nucleinsäurespaltprodukte quantitativ erfaßt. Die Schnitte selbst wurden anschließend mit AO gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch beurteilt.

2. Hyaluronidase-Verdauung von Nativschnitten aus dem Transplantat und von der Empfänger-Aorta (Testeshyaluronidase „Kinetin“, Schering AG-Berlin), pH -Optimum 6,0, Temperaturoptimum 50°C .

Lösungen für die Verdauung:

a) „Gesäuertes Protein“ — eine 0,7%ige Lösung von Rinderserumalbumin in 0,5 M Acetatpuffer von pH 4,2 wird mit 4 n HCl versetzt, bis ein pH von 3,1 erreicht ist.

Die Lösung wird in 5 ml-Portionen 30 min lang im siedenden Wasserbad erhitzt, dann gekühlt und eingefroren. Vor Gebrauch wird sie aufgetaut und 1:4 mit Acetatpuffer (0,5 M; pH 4,2) verdünnt. Ist die Lösung nicht klar, muß sie durch ein dichtes Mullfilter geschickt und gereinigt werden.

b) Enzymlösung. 3 TRU „Kinetin“ werden gelöst pro 1 ml eines 0,1 M Acetatpuffers von pH 6,0 mit 0,15 M NaCl (= 0,1 MAP).

Nach ausgedehnten Vorversuchen konnte für die Verdauung verschieden lange „eingehelter“ allo- und homoioplastischer Aortentransplantate folgende Methodik als brauchbar ermittelt werden:

Pro Zeitprobe wurden in einem Verdauungsgefäß angesetzt: 2 ml Enzymlösung bzw. für die Blindprobe 2 ml 0,1 MAP und 5 native Gefrierschnitte von etwa 3 cm Länge, 30μ Dicke und einem Gewicht von je 5—6 mg.

Bebrütung bei 50°C in luftdicht abgeschlossenen Gläsern (zur Vermeidung von Verdunstungen).

Danach AO-Fluorochromierung der Schnitte.

¹ Das Fermentpräparat Ribonuklease (A. Armour Lot 381059, chromatographisch gereinigt) wurde uns freundlicherweise von Herrn Dr. GUNDLACH, Physiologisch-chemisches Institut der Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt, wofür wir ihm herzlich danken.

Die überstehenden Lösungen wurden nach der Bebrütung mit je 3 ml ges. Protein versetzt und anschließend durch 2 Lagen Mull filtriert.

Extinktion bei 350 und 400 $m\mu$ (Glascuvetten).

Außerdem nephelometrische Untersuchungen am Zeiss-Pulfrich-Photometer mit dem Filter L 1 (wirksamer Filterschwerpunkt bei 6150 Å; Durchlässigkeit am Filterschwerpunkt 85%) gegen das Vergleichsglas 4 in Reagenzgläsern mit 14 mm innerem Durchmesser.

3. Hexuronsäure-Nachweis nach Z. DISCHE. Hierfür wurde von den Überständen 1 cm^3 Lösung entnommen. Dieser Lösung werden 6 cm^3 konz. H_2SO_4 unter Kühlung in Leitungswasser zugegeben. Erhitzen der Reaktionsmischung für 20 min in kochendem Wasserbad. Dann Kühlung in Leitungswasser. Zugabe von 0,2 cm^3 einer 0,1%igen alkoholischen Carbazollösung. Bei Vorhandensein von Hexuronsäuren purpurrote Färbung. Hexosen führen dagegen zu braunroter Färbung. Die gefärbten Reaktionsprodukte zeigen ein Absorptionsmaximum bei 535 $m\mu$.

Anschließend Extinktionsbestimmungen der Überstände mit dem Beckman Ratio Recording Spectrophotometer (Scanning Time 1, Scale Expansion 1 \times , Range 0—1, Sensitivity 0/50).

4. $CaCl_2$ -Extraktion von Nativschnitten aus dem Transplantatbereich. Von jeder untersuchten Aorta wurden jeweils 200 Gefrierschnitte (30 μ) mit 50 cm^3 $CaCl_2$ -Lösung mindestens 3 Tage lang inkubiert. Dialysieren der Extrakte gegen Aqua bidest., anschließend Lyophilisieren.

a) *Hexosaminbestimmung nach ELSON-MORGAN* in der Modifikation von BOAS. Etwa 5 mg Extrakt werden in 0,5 ml 5N HCl 4 Std lang bei 100° C im Trockenschrank hydrolysiert. Auffüllen der Hydrolysate auf 5 ml, Reinigen mit Aktivkohle. Je 1 ml der Probe und der Testansätze werden mit 4 n NaOH gegen Phenolphthalein alkalisch gemacht (bis zur Rotfärbung) und mit 0,5 n HCl bis zur Entfärbung angesäuert. Zugabe von 1 ml Acetylaceton, Verschuß der Reagenzgläser, 45 min bei 90° C im Wasserbad erhitzen. Nach Abkühlen 2,5 ml Äthanol und nach Mischen (Luftstrom) 1 ml Ehrlichs Reagens einfüllen. Nochmals Mischen, dann Volumen bis zur Marke 10 ml auffüllen mit Äthanol. 1—2 Std nach Zugabe des Aldehydreagens wird die optische Dichte im Photometer ELKO mit Filter 53 abgelesen.

b) *Carbazol-Reaktion der Extrakte mit anschließender Extinktion* der Lösung im ELKO (Filter 53).

c) *Orcin-Reaktion* zur Erfassung von Hexosen und Glucuronsäure. Messung im ELKO (Filter 42). 2 ml der Test- bzw. der zu untersuchenden Lösung werden mit 2,0 ml Orcin-Schwefelsäure-Reagens und 15 ml Reaktionsschwefelsäure (im Eisbad) versetzt, mit Luftstrom gemischt und genau 15 min im Dunkeln in ein Wasserbad von 80° C gestellt. 10 min Kühlung in Eiswasser. Nach 15 min Stehenlassen bei Zimmertemperatur Messen gegen Leerwert im ELKO.

Beobachtungen

1. Histologische und fluoreszenzmikroskopische Befunde. In der Aorta abdominalis gesunder Hunde sind für gewöhnlich nur geringe Mengen an sauren MPS mit Alcianblau, Toluidin- und Methylenblau interfibrillär erkennbar. In AO-gefärbten Nativschnitten lassen sich die kollagenen und besonders die elastischen Fasern durch eine charakteristische blaßgelb-grünliche Fluoreszenz eindrucksvoll darstellen (Abb. 1a). Zwischen den Fasern sind regelmäßig, besonders im inneren Drittel der Aortenwand, mehr oder minder reichliche rot fluoreszierende Substanzen wahrzunehmen. Dabei ist die Rotfluoreszenz fast immer im subendothelialen Bereich der Langhansschen Zellen am stärksten. Demgegenüber ändert sich die Intensität der Farbstoff-Bindung zu den äußeren Schichten der Media hin insofern, als hier interfibrillär eine Orange- bis Gelb-Fluoreszenz vorherrscht. Die Zellkerne zeichnen sich im unfixierten Präparat durch gelblich-grüne Farbe, im fixierten dagegen durch rote Fluoreszenz aus.

