

ZB MED - Informationszentrum Lebenswissenschaften

Histochemie der Haut

Unna, Paul Gerson

Leipzig [u.a.], 1928

ZB MED - Informationszentrum Lebenswissenschaften

Shelf Mark: Ui VI 1849

I. Farbenindex des Granoplasmas: Blaues Polychrom.

[urn:nbn:de:hbz:38m:1-125247](https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:hbz:38m:1-125247)

A. Darstellung der sauren Zelleiweiße durch basische Färbungen.

Die heutige Kenntnis der Histochemie des Protoplasmas beruht auf der erfolgreichen Färbung desselben mit basischen Farben, nachdem die frühere Darstellung mit sauren Farben (Eosin, Pikrokarmin, van Gieson) sich in dieser Beziehung unfruchtbar erwiesen hatte. Die darin wirksamen sauren Farben (Eosin, Pikrinsäure) färben nämlich nur einen Teil des Protoplasmas, seine Grundlage, das Spongionplasma, einen Eiweißkörper von noch unbekannter Zusammensetzung und basischer Reaktion. Derselbe ist allen tierischen Zellen eigen und von sehr einheitlichem Charakter. Der zweite, vielgestaltigere Anteil des Protoplasmas ist im Gegensatz dazu ein saurer Eiweißkörper, in fast allen Zellen in verschiedener Menge und charakteristischer Anordnung vorhanden und bereits nach seinen chemischen Eigenschaften so gut bekannt, daß er einer bestimmten Eiweißgruppe zugeordnet werden konnte. Ich habe ihn das Granoplasma genannt; zusammen mit dem Spongionplasma bildet er das tierische Protoplasma.

I. Farbenindex des Granoplasmas: Blaues Polychrom.

Die Entdeckung des Granoplasmas (1891)¹⁾ verdanken wir der Anwendung der „polychromen Methylenblaulösung“, einer Farblösung, welche aus dem Methylenblau durch Kochen mit Kalikarbonat entstand und dessen Polychromie durch die Anwesenheit von Methylenviolett und basischem Thiazinrot²⁾ bedingt war. Diese äußerst stark basische Farblösung wurde allmählich das Hauptfärbemittel aller sauren Eiweiße. Ihr verdanken wir auch die Entdeckung der an dem sauren Granoplasma reichen Plasmazellen. Es zeigte sich übrigens bald, daß das dem Methylenblau nahverwandte Toluidinblau jenes mit Vorteil teilweise zu ersetzen imstande war, so daß die Mischung beider Farben noch farbkraftigere Bilder lieferte. Wir benutzen daher jetzt eine alkalische Farbmischung, die durch Kochen beider Farbstoffe zugleich mit Pottasche hergestellt wird, unter dem Namen „Blaues Polychrom“.

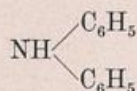
Man löst von beiden Farbstoffen 0.5 g in wenig 75%igem Alkohol auf, gießt beide Lösungen zusammen in 100 cm³ einer 1%igen Pottaschelösung und kocht diese Mischung unter beständigem Rühren 2 Minuten lang. Nach dem Erkalten wird die Mischung filtriert.

¹⁾ P. G. Unna, Über Plasmazellen, insbesondere beim Lupus. Monatshefte für praktische Dermatologie, 1891, Bd. 12, S. 296.

²⁾ P. G. Unna und Baudisch, Thiazinrot. Dermatologische Wochenschrift, 1919, Bd. 68, S. 49.