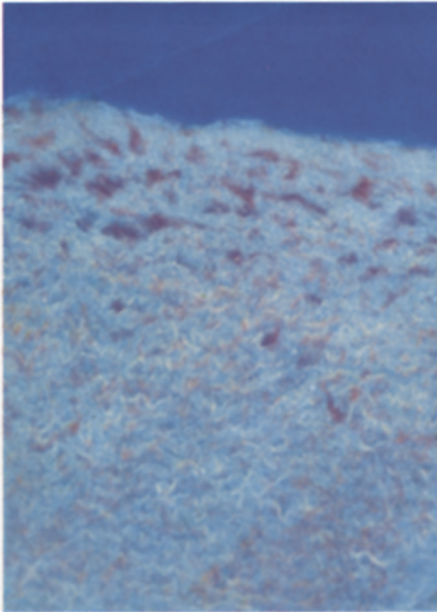


Abb. 1a

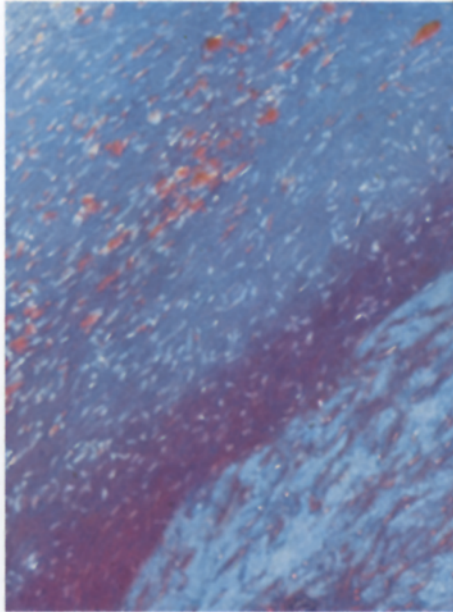


Abb. 1b

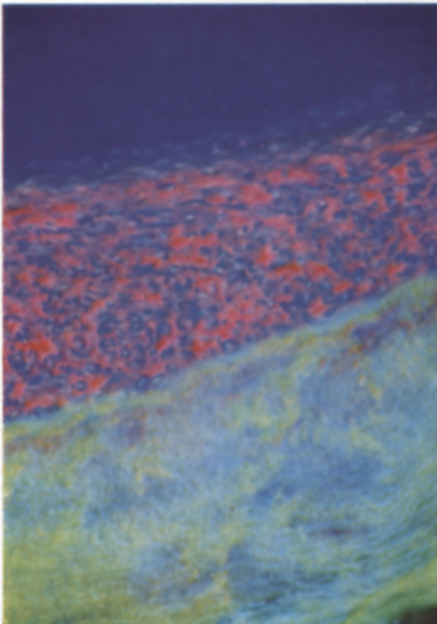


Abb. 1c

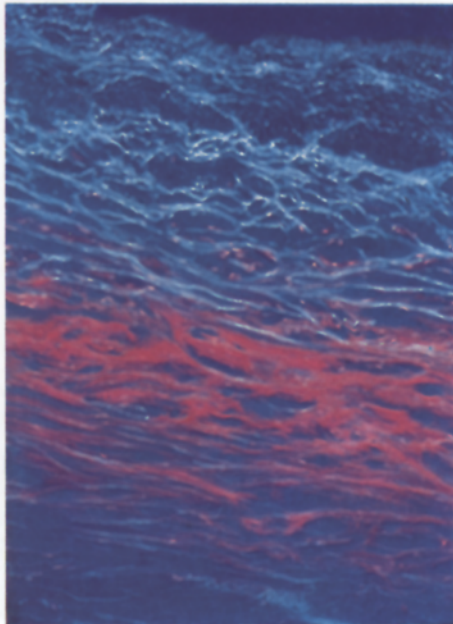


Abb. 1d

Abb. 1a—d. a Normale Bauchaorta (Hund). Saure MPS teils rot, teils orange, elastische Fasern blaßgelbgrünlich fluoreszierend. Nativer Gefrierschnitt, Acridinorange. b Aus der Neointima eines 4 Wochen alten homologen Aortentransplantats (H. 17). An sauren MPS reiche Fibroblasten mit rot fluoreszierendem Cytoplasma (im Bild oben) und hellgrünen Kernen. Freie intercelluläre saure MPS (untere Bildhälfte) und in Organisation begriffenes Fibrin (blaugrünlich). Nativer Gefrierschnitt, Acridinorange. c Homologes Aortentransplantat. Junger Mesenchymschwamm an der Innenseite, teils im Stadium der intracellulären MPS-Synthese, teils nach Abgabe saurer MPS in den extracellulären Raum. Im Bild unten die langsam untergehende alte Media des Implantats. Nativer Gefrierschnitt, Acridinorange. d 3 Monate nach Implantation eines homologen, in Palacos konservierten Bauchaorten-segments (H. 3). oben: zerfallende Implantat-Media (innere lumennahe Anteile); unten: Ersatz der äußeren Mediabezirke durch eindringendes Granulationsgewebe, das reich an sauren MPS

Alle Aortentransplantate zeigen nun ein vom Normalbild abweichendes und auch ein unter sich — je nach ihrer Überlebensdauer — recht differentes Verhalten. Bereits 2—3 Tage nach Verpflanzung homologer Segmente und Teflonprothesen läßt sich an deren Innen- und Außenseite eine ziemlich kräftige Fibrinschicht feststellen. Sie bildet in der Folgezeit eine Art Matrix für die sich entwickelnde Neo-Intima und Neo-Adventitia. Dabei entsteht zuerst eine oft mehrschichtige neue Endothellage. In der 2. Woche nach Operation treten dann auch in den tieferen Bezirken des bläulich fluorescierenden Fibrinfilms zahlreiche geschwollene Fibroblasten auf, deren Kerne fluoreszenzoptisch gelb-grün erscheinen (Abb. 1b). Perinucleär sieht man in zunehmendem Maße purpurrot fluorescierende Substanzen, die sich später bis an die Zellperipherie ausdehnen. Sie haben z. T. körnigen Charakter, z. T. mehr diffus-homogene Form. Offenbar handelt es sich bei den Zellen mit homogen rot leuchtendem Cytoplasma aber doch nur um eine Scheinhomogenität, vorgetäuscht durch besonders dichte Lagerung vieler einzelner Granula. Gleichzeitig setzen an der Transplantataußenseite lebhaft mesenchymale Proliferationen ein, die starke Aktivität von alkalischer Phosphatase und Phosphoamidase zeigen. Die alte Intima und die alte Adventitia homoioplastischer Implantate gehen schnell zugrunde. Dabei werden zahlreiche mit der PAS-Methode darstellbare Substanzen herausgelöst. Am Ende des 1. Monats ist schließlich bei artgleichen Pflanzstücken vom transplantierten Gewebe nur noch die ursprüngliche Media vorhanden, deren jetzt dicht aneinandergerückte und zusammengesinterte elastische Fasern intensiv grün fluorescieren. Die Rotfluoreszenz der neuen Innen- und Außenschicht ist bald nicht mehr allein an cytoplasmatische Strukturen gebunden. Im Stadium der verstärkten Zellproliferation läßt sie sich genauso im extracellulären Raum feststellen (Abb. 1c). Deshalb imponieren Neo-Intima und Neo-Adventitia jetzt als fast homogene AO-positive Schichten. Im Verlauf des 2. Monats entwickeln sich innerhalb dieser diffus rot leuchtenden extracellulären Stoffe feinste Fibrillen, die z. T. büschelförmige Anordnung und hellgelb-grünliche Fluoreszenz zeigen (Abb. 2). Etwa zur gleichen Zeit fällt eine erneute Anreicherung PAS-positiver Stoffe in dem jungen Mesenchymschwamm auf. Während die PAS-Reaktion bei zunehmender Fibrillogenese noch etwas länger erhöht bleibt, tritt die initiale Rotfluoreszenz mehr und mehr zurück. In 3—5 Monate alten Transplantaten überwiegen in der Neo-Intima und Neo-Adventitia wohlgeordnete Faserstrukturen, so daß sich das Fluoreszenzbild wieder dem einer normalen Arterienintima nähert. Auch nimmt mit zunehmendem Alter der neuen Wand die Phosphatase- und Phosphoamidaseaktivität wieder ab.

In den meisten homoioplastischen Transplantaten von 3—20 Monate Überlebenszeit finden wir partielle Substitution der alten, nur recht langsam in Form granulären Zerfalls untergehenden *Elastica* der Media. Interessanterweise ist die bindegewebige Durchwachsung der äußeren Mediaschichten von der Neo-Adventitia aus ein regelmäßiges Vorkommen in allen Transplantaten (Abb. 1d). Dagegen ist eine Substitution gleichzeitig auch von der Neo-Intima her nur in einigen Fällen erfolgt (Abb. 3a u. b). Der elastische Grenzstreifen, fluoreszenzoptisch als echte breite Lamelle hervortretend, scheint hier ein beträchtliches Hindernis zu bilden. Bei den Tieren mit Teflon-Prothesen haben sich die Innen- und Außenschicht in der Regel wesentlich eher durch die Kunststoffporen hindurch zu einer

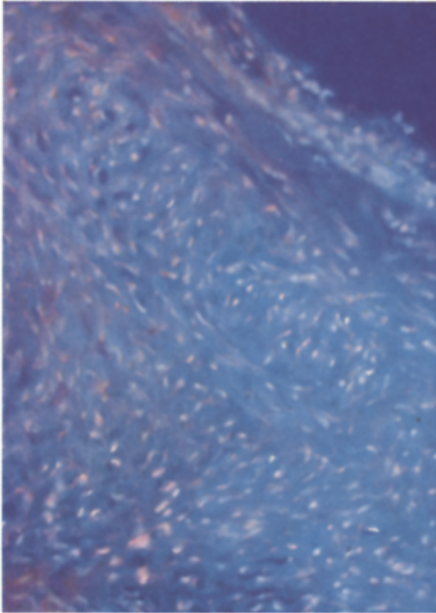


Abb. 2a

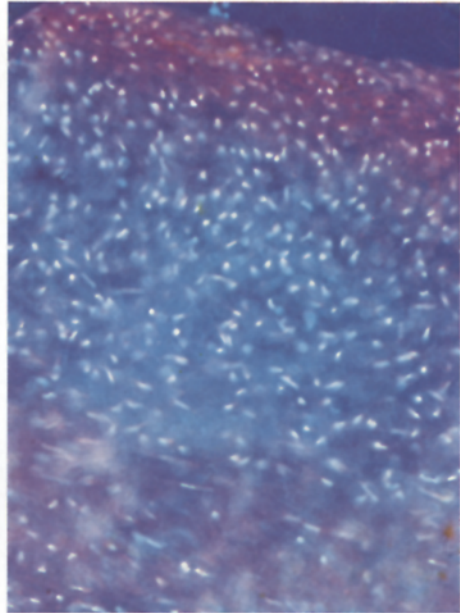


Abb. 2b

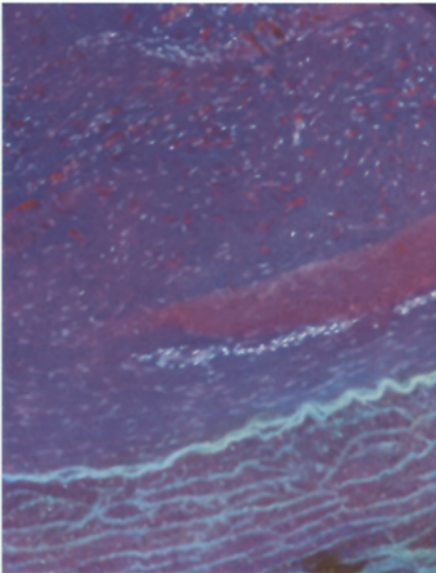


Abb. 3a

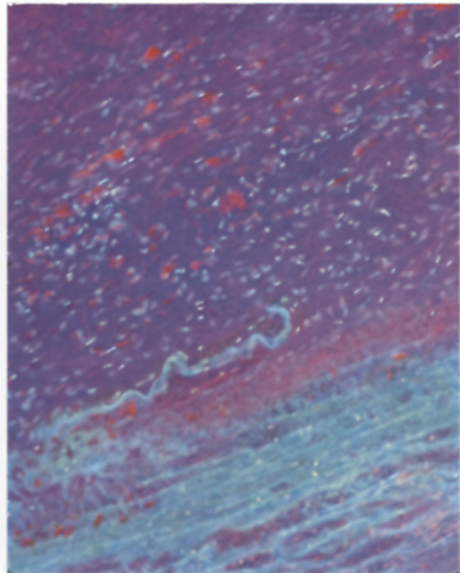


Abb. 3b

Abb. 2a u. b. a Neo-Intima über Teflon-Prothese 2 Monate nach Implantation. b 2 Monate alte Neo-Intima eines homologen Implantats. Native Gefrierschnitte, Acridinorange

Abb. 3a u. b. Drei Monate altes homologes Implantat. Kräftige Neo-Intima, Substitution der alten Media. a Erhaltener elastischer Grenzstreifen, b Ersatz der untergehenden Transplantat-Media von der Neo-Intima aus nach Läsion der Elastica interna

neuen Wand vereinigt. Im Spätstadium — dazu rechnen wir in unseren Versuchen Überlebenszeiten von über 1 Jahr — sehen wir nun bei mehreren Tieren in der neuen Wand, und zwar vorwiegend in der Umgebung der proximalen und distalen Nahtstelle, Intimabeete, die durch Anreicherung metachromatischer und

AO-positiver Stoffe charakterisiert sind. Gar nicht selten bestehen Beziehungen solcher Herde zu Verkalkungsprozessen. Andere Bezirke fallen fluoreszenz-

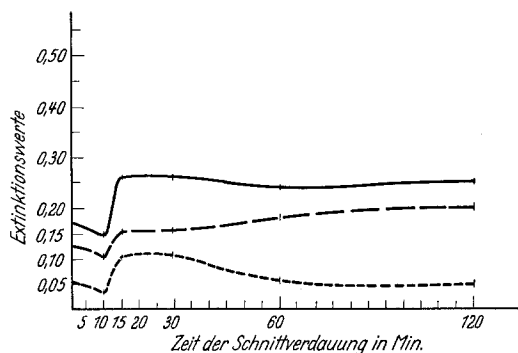


Abb. 4. RN-ase-Verdauung einer normalen Aorta abdominalis (gesunder Hund). — Enzymprobe; — — Blindprobe; ··· Differenz

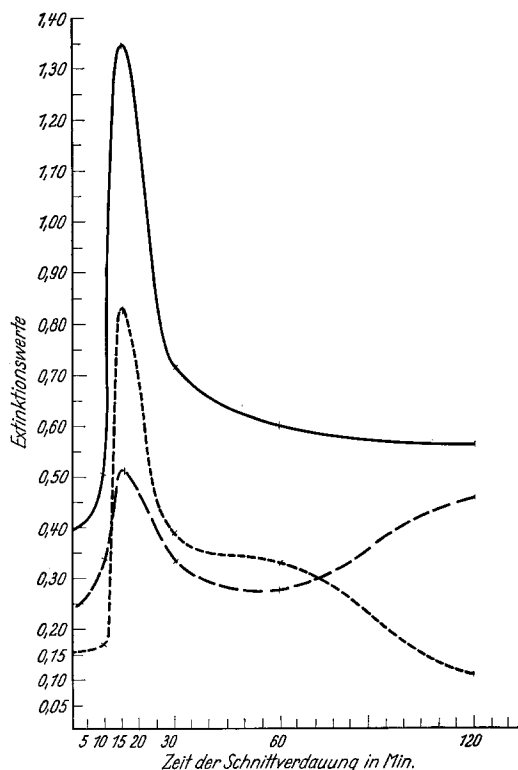


Abb. 5. RN-ase-Verdauung eines homologen Aorten transplantats (3 1/2 Monate Überlebenszeit) — Enzymprobe; — — Blindprobe; ··· Differenz

mikroskopisch durch eine mehr kleinfleckige hellrote oder braunrote Tüpfelung auf. Sie erweisen sich bei stärkerer Vergrößerung als Mastzellenansammlungen mit dichtgepackten AO-positiven Granula. Nur relativ selten sind in der alten Transplantat-Media, soweit sie nicht durch junges Bindegewebe ersetzt ist, freie rot-orange oder gelb fluoreszierende Einlagerungen vorhanden. Bei 5 Tieren fanden sich schließlich Verknoorpelungszonen in allen Stadien, von beginnender vesiculöser Auflockerung mesenchymaler Zellen bis zur Ausbildung fertigen Faserknorpels, der sich nach Acridinorange-Behandlung im UV-Licht purpurrot darstellt.

2. Chemische Untersuchungen an Nativschnitten von normalen Aorten und Aortentransplantaten. Auf Grund bekannter Befunde, theoretischer Überlegungen und des Vergleichs mit den übrigen histochemischen Methoden müssen für eine chemische Bindung des basischen AO saure Valenzen im nativen Aortengewebe angenommen werden. Wenn es auch von vornherein nicht wahrscheinlich war, daß dabei den Nucleinsäuren die Hauptrolle zufällt, so blieb doch mit chemischen Methoden zu belegen, welche Substanzen in den Aortentransplantaten dem beschriebenen Fluoreszenzeffekt zugrunde liegen und warum dieser in den verschiedenen alten Pflanzstücken so starken Schwankungen in der Farbskala zwischen Grün und Rot unterworfen ist.

a) Das Ergebnis der *Ribonuklease-Verdauung* nativer Schnitte zeigen die graphischen Darstellungen (Abb. 4 u. 5). Sie wurden aus einer Vielzahl im Prin-

zip gleichartiger Kurven als Beispiel ausgewählt. Man muß bei der Beurteilung der Kurven 2 Vorgänge berücksichtigen, zunächst die Herauslösung des Substrats aus den Schnitten und dann den enzymatischen Substratabbau. Übereinstimmend zeigen die Extinktionen, daß beide Vorgänge fast ausschließlich innerhalb der ersten Stunden ablaufen. Konstant ergibt sich in den ersten 5—15 min ein ausgeprägtes Maximum. Daß dies an der normalen Bauchaorta nicht so stark

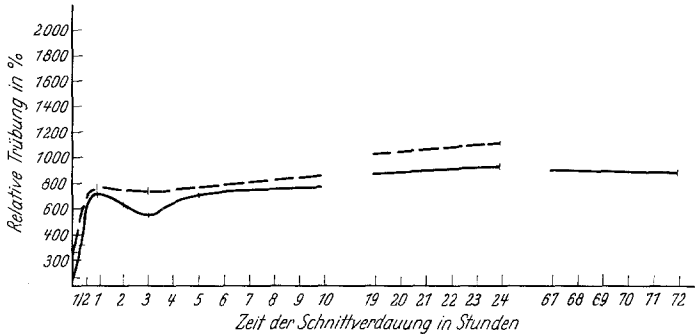


Abb. 6. Hyaluronidase-Verdauung einer normalen Aorta abdominalis (gesunder Hund)
— Enzymprobe; --- Blindprobe

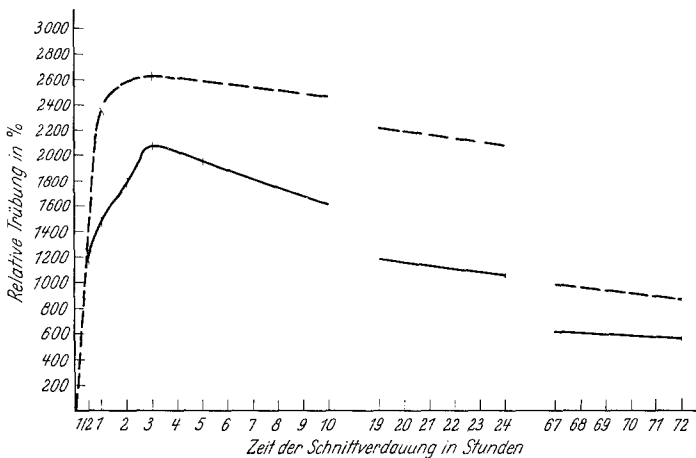


Abb. 7. Hyaluronidase-Verdauung der neuen Wand um eine Teflon-Prothese nach 5 Wochen Überlebenszeit. — Enzymprobe; --- Blindprobe

hervortritt, muß offensichtlich auf deren geringeren Gehalt an Nucleinsäuren zurückgeführt werden. Wurden nun die Schnitte im Anschluß an die Fermentverdauung mit AO gefärbt, so ließ sich, selbst nach 24 Std langer Bebrütung, gegenüber unbehandelten Ausgangspräparaten von der gleichen Transplantatstelle nur eine geringe Abnahme der Rotfluoreszenz beobachten. Das heißt also, daß Nucleinsäuren für die Rotfluoreszenz der Aorta praktisch keine Rolle spielen.

b) Die Hyaluronidase-Verdauung von Schnitten aus der Empfängeraorta und aus verschiedenen alten Transplantaten ist in den Abb. 6 u. 7 dargestellt. Die Verdauung erfolgte im p_H - und Temp.-Optimum des Ferments. Dementsprechend kommt die Wirkung des Enzyms vor allem als eines substrataufspaltenden Agens deutlich zum Ausdruck. Wenn auch die aus der Messung der Fermentproben ermittelten

Tabelle. Ergebnisse der Hexosamin-, Carbazol- und Orcin-Reaktionen nach CaCl_2 -Extraktion von Nativschnitten verschieden alter Aortenimplantate

| T = Transplantat NA = normale Aorta abdom. des gleichen Tieres | 1 Monat (alloplast.) | | 3 Monate (homoioplast.) | | 4 Monate (alloplast.) | | 9 Monate (homoioplast.) | | 12 Monate (homoioplast.) | |
|--|-------------------------|-------|----------------------------|----|--------------------------|-------|----------------------------|----|-----------------------------|-------|
| | T | NA | T | NA | T | NA | T | NA | T | NA |
| Zahl der extrahierten Schnitte. . . . | 200 | 230 | 200 | — | 300 | 250 | 200 | — | 190 | 150 |
| Gesamtmenge — Extrakt in mg . . . | 51,75 | 23,92 | 56,91 | — | 48,00 | 5,82 | 67,54 | — | 37,96 | 3,80 |
| Extraktmenge in mg/200 Schnitte . . | 51,75 | 20,84 | 56,91 | — | 32,00 | 4,66 | 67,54 | — | 39,96 | 5,07 |
| Hexosamingehalt in % | 1,066 | 1,043 | 0,946 | — | 0,439 | 0,377 | 0,301 | — | 0,546 | 0,132 |
| Uronsäure in % (Carbazolreaktion) . . | 1,13 | 0,94 | 1,14 | — | 0,55 | — | 0,53 | — | 0,56 | — |
| Hexosen + Hexuronsäure in % (Orcinreaktion) | 10,7 | 11,6 | 11,1 | — | 4,6 | — | 6,5 | — | 6,5 | — |

Werte nur Ausdruck für die Differenz zweier Vorgänge sind, so ist aus dem Vergleich mit den bei den Blindproben gewonnenen Trübungswerten doch zu sehen, daß das Enzym Hyaluronidase ein für sich spezifisches Substrat vorfand, an dem es seine Wirkung entfalten konnte. Das belegen denn auch die nach der Bebrütung mit AO gefärbten Schnitte. Bereits nach 30 min sind die den Farbstoff bindenden Substanzen zum großen Teil und nach 2 Std vollständig herausgelöst (Abb. 8a u. b). Wie zu erwarten, nimmt die Rot-Fluoreszenz in Schnitten, die zur Blindprobe verwendet wurden, wesentlich langsamer ab.