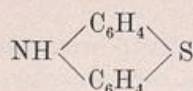
Das Methylenblau selbst baut sich auf auf einer basischen Gruppe, die aus zwei Phenolen mit einem sie zusammenhaltenden Amin (NH) besteht, dem

Diphenylamin



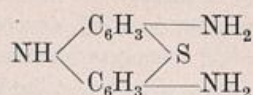
Wird diese offene Kette durch ein Schwefelatom geschlossen, so entsteht das

Thiodiphenylamin



das Chromophor der Thiazine, einer für uns sehr wichtigen Farbgruppe. Zu einem richtigen Farbstoff wird das Thiodiphenylamin erst durch Aufnahme zweier basischen Seitenketten von NH_2 . Es entsteht dann eine Vorstufe des Methylenblaus: die Base des

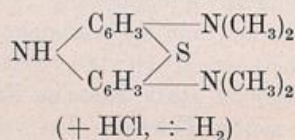
Thionins



eines der ältesten synthetischen Farbstoffe (Lauthsches Violett).

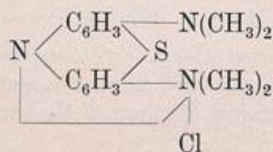
Indem nun hier in den Seitenketten 4 Wasserstoffatome noch durch 4 Methylgruppen (CH_3) ersetzt werden, entsteht die Base des Leukomethylenblaus, d. h. des noch reduzierten Methylenblaus, oder des

Methylenweiß:



Erst wenn dieses mit HCl zum Farbsalze ergänzt und durch Entziehung von 2 H-Atomen oxydiert wird, entsteht das bekannte blaue Salz des Tetramethylthionins oder

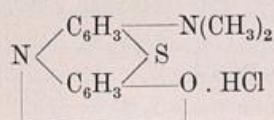
Methylenblaus:



Dabei tritt die Salzsäure (HCl) an eine der beiden basischen Seitenketten und verliert dabei ein Wasserstoffatom, welches frei wird. Das zweite, für die Umwandlung des Methylenweiß in Methylenblau notwendige Wasserstoffatom wird von der NH-Gruppe des Methylenweiß abgegeben.

Die blaue Farbe des Methylenblaus entsteht also nicht etwa durch Hinzufügung von Sauerstoff zu dem farblosen reduzierten Methylenweiß, sondern stets dadurch, daß diesem sogenannten Leukokörper Wasserstoff entzogen wird. Dasselbe Prinzip gilt nicht nur für den Versuch im Reagierglas, sondern auch für die Färbung im Gewebe. Die „Sauerstofforte“ des Gewebes sind es, die dem Methylenweiß bei der Rongalitweißfärbung Wasserstoff entziehen. Dabei färben sie sich blau mit dem dann sofort entstehenden Methylenblau.

Eine wirkliche Addition von Sauerstoff zum Methylenblau dagegen findet in alten Methylenblaulösungen unter dem Einfluß des Alkalis des Glases und des Luftsauerstoffes statt, wobei eine ganze methylierte Stickstoffgruppe, die Seitenkette: $N(CH_3)_2$, abgestoßen und durch ein Sauerstoffatom ersetzt wird. Der hierdurch entstehende Körper



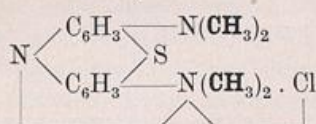
heißt Methylviolett und hat wegen seines O-Gehaltes weniger Affinität zum sauerstoffhaltigen Granoplasma als zu dessen Muttersubstanz, dem stark reduzierenden Spongioplasma. Da er aber im blauen Polychrom auch stets vorhanden ist und das Spongioplasma gleichzeitig violett anfärbt, während das Methylenblau vom Granoplasma gespeichert wird, so resultiert bei der Färbung mit blauem Polychrom eine sehr vollständige, dunkel bläuviolette Färbung des Gesamtprotoplasmas.

Das Toluidinblau ist um eine Methylgruppe ärmer als das Methylenblau; es ist ein Trimethylthionin, gehört also auch wie jenes in die Thiazin-Gruppe.

Thiazine.

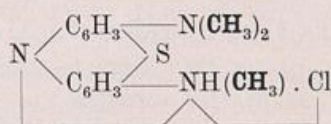
Tetramethylthionin

Methylenblau:



Trimethylthionin

Toluidinblau:



Durch den Verlust einer Methylgruppe ist das Toluidinblau farbstärker geworden als das Methylenblau¹⁾.