Diese Versuchsreihe beweist klar, daß in der Aorta und im Aortentransplantat saure MPS die zur AO-Bindung notwendigen Gruppen liefern.

c) Bei der Ausführung des Hexuronsäure-Nachweises (nach Z. DISCHE) am Überstand bebrüteter Gewebsschnitte ließen sich saure MPS aufbauende Disaccharideinheiten zunächst an einem Farbumschlag der Reaktionslösung in Purpurrot erkennen. Allerdings trat bei einer größeren Versuchszahl bereits nach dem Kochen mit Säure eine gewisse rotbraune Komponente auf, die beweist, daß auch Hexosen und offenbar auch Pentosen in den Überständen zu finden sind. Das muß als Hinweis auf das Mitvorhandensein neutraler MPS in unseren Transplantaten gelten. Das durch Hexuronsäuren hervorgerufene Purpurrot läßt sich — im Gegensatz zu anderen Sacchariden — durch Zufügen von 2 cm³ Aqua bidest. in wenigen Sekunden zum Verschwinden bringen. Sind dagegen Cystein und Glutathion in der Lösung bzw. im Überstand, so steigert sich die Hexuronsäure-Farbindensität beträchtlich und die der Hexosen und Pentosen sogar in noch stärkerem Grade.

Die Carbazolreaktion kann zwar nicht als absolut spezifisch nur für Hexuronsäuren gelten. Dennoch gibt sie uns, bei jedem Zeitwert unter genau gleichen Bedingungen ausgeführt und eine qualitativ ähnliche Zusammensetzung der Überstände vorausgesetzt, vergleichbare quantitative Aufschlüsse über die aus den Aorten herauslösbaren uronsäurehaltigen Mucopolysaccharidsäuren.

d) Bei Anwendung von Extraktionsverfahren, wie der von uns durchgeführten CaCl_2 -Extraktion,

verliert man zwar die Möglichkeit topographischer Aussagen. Dafür arbeitet man aber mit größeren Mengen und kann so einen noch besseren Eindruck über die qualitativen und quantitativen Verhältnisse gewinnen. Nach Umrechnung der Ergebnisse in Prozent, jeweils bezogen auf den dialysierten und lyophilisierten Extrakt, ergibt sich folgendes: Die Transplantate weisen einen höheren Hexosamingehalt auf als die jeweils zugehörigen Empfängerarterien. Daß die Differenz nicht in jedem Fall gleich groß ist, hat eine Ursache darin, daß in der Nachbarschaft des Transplantates auch über der Intima des Empfängergefäßes noch eine MPS-reiche Auflage neugebildeten Bindegewebes vorhanden ist. Die Neo-Intima ist eben nicht ausschließlich auf den Transplantatbezirk beschränkt. Vielmehr schiebt sie sich von der Empfängerarteria her über die Nahtstellen auf das Pflanzstück vor.

Vergleicht man die aus verschiedenen alten Transplantaten erhaltenen Hexosaminwerte untereinander, so ergibt sich in den ersten Wochen nach Operation ein hoher MPS-Gehalt. Im weiteren Verlauf der Einheilung fällt dieser aber verhältnismäßig rasch wieder ab. Das steht in voller Übereinstimmung mit den histochemischen und fluoreszenzmikroskopischen Befunden. Bei der Beurteilung der Hexosaminwerte muß natürlich die gewonnene Extraktmenge in mg pro 200 Schnitte mitberücksichtigt werden, die einmal durch die insgesamt extrahierbare Substanzmenge, zum anderen durch den Grad der Reinigung bei der Dialyse gegeben ist.

Die Tabelle gibt die Ergebnisse der an den Extrakten durchgeführten Hexosamin-, Carbazol- und Orcin-Reaktionen wieder. Der Differenzwert der Carbazol- und Orcin-Reaktion beinhaltet die Menge neutraler MPS, ferner die uronsäurefreie Keratosulfatfraktion und anderweitig auftretende Hexosen, wie z. B. Moleküle, welche die Brücke zwischen den einzelnen Einheiten der Kollagenfaserbündel bilden.

Erörterungen

Betrachtet man zunächst rein die Morphologie unserer Fluoreszenzbefunde, so fällt schon an der normalen Aorta gesunder Tiere eine individuelle Schwankungsbreite hinsichtlich der Intensität des metachromatischen Effektes auf. Dessen ganze bunte Vielfalt tritt aber erst — jetzt allerdings in fast verwirrendem Ausmaß — bei einer Gegenüberstellung der Bilder am Empfängergefäß und am Transplantat in Erscheinung. Selbst der Vergleich der Implantate untereinander ergibt beträchtliche Differenzen im morphologischen Aspekt. Dennoch kehren bestimmte Phänomene, aller Vielfalt zum Trotz, mit solcher Regelmäßigkeit wieder, daß sie ohne weiteres als Ausdruck bestimmter Funktionszustände des Gefäßgewebes — sei es im Rahmen des physiologischen Erhaltungsstoffwechsels, sei es im Ablauf reparativer Wundheilungsvorgänge oder im Zusammenhang mit regressiven Prozessen — gedeutet werden können. Freilich bedarf es einer Klärung und Ordnung der topographischen, histogenetischen und biochemischen Beziehungen zwischen Zellen, Grundsubstanzen und Fasern.

I. Die Fluoreszenz-Phänomene als stoffwechselbiologisches Äquivalentbild in der normalen Aorta

Unsere vergleichenden Enzymverdauungen und chemischen Befunde zeigen, daß neben der von STRUGGER betonten Bindung der Farbstoffkationen an das



Abb. 8 a



Abb. 8 b

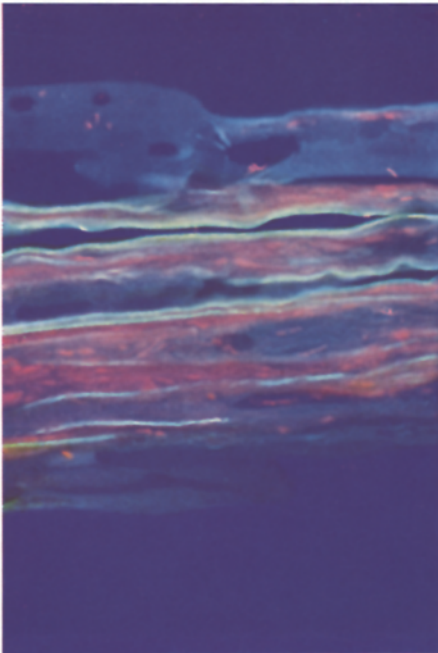


Abb. 9 a

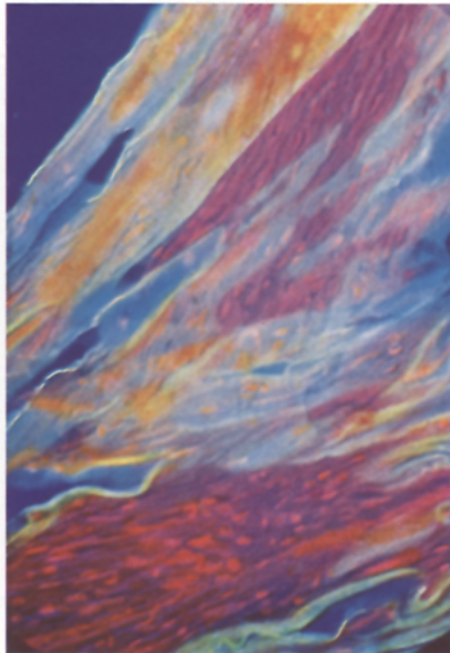


Abb. 9 b

Abb. 8 a u. b. Hyaluronidase-Verdauung eines nativen Gefrierschnittes (homologes Aortentransplantat, Palacos-Konserve). a 15 min bebrütet, weitgehender Schwund von AO-positiven Granula, die vor der Enzymverdauung in großer Menge vorhanden, b 1 Std bebrütet, völliger Schwund der AO-Granula in Neo-Intima und Neo-Adventitia

Abb. 9 a u. b. Aus dem Wundrandgebiet eines homologen Aorten-Implantats. a Starke Quellung und Auflockerung sowie teilweise Zerfall von Fasern. Eindringen von Fibrin (blau). Reichliche saure MPS (orange bis rot) innerhalb gelockerter Fasern (Bildmitte) und um die Fasern. b Gelb, orange und rot fluoreszierende saure MPS zwischen auseinandergedrängten Fasern der Media. Kurze Formalinfixierung, Acridinorange

Eiweißmicellargerüst für den Mehrfarbeneffekt des Acridinorange an der Aorta bestimmte chemische Substrate im Gewebe eine Rolle spielen (vgl. GÖSSNER, SCHÜMMELFEDER, ZEIGER u. Mitarb., v. BERTALANFFY, STOCKINGER u. a.). Zunächst einmal bedeuten die 2 Farbextreme in der Aorta — nämlich die blasse Gelb-Grün-Fluoreszenz der Fasern und die intensive Rotfärbung der Langhansschen Zellen — eine nur geringe Menge zur Farbstoffbindung befähigter Substanzen in den ausgereiften elastischen und kollagenen Fasern und demgegenüber eine große Substratmenge in den Langhansschen Zellen. Die interstitielle Gelb- bis Orange-Fluoreszenz nimmt gewissermaßen eine Mittelstellung zwischen diesen beiden Extremen ein. Sie wechselt in ihrer Quantität und Qualität und verringert sich mit einem zentrifugalen Gradienten zur Adventitia hin. Die chemischen Analysen belegen, daß *die Rottönung der Aortenwand an das Vorhandensein von sauren MPS gebunden* ist, freilich ohne daß wir deren 8 verschiedene Typen fluoreszenzoptisch zu differenzieren in der Lage sind. Demgegenüber spielen in der normalen Arterienwand Nucleinsäuren für die Farbstoffbindung nur eine geringe, untergeordnete Rolle.

In stoffwechselbiologischer Hinsicht besagen die Befunde, daß die *Synthese der arteriellen sauren MPS normalerweise vor allem in der Langhansschen Zellschicht* erfolgt. Von hier aus setzt ihr *Weitertransport in adventitieller Richtung* ein. Die dabei regelmäßig zu beobachtende stetige Abnahme des AO-Bindungsvermögens muß zwar in der Hauptsache als quantitatives Phänomen gewertet werden. Dennoch wäre denkbar, daß die freien MPS bei ihrem Transport und beim Einbau in das Arterienwandgefüge auch eine Änderung in ihrem chemischen Verhalten durchmachen, die ihrerseits zumindest Teilursache der abnehmenden Rotfluoreszenz sein könnte. Diese Annahme findet eine gewisse Stütze in Beobachtungen an der Empfängeraorta nahe der Vernähungsstelle mit dem Implantat, also in einem Gebiet, das durch die Operation bzw. durch die hier herrschenden Wundverhältnisse alteriert ist. Man sieht hier zwischen mehr oder minder stark geschlängelten Fasern eine intensive Gelb-, Orange- und Rotfluoreszenz neu auftreten (vgl. Abb. 9), die vorher nicht erkennbar war und die wir als Ausdruck einer Lockerung des normalen Fasergefüges mit Lösung von Grund- und Kittsubstanzen deuten möchten (KROMPECHER, SCHALLOCK). Die Farbdifferenzen sind u. E. vom jeweiligen Erhaltungsgrad und dem damit zusammenhängenden Poly- bzw. Depolymerisierungszustand der Grundsubstanzen abhängig. Darauf soll später noch näher eingegangen werden.

Das *Fluoreszenzbild* der normalen Bauchaorta vermittelt uns einen ungefähren Eindruck über das *Ausmaß physiologischer Umsetzungen von Grundsubstanzen im Sinne von Austausch, Abbau und Neusynthese im Rahmen des Erhaltungsstoffwechsels*. Bestimmungen der Umsatzrate durch Einbau von 35 SO_4 haben für Hyaluronsäure eine Halbwertszeit von 2—4 Tagen (SCHILLER u. Mitarb., LAYTON u. Mitarb.), für Chondroitinsulfat eine solche von 8—14 Tagen ergeben. Über die am Umsatz beteiligten Enzyme (Mucopolysaccharidasen) sind unsere Erkenntnisse allerdings vorerst noch recht gering. Doch darf als gesichert gelten, daß die *Aortenwand keinesfalls etwa ein stoffwechselträges Gewebe* ist. In der gesunden Aorta abdominalis bildet unter den sauren MPS Chondroitinsulfat (das freilich an Trägerproteine gebunden ist) den weitaus größten Anteil. Dann folgt mit Abstand Hyaluronsäure. Die restlichen Typen machen zusammen nur eine geringe

Menge aus. Interessanterweise haben wir in der Normalaorta Mastzellen, die bekanntlich als Hauptbildner des Heparin gelten, nicht finden können.

Neben den sauren MPS kommt nun in der normalen Aorta eine Anzahl von Kohlenhydrat-Protein-Komplexen (= neutrale MPS) vor (K. MEYER, WASSERMANN, JORPES u. YAMASHINA, BANGA). Sie unterliegen ebenfalls einem ständigen Ab- und Wiederaufbau. Von den sauren MPS unterscheiden sie sich durch ihren sehr niedrigen oder fehlenden Gehalt an Uronsäuren und Estersulfaten. Die Kohlenhydrat-Komponente ist bei ihnen sehr fest mit dem Protein als Zucker-Eiweiß-Komplex verbunden. Histochemisch sind sie mit der PAS-Reaktion darstellbar. Ihr Gehalt an Neuraminsäure (GOTTSCHALK, KLENK) erklärt, daß es sich nicht um chemisch neutrale Moleküle handelt.

II. Das funktionelle Zusammenspiel von Zellen und Grundsubstanzen bei der Wundheilung nach Aortentransplantation

Die bisherigen Befunde sagen nun aber noch nichts über den näheren Hergang solcher physiologischen Ab- und Umbauprozesse in der Aorta aus. Darüber wissen wir bis jetzt recht wenig. Die meisten Ergebnisse wurden durch chemische oder physikalische Aufarbeitung von Fasern gewonnen, die aus dem Gewebsverband isoliert waren. Die auf solche Weise analysierten Stoffe können aber u. E. zunächst nur als chemisch-physikalische Reaktionsprodukte zwischen den jeweils benutzten Agentien und den isolierten Fasern bzw. deren Bausteinen angesehen werden. Das gilt besonders für die verschiedenen Kollagenformen (LINDNER u. Mitarb., GRASSMANN u. Mitarb., KÜHN u. Mitarb.). Die eigentlichen Entwicklungsabläufe lassen sich indessen am besten im embryonalen Bindegewebe oder bei reparativen Prozessen verfolgen. Wir haben deshalb versucht, in einer Serie von Experimenten eine größere Reihe dicht aufeinander folgender Stadien der Entwicklung einer Aorten-Ersatzwand zu erhalten. Das Zusammenspiel von Grundsubstanz-MPS und Fibrillogenese rückt gewiß die Zellen in den Mittelpunkt der Betrachtung. Es bleibt aber zu klären, ob die Zellen lediglich Bildungsort sind oder ob sie darüber hinaus eine wichtige Stellung als Kontroll- und Steuerorgan für einen gerichteten Stofftransport einnehmen und evtl. auch transformatorische Aufgaben zu erfüllen haben.

Die Eingliederung von Kunststoff-Prothesen und homologen Segmenten in eine Arterie vollzieht sich nach den biologischen Gesetzen der Wundheilung, wie wir an anderer Stelle ausführlich dargelegt haben (CAIN, CAIN u. CARSTENSEN). Das von der gewöhnlichen Wundheilung Abweichende liegt darin, daß zwischen lebendes Gefäßgewebe ein nicht vitales Pflanzstück eingeschaltet ist. Wenn auch der Blutstromwirkung die entscheidende Rolle als Gestaltungsfaktor für die endgültige Ausdifferenzierung einer neuen Ersatzwand zukommt, so können doch von der Eigenart homologer Transplantate zusätzliche Impulse zumindest auf den Ablauf der frühen Wiederherstellungsphase ausgehen. Die einzelnen Phasen lassen sich bei der Homoioplastik in zeitlicher Reihenfolge folgendermaßen aufgliedern: mantelförmige Fibrinhülle des Implantats, Ausbildung einer Trümmerzone infolge lytischer Veränderungen der Implantat-Intima und -Adventitia, Trümmerbeseitigung durch Resorption, Entwicklung eines lockeren Keimgewebes, vermehrte Zellproliferationen, Fibrillogenese, Differenzierung von

Neo-Intima und Neo-Adventitia, langsame Substitution der alten Media. Nach Alloplastik verläuft der ganze Prozeß verkürzt und schneller.

Innerhalb der in der Frühphase gebildeten Fibrinschicht treten schon nach wenigen Tagen rasch sich vermehrende Fibroblasten auf. Um deren gelb-grünlich fluoreszierende Kerne sind zunächst einzelne, bald aber zahlreiche feingranuläre AO-positive Substanzen gelagert. Solche rot leuchtenden Körnchen beobachten wir nicht nur in nativen Gefrierschnitten, sondern konstant in der gleichen Intensität auch im formalinfixierten Transplantatgewebe, das erst nachträglich fluorochromiert wurde. Das bedeutet aber, daß die Fluoreszenz im Vital- bzw. Supravitalpräparat nicht etwa Folge einer aktiven Zelltätigkeit im Sinne eines zelleigenen Reaktions- oder Abwehrmechanismus ist. Vielmehr muß sie mit jenen Cytoplasmastrukturen in Zusammenhang gebracht werden, die von vornherein eine hohe Konzentration an sauren MPS aufweisen. Es handelt sich um das Äquivalent einer primären intraplasmatischen Synthese. Freilich ist der MPS-Aufbau in der Zelle an die Bereitstellung genügender Mengen an Aminozuckern und Uronsäuren, die aus Glucose gebildet werden, sowie an Sulfat- und Acetylgruppen geknüpft. Interessanterweise finden wir dementsprechend bei vergleichenden biochemischen Untersuchungen (die gemeinsam mit E. BUDDECKE vorgenommen wurden) in diesem Initialstadium in dem jungen, zwar reichliche Fibroblasten, aber noch keine Fasern enthaltenden Bindegewebe Hyaluronsäure und die in der „Chondroitin“-Fraktion vertretenen anionischen Polysaccharide, die teilweise als Synthesestufen des Chondroitinsulfats anzusehen sind.

Es erhebt sich nun die Frage, *an welche Zellstrukturen der Aufbau saurer MPS gekoppelt* ist. Hier kann natürlich nur die Elektronenmikroskopie weiterhelfen. Zieht man diesbezügliche Beobachtungen an jungen Fibroblasten und Histiozyten, wie sie beispielsweise SCHWARZ und MERKER erhoben haben, zum Vergleich heran, so zeigt sich in diesen Zellen eine mächtige Entfaltung des endoplasmatischen Reticulums. Dessen auseinandergewichene Membranen bilden teils kleinvesiculäre, teils große zisternenartige Räume, die mit einem feingranulären Inhalt erfüllt sind (vgl. JACKSON). SCHWARZ und MERKER neigen dazu, die kleinvesiculäre Komponente des endoplasmatischen Reticulums für die Bildung von MPS verantwortlich zu machen, während KNESE und KNOOP die MPS-Synthese in die zisternenförmig aufgetriebenen Strukturen des e.R. lokalisieren. In diese Befunde lassen sich die eigenen Fluoreszenzbeobachtungen insofern einordnen, als im Stadium der intracellulären Bildung AO-positiver Granula der ganze Zelleib mächtig anschwillt und jetzt oft diffus homogen rot erscheint infolge ungewöhnlich dichter Lagerung zahlreicher Farbgranula. Werden diese im Verlauf der weiteren Entwicklung an den extracellulären Raum abgegeben, so nimmt der Umfang der Fibroblasten wieder ab. Dementsprechend ändert sich auch das Fluoreszenzbild. Man findet jetzt *intercellulär* eine leuchtende Rotfärbung, während das Cytoplasma der nun wieder schmal gewordenen Bindegewebszellen gar nicht oder nur schwach grünlich fluoresciert und die Kerne, die vorher z. T. durch AO-Granula überlagert waren, wieder stärker hervortreten. Die *Phase der cytoplasmatischen Rotfluoreszenz muß also als Ausdruck einer gesteigerten Zellaktivität im Sinne einer „Sekretbildung“* gedeutet werden.