Die Färbung der Schnitte (Gefrierschnitte) mit blauem Polychrom gibt außer der Protoplasmafärbung auch eine Gesamtdarstellung sowohl der Nukleoproteide wie aller anderen sauren Eiweißkörper. Sie färbt vermöge ihrer starken Basizität alle sauren Bestandteile des Gewebes so intensiv, daß beim Versagen dieser Färbung nach Vorbehandlung der Schnitte mit Lösungsmitteln mit Sicherheit auf den völligen Schwund der betreffenden sauren Zellbestandteile

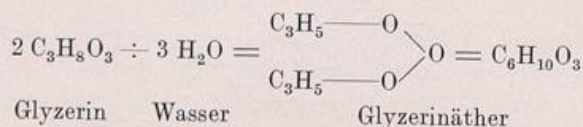
¹⁾ Es ist eine häufig wiederkehrende Erscheinung, daß eine Substanz an chemischer Wirkung gewinnt, wenn sie eine CH_3 -Gruppe verliert; so ist Cignolin therapeutisch wirksamer als Chrysarobin, ein Pararosanilin jodfester als ein Rosanilin.

geschlossen werden kann. Man vermag sogar die Stärke der Säure dieser letzteren nach der Tiefe der Blaufärbung abzuschätzen. Wir brauchen es daher als Farbenindex bei der Erforschung der sauren Zelleiweiße und benutzen zu diesem Zwecke als Zellmaterial die großen Epithelzellen des spitzen Kondyloms oder eines anderen Akanthoms.

Die besonders starke Färbung der Zellen durch das blaue Polychrom erfordert eine gute, nachträgliche Entfärbung des umgebenden Gewebes, speziell des Kollagens. Eine solche leistet die einfache Alkoholentfärbung nicht. Dagegen erhalten wir eine vollständige Entfärbung des Kollagens durch Glyzerinäther, welcher sich seit 1891¹⁾ für diesen Zweck am besten bewährt hat.

Derselbe kommt im Handel vor unter dem Namen: Glyzerinäthermischung.

Der Glyzerinäther ($C_6H_{10}O_3$), ein Anhydrid des Glycerins, ist eine stechend riechende, gelbliche Flüssigkeit von folgender Formel:



Der Äther des Glycerins wird durch trockene Destillation von 50 cm³ reinen Glycerins mit 10·0 Kalziumchlorid (siccum) in einem Destillierkolben dargestellt. Man sammelt sämtliche von 100—220° übergehende Fraktionen, deren Mischung eine trübe, braune Flüssigkeit ergibt. Diese wird mit Tierkohle vermischt und nochmals destilliert. Nun resultiert bereits bei zirka 100° eine hellgelbliche klare Flüssigkeit von dem bekannten stechenden Geruch des Glyzerinäthers. Ein ganz geringer Zusatz von Alkohol absolutus bringt die letzte Trübung des Glyzerinäthers zum Verschwinden. Dieser muß bei der Anwendung (zur Entfärbung) noch auf das Fünf- bis Zehnfache mit Wasser verdünnt werden.

Während der reine Glyzerinäther sich mit ätherischen Ölen und sogar mit Balsam direkt mischt, läßt sich natürlich dieses wässrige Glyzerinätherpräparat²⁾ nicht mit den aufhellenden Ölen mischen; es ist aber trotzdem beim praktischen Arbeiten dem Gebrauch des reinen und allzu stark wirkenden Glyzerinäthers, abgesehen von seiner größeren Billigkeit, vorzuziehen.

Die Formel für diese Kollagenentfärbung lautet:

1. Blaues Polychrom 1—2 Minuten.
2. In Wasser abspülen.
3. Glyzerinäthermischung, mit Wasser auf das Fünf- bis Zehnfache verdünnt, ½—2 Minuten.
4. Besonders gute Ausspülung in Wasser 2—5 Minuten.
5. Alkohol absolutus, Bergamottöl, Balsam.