Den Ausschleusungsmechanismus von MPS-Granula können wir nach den bisherigen lichtoptischen Bildern nicht sicher definieren. Der ganze „Sekret-

bildungsprozeß“ scheint jedoch perinucleär zu beginnen und sich dann zunehmend bis an die Zellperipherie auszudehnen. Unsere Vorstellung über die Abgabe geht dahin, daß sich solche peripheren sekrethaltigen Vesiculae schließlich öffnen und somit ein Ausströmen ihres Inhaltes nach außen ermöglichen.

Den Bindegewebszellen obliegt außer der Synthese aber auch die Steuerung eines gerichteten Stofftransportes. Wie sehr ihre Tätigkeit dabei von der Zusammensetzung und der Menge der Intercellularsubstanzen abhängt, geht daraus hervor, daß die Grundsubstanzen die Diffusionsstrecke zwischen Gefäßlumen und Fibroblasten bestimmen. Ist die Grundsubstanzpermeabilität etwa infolge Verbreiterungen und Verdichtungen erschwert, so erklärt sich daraus, selbst bei normaler nutritiver Situation, ein Absinken der energetischen Zelleistung.

III. Zur Frage der Beziehungen zwischen verschiedenen Bindegewebszelltypen und verschiedenen sauren MPS

Bei vielen Tieren finden wir nun außer Fibroblasten und Histiocyten, die vorwiegend Bildner von Hyaluronsäure und der Chondroitinfraktion sind, gehäuft Mastzellen, deren Cytoplasma ebenfalls mehr oder minder stark mit AO-positiven Substanzen angefüllt ist (vgl. HIRT, EICKHOFF und SCHÜMMELFEDER). Bereits STAEMMLER sah in diesen Zellen einen wichtigen Herstellungsort schleimigen Intercellularkittes, ohne ihn allerdings chemisch schon näher definieren zu können. Zahlreiche andere Untersucher konnten später die in den Mastzellen enthaltenen Stoffe als Heparin identifizieren. Unsere Fluoreszenzbefunde führen nun zu der Feststellung, daß die Mastzellengranula in verschieden alten Implantaten sich dem Fluorochrom gegenüber different verhalten. Im jungen Granulationsgewebe sind sie meist leuchtend hellrot gefärbt, in etwas älteren Transplantaten werden sie zunehmend dunkler, und in noch späteren Stadien nehmen sie schließlich eine ausgesprochen braune Metachromasie an. Man kann aber auch in ein und demselben Präparat unmittelbar nebeneinander unterschiedlich fluoreszierende Mastzellen finden. Dieses Phänomen legt die Annahme eines intracellulären Reifungsprozesses der Mastzellen-MPS nahe. Man muß hier an Dehydratationen oder an eine echte Änderung im Chemismus denken. Möglicherweise steht am Beginn des MPS-Cyclus der Mastzellen die Bildung von Substanzen, die zu diesem Zeitpunkt vorwiegend Hyaluronsäurecharakter haben. Dabei wäre auch an eine unterschiedlich hohe Veresterung der Hyaluronsäure als Ursache hellerer oder dunklerer Rottönungen nach AO-Behandlung zu denken. Nach Abgabe eines Teiles dieser Substanzen in den extracellulären Raum könnte dann das in der Zelle verbliebene MPS unter gleichzeitigem Größerwerden der Granula zu Heparin weiterentwickelt und als solches gespeichert werden (ASBOE-HANSEN, RILEY). Dafür sprechen 2 Beobachtungen: 1. Das Verhalten in der abgestuften Toluidinblau- p_H -Reihe zeigt, daß manche Mastzellen stark saure MPS enthalten, während andere trotz quantitativ gleicher Bestückung mit Granula nur gering saure Substanzen aufweisen, ein Befund, der als solcher übrigens mit Beobachtungen von LENNERT und SCHUBERT an Knochenmarksmastzellen in guter Übereinstimmung steht. 2. Bei Hyaluronidase-Verdauung von nativen Transplantatschnitten konnten wir in Fibroblasten und in Mastzellen ziemlich rasch einen Schwund der hellroten Granula und bald darauf (also nach längerer En-

zymeynwirkung) auch die Abnahme dunkelroter Körnchen wahrnehmen. Dagegen blieben die dunkelbraunen Granula in den Mastzellen selbst nach einstündiger Fermentwirkung unverändert erhalten. Die unterschiedliche Resistenz gegenüber dem Enzym läßt sich ebenfalls mit der Auffassung verschiedener Säuregrade und verschiedener MPS-Typen solcher farblich differenter Körnchen in Einklang bringen. Insgesamt kommen wir zu der Annahme, daß die *Bildung einzelner saurer MPS-Typen von unterschiedlichen Differenzierungsformen und evtl. auch vom Alter bindegewebiger Zellen abhängig* ist.

IV. Die Stoffwechselvorgänge während der Wundheilung in biochemischer Sicht

Chemische Analysen von Aortentransplantaten sind uns aus dem bisherigen Schrifttum nicht bekannt geworden. Dennoch weisen die histologischen und histochemischen Befunde (SCHORN, PETRY u. BÄTZNER, PETRY u. HEBERER, CAESAR, CAIN u. CARSTENSEN, BRAUNSTEIN, HALPERT u. Mitarb., LINDER u. Mitarb.) darauf hin, daß die Neubildungsvorgänge nach Arterientransplantation im wesentlichen den allgemein-biologischen Prinzipien der Wundheilung entsprechen. Der Gesamtablauf stellt sich auf Grund der eigenen chemischen Ergebnisse in Form einer zweigipfeligen Kurve dar. Wenn man die Wundheilung im engeren Sinne in 2 Phasen aufgliedert, nämlich in die Zellproliferation und in die Fibrillogenese + Faserdifferenzierung, so zeigt sich, daß die initiale Zellproliferation mit einem steilen Anstieg hexosaminhaltiger Grundsubstanzen als Ausdruck der MPS-Synthese einhergeht. Interessant und wichtig ist aber, daß dieser 1. Gipfel keineswegs nur anionische Heteropolysaccharide (saure MPS) umfaßt, sondern gleichzeitig und offenbar in noch stärkerem Maße auch die neutralen Glykoproteide betrifft. Das belegen die PAS-Präparate und vor allem die beim Kochen mit Säure aufgetretene rotbraune Farbkomponente in den Überständen. Einen ungefähren Eindruck von den quantitativen Verhältnissen vermittelt die vorn wiedergegebene Tabelle, wenn man den Differenzwert zwischen Carbazol- und Orcin-Reaktion (der die Menge neutraler MPS enthält) betrachtet. Über die genaue prozentuale Verteilung von sauren und neutralen MPS in unterschiedlich alten Transplantaten wollen wir erst nach Abschluß weiterer säulenchromatographischer Fraktionierungen gemeinsam mit E. BUDDECKE berichten. Eine solche forcierte de novo-Synthese ist freilich an eine ausreichende Blutgefäßversorgung des jungen Mesenchyms gebunden. Außer Sauerstoff kommt zahlreichen Wirkstoffen (z. B. Vitamin A, B₆, C) eine bedeutende Rolle für die Größe der Stoffwechselleistungen zu, die auch an der hochgradig gesteigerten Aktivität der alkalischen Phosphatase und der Phosphoamidase sowie an dem Anstieg von Nucleinsäuren ersichtlich ist (vgl. Abb. 4 und 5).

Die 2. Phase der Wundheilung ist biochemisch durch einen nicht minder steilen Anstieg von Hydroxyprolin gekennzeichnet, der das Ausmaß der jetzt erfolgenden Kollagensynthese repräsentiert. Mit der Zunahme der Hydroxyprolinmenge fällt die MPS-Synthese wieder ab. Eine Normalisierung von Kollagen, MPS und Grundsubstanzen im Transplantatbereich beobachten wir 8—12 Monate nach der Operation, sofern die Wundheilung ungestört und in einem ausgewogenen Milieu erfolgte, d. h. degenerative Prozesse nicht aufgetreten sind.

V. Die Bedeutung saurer und neutraler MPS für die Fibrillogenese

Frühere Beobachtungen am unspezifischen Granulationsgewebe haben eigentlich immer nur die forcierte Biosynthese sulfathaltiger MPS (bes. Chondroitinsulfat) in den Vordergrund gestellt. Unsere Ergebnisse zeigen jedoch, daß an der Bereitstellung eines für die Faserentstehung adäquaten extracellulären Mediums außer freien sauren MPS auch ganz erhebliche Mengen an neutralen MPS beteiligt sind. Dabei ist bis heute nicht sicher, ob sie — wie die sauren MPS — in der Arterienwand selbst durch deren Zellen aufgebaut werden oder ob sie evtl. mit dem Saftstrom vom Lumen her in die Wand eindringen und somit eigentlich nur eine sekundäre Komponente der bindegewebigen Grundsubstanzen darstellen, deren primärer Bildungsort außerhalb der Gefäßwand liegt (BUDDECKE, SCHALLOCK, DISCHE u. Mitarb., RATZENHOFER u. SCHAUENSTEIN). Für die 2. Möglichkeit könnte ihre chemische Verwandtschaft mit den Glykoproteiden des Blutplasmas sprechen. Wie dem auch sein mag, sind sie doch ein integrierender Bestandteil der Aorta und von großer Wichtigkeit für die Stabilisierung der Fasern und die Aufrechterhaltung der sog. Bindegewebsbarriere.

Erst innerhalb einer während der 1. Wundheilungsphase derart ausgeglichenen intercellulären Grundsubstanz können sich dann im Stadium der Fibrillogenese von den Fibroblasten gelieferte Kollagenvorstufen zu feinsten fluoreszenzoptisch blaßgrün leuchtenden Teilchen kettenartig zusammenlagern und im weiteren Verlauf zu Fibrillen entwickeln. Diese Bilder erinnern an frühere Befunde von SEKI sowie DOLJANSKI und ROULET. Sie sind gleichermaßen eine Bestätigung der extracellulären Faserentstehung. Im Cytoplasma von Fibroblasten konnten wir einen solchen Zusammenschluß grün fluoreszierender Teilchen nicht beobachten (vgl. demgegenüber WASSERMANN, JACKSON, PORTER u. PAPPES, GIESEKING, ZAWISCH). Für den Aufbau der zuerst entstehenden Reticulinfasern und der später auftretenden Kollagenfasern wird ein großer Teil neutraler MPS verwendet. Man findet sie bei der Perjodsäure-Methode mantelartig verdichtet um die Fasern herum bzw. an deren Oberfläche. Der positive Ausfall der PAS-Reaktion erfolgt freilich nicht nur durch die Anwesenheit neutraler MPS, sondern muß in Übereinstimmung mit GRAUMANN, LINDNER, SCHWEINITZ u. FREYTAG sowie BRAUN-FALCO auf den Gesamtgehalt an Kohlenhydratanteilen in den Kittsubstanzen, nicht aber auf die Oxyaminosäuren des Kollagens zurückgeführt werden. Dabei werden in die reticulären Fasern offenbar noch mehr KH-haltige Stoffe eingebaut als in kollagene Fasern. In diesem Sinne läßt sich auch die mit der Faserreife parallel gehende Wiederabnahme der histochemischen Darstellbarkeit der sauren und neutralen MPS interpretieren.