Man hat dafür zu sorgen, daß nach der Entfärbung jeder Rest des Glyzerinäthers durch längere Spülung mit Wasser aus dem Gewebe entfernt wird, weil sonst noch im fertigen, in Balsam liegenden Präparate nachträglich die Granoplasmafärbung leidet.

Fehler werden am meisten in der Richtung gemacht, daß nach Analogie mit anderen Entfärbern (Alkohol, saurem Alkohol) die Behandlung mit Glyzerin-

¹⁾ P. G. Unna, Glyzerinäther. Enzyklopädie mikr. Technik, 1910.

²⁾ Bei Dr. Hollborn, Leipzig, vorrätig.

äther zu lange ausgedehnt oder der Glycerinäther zu konzentriert gebraucht wird. Er soll die Entfärbung eben nur in die richtige Bahn leiten, d. h. das Methylenblau vom Kollagen durch Quellung desselben lockern, den Schluß der Entfärbung aber dem absoluten Alkohol überlassen. Bei zarten Gebilden, dünnen Schnitten tut man daher gut, die Glycerinäthermischung auf das Zehnfache zu verdünnen und $\frac{1}{2}$ bis höchstens 1 Minute wirken zu lassen. Oft genügt ein bloßes Eintauchen in dieselbe, um die weitere Entfärbung bis zur völligen Farbenfreiheit des Kollagens im Alkohol zu erreichen.

Das Prinzip der Entfärbung des Kollagens durch Glycerinäther beruht auf dem Sauerstoffreichtum des Glycerinäthers. Ein solcher hat, wie immer, die Folge, daß das Kollagen quillt, womit die Ablösung der basischen Farbe eingeleitet wird. Denn die Färbung des Kollagens mit basischen Farben ist um so stärker, je trockener¹⁾, und um so schwächer, je wasserhaltiger es ist. Man könnte die Quellung zur Einleitung der Entfärbung auch mit Wasserstoffsperoxyd erreichen. Diese Quellung durch sauerstoffreiche Mittel ist besser als die Quellung des Kollagens durch Säuren (z. B. HCl), da der Sauerstoff das sauerstoffreiche Granoplasma schont, während HCl das basisch gefärbte Granoplasma stark angreift. Ebenso wie die Quellung des Kollagens beruht auch die Schonung des sauerstoffreichen Granoplasmas bei dieser Methode auf dem hohen Sauerstoffgehalt des Glycerinäthers.

Man vergleiche in dieser Beziehung die Formel des ebenfalls farblösenden Glycerins $\begin{pmatrix} \text{OH} \\ \text{C}_3\text{H}_5 - \text{OH} \\ \text{OH} \end{pmatrix}$ mit der des Glycerinäthers $\begin{pmatrix} \text{C}_3\text{H}_5 - \text{O} \\ \text{C}_3\text{H}_5 - \text{O} \end{pmatrix} \text{O}$.

Indem wir nun die mit dem blauen Polychrom zu behandelnden Schnitte vor der Färbung in verschiedene Lösungsmittel bringen, zeigt die nachträgliche Färbung mit blauem Polychrom an, welche sauren Eiweiße aus dem Bilde herausgelöst und verschwunden sind, und wir lernen dadurch eine charakteristische Eigenschaft der betreffenden Substanz kennen. Hierin besteht das Wesen der Chromolyse.

Der erste chromolytische Versuch besteht immer in der Behandlung der Schnitte mit destilliertem Wasser. Die Schnitte²⁾ bleiben in demselben, durch Zusatz eines Tropfens Chloroform aseptisch erhalten, bei Körpertemperatur 18–24 Stunden. Die dann erfolgende Färbung mit blauem Polychrom und Entfärbung mit Glycerinäther ergibt folgendes Bild der Stachelschicht des spitzen Kondyloms: die Kerne sind stark gefärbt, noch etwas mehr die Kernkörperchen. Bedeutend schwächer geworden ist aber die Blaufärbung des Zelleibes. Es ist nur ein wolkiger Rest geblieben, in welchem viele kleine und wenige größere Körnchen schwach blau sichtbar sind. Es ist dies der Rest des Granoplasmas, dessen größere Menge durch destilliertes Wasser vorher aufgelöst wurde. Eine ringförmige mittlere Zone desselben hält sich am längsten, während in Kernnähe und Wandnähe nur noch Spuren vom Granoplasma übrig sind. Diese Lösung

¹⁾ Die angetrockneten Schnittträger halten bekanntlich die basischen Farben so stark fest, daß sie kaum zu entfärben sind.

²⁾ Für diese Chromolyse des Granoplasmas kann man auch und mit Vorteil die feineren Alkohol-Zelloidin- oder -Paraffinschnitte verwenden, da Granoplasma in Alkohol und Äther unlöslich ist.

des Granoplasmas geht um so schneller vonstatten, je mehr man das Wasser erwärmt. In kochendem Wasser ist sie bereits in 10 Minuten vollendet.

Dieses Verhalten dem Wasser gegenüber beweist, daß es sich beim Granoplasma nicht um einen genuinen Eiweißkörper, ein Albumin oder Globulin handeln kann, die in kochendem Wasser gerade gerinnen würden. Es kommen dagegen Peptone und Albumosen in Betracht. Peptone können leicht ausgeschlossen werden, da diese sich in 96%igem Alkohol, in Essigsäure und Pikrinsäure lösen würden, während das Granoplasma von diesen Flüssigkeiten ausgezeichnet gut konserviert wird. Dagegen besitzt das Granoplasma alle charakteristischen Eigenschaften der Albumosen und schließt sich, wie wir noch später sehen werden, am engsten der von Kühne und Robert Koch entdeckten Akroalbumose einerseits, den Deuteroalbumosen andererseits an, so daß man sie als eine Akro-Deutero-Albumose auffassen muß. Da man die Albumosen nach ihrer Herkunft zu benennen pflegt, so habe ich diese Albumose, die in fast allen Zellen zu finden ist, Zytose, d. i. Zellalbumose, genannt. Normalerweise kommt sie nur in Zellen vor; da sie aber so leicht in körperl warmem Wasser und daher ebenso leicht in der Lymphe löslich ist, so beobachten wir ihre Verbreitung mittels des Lymphstroms auch in den Interzellulärsubstanzen, soweit diese eine besondere Affinität zur sauren Zytose besitzen, wie vor allem das kollagene Gewebe. Dieses hat, und zwar wegen der permanenten Durchspülung mit alkalischem Gewebssaft, basische Reaktion. Daher nimmt es, ohne aus sich heraus eine saure Albumose zu produzieren, in der Nachbarschaft von zytosereichem Epithel, also besonders unter pathologischen Umständen, gerne Zytose auf und verwandelt sich damit in „basophiles Kollagen“.

Den nächsten chromolytischen Versuch nimmt man mit 2%iger Kochsalzlösung vor. Auch in dieser bleiben die Schnitte 18–24 Stunden aseptisch im Brutofen und zeigen dann das folgende Bild: Das Protoplasma ist gänzlich von Zytose befreit, während die Kernwand und ebenso die Wand des Kernkörperchens das blaue Polychrom gut aufgenommen haben. In sehr charakteristischer Weise aber erscheinen alle Kernkörperchen als blau gefärbte Ringe (eigentlich: Hohlkugeln), die den größten Teil ihres Inhalts verloren haben. Dieses salzlösliche Eiweiß der Kernkörperchenmitte ist, wofür auch alle sonstigen Lösungseigenschaften sprechen, ein Globulin. Wir müssen uns also jedes Kernkörperchen des tierischen Gewebes als eine Kugel aus Globulin vorstellen, die allseitig von einer Schale von Nukleoproteiden umgeben ist. Dieses Globulin findet sich normalerweise immer nur mitten im Kernkörperchen, d. h. im zentralsten Teile jeder Zelle. Bei der mitotischen Kernteilung ist das erste Symptom eine Ab- und Auflösung der Nukleinhülle des Kernkörperchens. Dadurch wird der Globulininhalt desselben frei und mischt sich dem Kerninhalt bei, der bei der Auflösung der nukleinhaltigen Kernwand dann weiter mit dem zytosehaltigen Zellinhalt zusammenfließt.