Setzt man nun Nativschnitte von der jungen Transplantatwand einer Säurehydrolyse oder Hyaluronidaseverdauung aus, so beobachtet man als erstes einen Abbau von Kittsubstanzen, der mit einer Auflockerung der Faserränder einhergeht und hier nun wieder zu einer Verstärkung der histochemischen Reaktionen auf MPS führt. Erst später reagieren auch die interfibrillären Räume in derselben Weise. Ein prinzipiell gleichartiges Phänomen sehen wir als Ausdruck intravitaler Abbauprozesse an Fasern, Grund- und Kittsubstanzen im Bereich der Nahtstellen zwischen Empfängergefäß und Implantat (vgl. MEKNIN, ALLGÖWER, CATCHPOLE, RATZENHOFER u. PROBST, SCHÜRMANN). Hier kommt es durch die operativ geschaffenen Wundverhältnisse zu lokalem Zellzerfall, Eindringen von

Blutserum und Ausfällung von Fibrin. Dadurch werden lytische Vorgänge an den Fasern eingeleitet, die sich sehr bald im Freiwerden saurer und neutraler MPS und damit in den beschriebenen Farbeffekten zu erkennen geben. CATCHPOLE konnte im Wundrandgebiet sogar eine Kollagenase nachweisen.

Es hat sich also gezeigt, daß unter den die reticulären und kollagenen Fasern aufbauenden Faktoren den neutralen Glykoproteiden eine ebenso wichtige Rolle zukommt, wie sie von den sauren MPS schon länger bekannt ist. Wahrscheinlich handelt es sich bei den neutralen MPS um einen bedeutsamen Bestandteil derjenigen Substanz, welche die Filamente und Fibrillen miteinander verbindet und die, in die Kittsubstanz eingebaut, wesentlich zur Stabilisierung der Fasern beiträgt und gleichzeitig die Fasereinheiten besonders vor pathologischen Quellungen schützt. Fehlen während der Fibrillogenese neutrale MPS oder sind sie in zu geringer Menge vorhanden, so resultiert daraus — ebenso wie bei quantitativen und qualitativen Änderungen der sauren MPS — eine funktionelle Minderwertigkeit der entstehenden Fasern, die Schwächung oder sogar Aufhebung der sog. Bindegewebsbarriere bedeutet (vgl. BANGA, BALÓ, SZABÓ und BANGA, LOEWEN, NEMETH-CSOKA). Verschiebungen im Verhältnis Kollagen: MPS beeinträchtigen das Speicherungs- und Fixierungsvermögen für extracelluläres Wasser. Änderungen innerhalb der Gruppe saurer MPS haben Störungen der physiologischerweise ausgewogenen Ionenaustauschfunktion zur Folge und bedingen Kalkablagerungen sowie zusätzliche degenerative Erscheinungen. Hier sei auch an die in vitro-Versuche von HIGHBERGER, GROSS und SCHMITT erinnert, die zur Entstehung von Fibrillen mit abartigem Querstreifungsmuster, dem „fibrous long spacing“ Kollagen oder dem „segment long spacing“ Kollagen führten. Diese Versuche zeigen, daß die ionogenen Gruppen der MPS die Art der Zusammenlagerung von Tropokollagen-Molekülen zu steuern vermögen. Insgesamt erweisen sich die *ausgeglichenen Grundsubstanz-Mucopolysaccharide als eine Art Matrice und im Verein mit den ebenfalls cellulär synthetisierten Kollagen-vorstufen als Schrittmacher (in zeitlicher, qualitativer und quantitativer Hinsicht) der Fibrillogenese*. Auch im fertigen Bindegewebe bilden Zellen, Grundsubstanzen und Fasern eine untrennbare *Funktionseinheit*.

Gewiß bedürfen die bisher gewonnenen Ergebnisse über den Stoffwechsel bindegewebiger Gefäßstrukturen unter verschiedenen funktionellen Bedingungen weiterer Ergänzung von biochemischer Seite, damit es möglich wird, Störungen des dynamischen Gleichgewichts zwischen Zellen, Grundsubstanzen und Fasern in ihren zweifellos sehr komplexen Zusammenhängen noch besser zu verstehen und vielleicht eines Tages auch mit Erfolg zu beeinflussen.

Zusammenfassung

Schon in der normalen Aorta des Hundes findet im Rahmen des physiologischen Erhaltungsstoffwechsels ein beträchtlicher Umsatz von Grundsubstanz-Mucopolysacchariden statt. Die Eingliederung von Kunststoffprothesen und homologen Segmenten (die vorher in Palacos konserviert waren) geht mit einer stark gesteigerten Synthese hexosaminhaltiger Grundsubstanzen einher. Sie umfaßt nicht nur anionische Heteropolysaccharide, sondern beinhaltet in noch stärkerem Maße neutrale Glykoproteide. Das ausgeglichene MPS-Spektrum ist

eine Art Matriz und zusammen mit den ebenfalls cellulär gebildeten Kollagen-vorstufen der Schrittmacher der Fibrillogenese. Der dem MPS-Gipfel zeitlich nachfolgende Hydroxyprolin-Anstieg repräsentiert den Grad der Kollagensynthese. Für die mechanischen Fähigkeiten (bes. die sog. Bindegewebsbarriere) sowie für einen geordneten Wasser- und Elektrolythaushalt der Ersatzwand ist das den funktionellen Bedürfnissen angepaßte Stoffwechselgleichgewicht zwischen Zellen, Grundsubstanzen und Fasern entscheidend.

Summary

Within the limits of basic physiologic metabolism, in the normal aorta of the dog there is an appreciable metabolism of ground substance-mucopolysaccharides. The grafting of plastic protheses and homologous segments (which have been preserved in Palacos) is accompanied by a greatly increased synthesis of ground substances containing hexose amines. This includes not only anionic heteropolysaccharides but also in still greater quantities neutral glucoproteides. The compensated MPS spectrum acts as a sort of matrix. Together with the collagen precursors formed likewise from cells, it is the pacemaker for fibrillogenesis. The rise in hydroxyprolin, which follows the peak of the MPS, represents the degree of collagen synthesis. The metabolic balance between cells, ground substance and fibers, which adapts to functional requirements, is decisive for the mechanical quality of the union of the graft (the so-called connective tissue barrier), as well as for a regulated water and electrolyte balance within its wall.

Literatur

- ALLGÖWER, M.: The cellular basis of wound repair. Springfield, Ill.: Ch. C. Thomas 1956.
- ASBOE-HANSEN, G.: On the structure and functions of the mast cell. In CROMS, Connective tissue, a symposium, p. 12—26. Oxford: Blackwell Sci. Publ. 1957.
- BALÓ, J., D. SZABÓ u. I. BANGA: Über die Wirkung der Kollagenmucoproteinase auf die neutralen Mucopolysaccharide der kollagenen Fasern. *Acta histochem. (Jena)* **9**, 69—75 (1960).
- BANGA, I.: Der Zusammenhang zwischen „Funktion“ und chemischem Aufbau der Kollagen-faser. *Schweiz. med. Wschr.* **86**, 1045—1047 (1956).
- The role of polysaccharides in connective tissue. *Acta morph. Acad. Sci. hung. Suppl.* **8**, 8—13 (1959).
- BERTALANFFY, L., and J. BICKIS: Identification of cytoplasmic basophilia (Ribonucleic acid) by fluorescence microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* **4**, 481—493 (1956).
- BRAUNSTEIN, H.: Histochemical study of the adult Aorta. *Arch. Path. (Chicago)* **69**, 617—632 (1960).
- BUDDECKE, E.: Darstellung und chemische Zusammensetzung von Mucopolysacchariden der Aorta des Menschen. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **318**, 33—55 (1960).
- Biochemie des Bindegewebes. *Angew. Chem.* **72**, 663—677 (1960).
- CAESAR, R.: Kasuistischer Beitrag zum Verhalten eines homoioplastischen Aortentransplantates bei Aortenisthmusstenose. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **99**, 530—534 (1959).
- CAIN, H.: Arterientransplantation aus der Sicht der funktionellen Morphologie. *Ber. physik. med. Ges. Würzburg Bd. 70* (in Druck).
- , u. G. CARSTENSEN: Morphologische Grundlagen für die Verwendung einer neuartigen Gefäßbank im Tierexperiment. *Langenbecks Arch. klin. Chir.* **296**, 88—101 (1960).
- — Biologische Probleme des allo- und homoioplastischen Arterientransplantats. *Thoraxchirurgie* **9**, 344—352 (1961).
- CARSTENSEN, G.: Eine neue Methode der Gefäßkonservierung durch Einbettung in einen schnellhärtenden Kunststoff. *Chirurg* **31**, 49—52 (1960).