Ein dritter chromolytischer Versuch mit 1%iger Kalilauge macht uns schließlich mit der Eiweißnatur der letzten sauren Zelleiweiße bekannt, welche der Lösung durch Wasser und Kochsalzlösung widerstanden haben, nämlich mit den Nukleoproteiden des Kernes. Diese werden durch Wasser nicht angegriffen, quellen durch Kochsalzlösung nur auf, ohne sich zu lösen, werden aber von der schwachen Kalilauge vollständig gelöst, ebenso übrigens wie die

Zytose und das Globulin. Nach der Behandlung mit Kalilauge sind also alle sauren Zelleiweiße verschwunden und das blaue Polychrom färbt, seiner Angriffspunkte ledig, die Schnitte überhaupt nicht mehr, die nur noch basische Eiweiße beherbergen.

Die folgende kleine Tabelle gibt eine kurze Übersicht über diese chromolytisch erforschten drei sauren Zelleiweiße und ihre Lösungsmittel. O bedeutet darin Lösung, + Erhaltenbleiben.

	Zytose	Globulin	Nukleoproteide
Wasser	O	+	+
Kochsalz	O	O	+
Kali	O	O	O

II. Farbenindex der Nukleoproteide: Methylgrün.

Das „blaue Polychrom“ als Wegweiser für die Auffindung saurer Eiweiße ist von einer einzigartigen Universalität, indem es sich mit allen sauren Eiweißen ohne Unterschied verbindet. So wichtig diese seine Eigenschaft ist, wenn es sich darum handelt, die ganze Klasse der sauren Eiweiße von den basischen Eiweißen derselben Gewebe abzugrenzen, so sehr bedürfen wir andererseits für die Abgrenzung der einzelnen sauren Eiweiße unter sich einseitigerer basischer Farben. Eine solche mit einer für uns höchst wertvollen Beschränkung auf eine ganz bestimmte Gruppe saurer Eiweiße ist das Methylgrün. Dieses gibt eine spezifische Färbung nur der Nukleoproteide und ermöglicht es uns daher, alle Nukleinsäure enthaltenden Eiweiße in den Zellen zu erkennen und leicht von ihren anderen sauren Eiweißen: Zytose und Globulin zu unterscheiden.

Da die Nukleoproteide in absolutem Alkohol, Äther und Xylol unlöslich sind, können wir zu ihrer Aufsuchung nicht bloß Gefrierschnitte, sondern auch Zelloidin- und Paraffinschnitte benutzen und gewinnen dabei nicht nur den Vorteil dünnerer Schnitte, sondern auch den, daß zugleich die Lipide, speziell das mit basischen Farben tingible Lezithin, aus ihnen beseitigt sind.

Die Schnitte kommen auf etwa 20 Minuten in eine durch Schütteln mit Chloroform von dem verunreinigenden Methylviolett gereinigte Methylgrünlösung, werden dann in destilliertem Wasser abgespült und durch Alkohol in eine Mischung von Xylol und Bergamottöl aa und weiter in Balsam gebracht. Sie zeigen dann im ungefärbten Zelleib und ungefärbter Kerngrundsubstanz ein grünes Nukleoproteidgerüst und grüne Kernkörperchen.

Die grüne Färbung der Kernkörperchen bestätigt zunächst die schon durch die Chromolyse mit dem Farbenindex „blaues Polychrom“ gefundene Tatsache, daß die der Hauptmasse nach aus Globulin bestehenden Kernkörperchen eine Hülle von Nukleoproteiden besitzen, weist aber andererseits darauf hin, daß wir die wertvolle Eigenschaft des Methylgrüns nur dann vollkommen ausnutzen