- CATCHPOLE, H. R.: In M. B. WILLIAMSON, The healing of wounds, p. 29. New York: McGraw-Hill Book Comp. 1957.
- DISCHE, Z.: New Color Reactions for Determination of Sugars in Polysaccharides. *Meth. biochem. Anal.* **2**, 313.
- DISCHE, Z., A. DANILCZENKO and G. ZELMENIS: In G. E. W. WOLSTENHOLME and M. O'CONOR, Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides, p. 116. London: Churchill 1958.
- DOLJANSKI, L., u. FR. ROULET: Studien über die Entstehung der Bindegewebsfibrille. *Virchows Arch. path. Anat.* **291**, 260—320 (1933).
- EICKHOFF, W., u. N. SCHÜMMELFEDER: Fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen an der lebenden Rattenschilddrüse. *Virchows Arch. path. Anat.* **328**, 18—28 (1956).
- GIESEKING, R.: Über die faserige Differenzierung des Mesenchyms in frühen Stadien der Entwicklung. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **43**, 56—60 (1959).
- GÖSSNER, W.: Zur Histochemie des Strugger-Effektes. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **33**, 102—109 (1950).
- GOTTSCHALK, A.: In: Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides, p. 287. Boston, Mass.: Little, Brown & Co. 1958.
- GRASSMANN, W., u. W. KÜHN: Abbau des Kollagens und des Prokollagens mit Natriumperjodat und Phenyljodoacetat. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **301**, 1—16 (1955).
- GROSS, J., J. H. HIGHBERGER and F. O. SCHMITT: Extraction of collagen from connective tissue by neutral salt solutions. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **41**, 1 (1955).
- HALPERT, B., M. E. DE BAKEY, G. L. JORDAN and W. S. HENLEY: The fate of homografts and prostheses of the human Aorta. *Surg. Gynec. Obstet.* **111**, 659—674 (1960).
- HIGHBERGER, J. H., J. GROSS and F. O. SCHMITT: The interaction of mucoprotein with soluble collagen; an electron microscope study. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **37**, 286 (1951).
- HIRTH, H., H. SOMMER, K. WIMMER u. A. KIESSELBACH: Lumineszenzmikroskopische Untersuchungen an den Mastzellen der lebenden Maus. *Anat. Anz.* **87**, Erg.-H., 97—105 (1939).
- JACKSON, S. F.: Zellgranula in Fibrozyten. *Nature (Lond.)* **175**, 39—40 (1950).
- JORPES, E., u. I. YAMASHINA: Die Mucopolysaccharide und Glykoproteide des Bindegewebes. Chemie und Stoffwechsel von Binde- und Knochengewebe. 7. Colloquium der Ges. für Physiol. Chemie in Mosbach (Baden) 1956, S. 25—51.
- KLENK, E.: In: Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides, p. 297. Boston, Mass.: Little, Brown & Co. 1958.
- KNESE, K. H., u. A. M. KNOOP: Elektronenmikroskopische Befunde über die Mucopolysaccharidbildung. 9. Tagg der Dtsch. Ges. für Elektronenmikroskopie, Freiburg, 1959.
- KROMPECHER, ST.: Hypoxybiose und Mucopolysaccharidbildung in der Differenzierung und Pathologie der Gewebe sowie über den Zusammenhang zwischen Schilddrüsenfunktion und Mucopolysacchariden. *Nova Acta Leopold.* **22**, Nr 146, 5—56 (1960).
- KÜHN, K., W. GRASSMANN u. U. HOFMANN: Über die Bildung der Kollagenfibrillen aus gelöstem Kollagen und die Funktion der kohlenhydrathaltigen Begleitkomponenten. *Z. Naturforsch.* **14**, 436—443 (1959).
- LAYTON, L. L., D. R. FRANKEL, I. H. SHER, S. SCAPA and G. FRIEDLER: Importance of synthesis of acid Polysaccharide for wound healing. *Nature (Lond.)* **181**, 1543—1544 (1958).
- LENNERT, K., u. J. C. F. SCHUBERT: Untersuchungen über die sauren Mucopolysaccharide der Gewebsmastzellen im menschlichen Knochenmark. *Frankfurt. Z. Path.* **69**, 579—590 (1959).
- — Zur Cytochemie der Blut- und Gewebsmastzellen. *Verh. dtsh. Ges. inn. Med.* **36**, 1061—1065 (1960).
- LINDER, F., W. SCHMITZ u. F. STEIN: Beitrag zur Einheilung alloplastischer Gefäßprothesen beim Menschen. *Langenbecks Arch. klin. Chir.* **293**, 237—244 (1960).
- LINDNER, J.: Histochemische und biochemische Untersuchungen der traumatisch gestörten Beziehung zwischen Grundsubstanz und Kollagenfasern. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **43**, 61—69 (1959).
- H. A. v. SCHWEINITZ u. G. FREYTAG: Reaktionsformen von Kollagenfasern. *Acta histochem. (Jena)* **9**, 231—246 (1960).
- LOEWEN, W. H.: The binding collagen-mucopolysaccharide in connective tissue. *Acta anat. (Basel)* **24**, 217—244 (1955).

- MENKIN, V.: Biochemical mechanism in inflammation, 2. edit. Springfield, Ill. 1956.
- MERKER, H.-J.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Fibrillogenese in der Haut menschlicher Embryonen. *Z. Zellforsch.* **53**, 411—430 (1961).
- MEYER, K.: The chemistry of the ground substances of connective tissue. In G. ASBOE-HANSEN, *Connective tissue in health and disease*. Copenhagen: Munksgaard 1954.
- Struktur und Biologie der Polysaccharidsulfate im Bindegewebe. In: *Struktur und Stoffwechsel des Bindegewebes*, herausgeg. von W. H. HAUSS u. H. LOSSE, S. 12—19. Stuttgart: Georg Thieme 1960.
- NEMETH-CSOKA, M.: Untersuchungen über die kollagenen Fasern. I. Über die submikroskopische Struktur der in vitro präzipitierten kollagenen Fasern und die stabilisierende Rolle der sauren Mucopolysaccharide. *Acta histochem. (Jena)* **9**, 282—294 (1960).
- PEARSE, A. G. E.: *Histochemistry, theoretical and applied*. London: Churchill 1953.
- PETRY, G., u. K. BÄTZNER: Zur Morphologie homoplastischer Aortentransplantate. *Chirurg* **24**, 439—442 (1953).
- , u. G. HEBERER: Die Neubildung der Gefäßwand auf der Grundlage synthetischer Arterienprothesen. *Langenbecks Arch. klin. Chir.* **286**, 249—290 (1957).
- PORTER, K. R., and G. D. PAPPES: Collagen formation by fibroblasts of the chick embryo dermis. *J. biophys. biochem. Cytol.* **5**, 153—165 (1959).
- RATZENHOFER, M., u. A. PROBST: Histologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen der Sehnennekrose. *Virchows Arch. path. Anat.* **328**, 624—634 (1956).
- RILEY, J. F.: Die Mastzellen. *Endeavour* **19**, 4—8 (1960).
- SCHALLOOK, G.: Chronische Folgen traumatischer Schädigungen an den Fasern und Grundsubstanzen des Bindegewebes. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **43**, 12—26 (1959).
- , u. H. LINDNER: Beitrag zur Frage der Entmischungszustände in den Grundsubstanzen des Bindegewebes. *Medizinische* **1957**, 12—20, 21—22.
- SCHILLER, S., M. B. MATHEWS, J. A. CIFONELLI and A. DORFMAN: The metabolism of Mucopolysaccharides in animals. III. Further studies on skin utilizing C₁₄-Glucose, C₁₄-Acetate and S₃₅-Sodium Sulfate. *J. biol. Chem.* **218**, 139—145 (1956).
- SCHORN, J.: Die Einheilung homoiotransplanterter menschlicher Aorta nach Operation einer Isthmusstenose. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **36**, 260—267 (1952).
- SCHÜMMELFEDER, N.: Die Fluorochromierung des lebenden, überlebenden und toten Protoplasmas mit dem basischen Farbstoff Acridinorange und ihre Bedeutung zur Stoffwechselaktivität der Zelle. *Virchows Arch. path. Anat.* **318**, 119—154 (1950).
- Zur histochemischen Bedeutung der Fluoreszenz-Metachromasie des Acridinorange. *Acta histochem. (Jena) Suppl.* **1**, 148—151 (1958).
- R. E. KROGH u. K. J. EBSCHNER: Färbungsanalysen zur Acridinorange-Fluorochromierung. Vergleichende histochemische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen am Kleinhirn der Maus mit Acridinorange- und Galloxyanin-Chromalaun-Färbungen. *Histochemie* **1**, 1—28 (1958).
- SCHÜRMAN, P., u. H. E. MACMAHON: Die maligne Nephrosklerose, zugleich ein Beitrag zur Frage der Bedeutung der Blutgewebsschranke. *Virchows Arch. path. Anat.* **291**, 47—218 (1933).
- SCHWARZ, W.: Heutige Vorstellungen über die ultramikroskopische Struktur des Bindegewebes. In: *Struktur und Stoffwechsel des Bindegewebes*, herausgeg. von W. H. HAUSS u. H. LOSSE, S. 106—130. Stuttgart: Georg Thieme 1960.
- STAENMLER, M.: Untersuchungen über Vorkommen und Bedeutung der histiogenen Mastzellen im menschlichen Körper unter normalen und pathologischen Verhältnissen. *Frankfurt. Z. Path.* **25**, 391—435 (1921).
- STOCKINGER, L.: Fluoreszenzmetachromasie. *Acta histochem. (Jena) Suppl.* **1**, 103—119 (1958).
- STRUGGER, S.: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Aufnahme und Speicherung des Akridinorange durch lebende und tote Pflanzenzellen. *Jena. Z. Naturwiss.* **73**, 97—134 (1940).
- Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie von M. und H. SCHAFER, Hannover 1949.

- WASSERMANN, F.: The intercellular components of connective tissue origin, structure and interrelationship of fibers and ground substance. *Ergebn. Anat. Entwickl.-Gesch.* **35**, 140—333 (1956).
- Über die strukturellen Grundlagen der Chemie und des Stoffwechsels der Stützsubstanzen. 7. Colloquium der Ges. für Physiol. Chemie in Mosbach (Baden), S. 1—19, 1956.
- ZAWISCH, C.: Die Morphogenese der kollagenen Fibrille. *Acta anat. (Basel)* **29**, 143—208 (1957).
- ZEIGER, K., H. HARDERS u. W. MÜLLER: Der Strugger-Effekt an der Nervenzelle. *Protoplasma (Wien)* **40**, 76—84 (1951).
- , u. W. SCHMIDT: Über die Natur der bei Intoxikation mit Acridinorange in tierischen Zellen entstehenden Stoffablagerungen. *Z. Zellforsch.* **45**, 578—588 (1957).
- , u. M. WIEDE: Die Speicherung von Akridinorange in der Froschleber und ihr Einfluß auf das Ausscheidungsvermögen der Leberzelle. *Z. Zellforsch.* **40**, 401—404 (1954).

Privatdozent Dr. H. CAIN, Pathologisches Institut der Universität Würzburg,
Luitpoldkrankenhaus