

ZB MED - Informationszentrum Lebenswissenschaften

Histochemie der Haut

Unna, Paul Gerson

Leipzig [u.a.], 1928

ZB MED - Informationszentrum Lebenswissenschaften

Shelf Mark: Ui VI 1849

III. Farbenindex des ganzen Zelleibes: Methylgrün + Pyronin.

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

dieser CH_3Cl -Gruppe bedingt eben die Beständigkeit des Malachitgrüns gegenüber dem Methylgrün. Dieses aber ist durch den Besitz der reduktionsempfindlichen Gruppe CH_3Cl ein wichtiger Indikator geworden für das Vorhandensein der Nukleinsäure und ihrer sämtlichen Eiweißverbindungen, der es uns ermöglicht, bei pathologischen Verhältnissen unter der Menge der aus den Zellen frei gewordenen Eiweißpartikel immer noch die Kernabkömmlinge durch ihre grüne Farbe von den roten Plasmaresten zu unterscheiden.

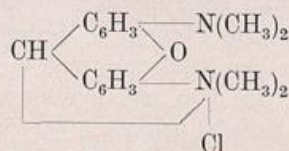
Ein einfacher Versuch belehrt über diese Empfindlichkeit des Methylgrüns gegenüber Alkalien und starken Reduzentien. Läßt man einen Tropfen einer 1%igen Methylgrünlösung auf ein Löschpapier fallen, der sich in Gestalt eines grünen Kreises ausbreitet, und setzt neben denselben sowohl einen Tropfen einer 1%igen Natronlösung wie einen zweiten Tropfen destillierten Wassers, zu dem man einige Körnchen Rongalit fügt, so dringen diese beiden Tropfen in Gestalt hellgeränderter, violetter Kreise in den grünen Kreis hinein. Es haben also sowohl das Alkali wie das saure, aber reduzierende Rongalit aus dem Methylgrün, durch Vernichtung der CH_3Cl -Gruppe Methylviolett frei gemacht. Dieser Versuch hat ein negatives Resultat, wenn man dem Methylgrün das Malachitgrün substituiert, welchem die $\text{N}(\text{CH}_3)_2 \cdot \text{CH}_3\text{Cl}$ -Gruppe fehlt; weder Alkalien noch Rongalit vermögen aus dieser Verbindung Methylviolett zu erzeugen.

III. Farbenindex des ganzen Zelleibes: Methylgrün + Pyronin.

Die wertvolle Eigenschaft des Methylgrüns, als Indikator der Nukleoproteide zu dienen, kommt erst völlig zur Geltung in seiner Kombination mit Pyronin, die wir Pappenheim verdanken.

Das Pyronin ist eine schön rote, basische Farbe von ähnlichem Bau wie das Methylenblau (vgl. dieses S. 6), bis auf die Zusammensetzung der Brücke ($\text{N}-\text{S}$).

Diese enthält hier statt des N die ebenfalls dreiwertige Gruppe CH und statt des gegenüberliegenden S die ebenfalls zweiwertige Gruppe O.



Dieses Pyronin gibt nicht bloß einen guten Farbenkontrast zum Methylgrün, sondern ist im Gegensatz zu diesem wählerischen Farbstoff sehr wenig empfindlich. Es färbt alle sauren Eiweiße wahllos an und besetzt daher alle Säureorte, die nicht, wie die Nukleoproteide, vom Methylgrün in Beschlag genommen werden. Das von Pappenheim benutzte Dibasichrom besteht aus einem Teil Pyronin und drei Teilen Methylgrün; mit ihm färbten sich die Lymphozyten des Blutes befriedigend. Als Pappenheim aber dieses Gemisch auf Gewebsschnitte anwenden wollte, versagte es, und Pappenheim fragte mich in dieser Verlegenheit um Rat. Ich riet ihm nach einigen Versuchen zur Anwendung einer Beize, und zwar einer Resorzinbeize, die sich denn auch bewährte. Bei dem großen Interesse derselben Fragestellung aber für die Haut nahm ich

die Anregung von Pappenheim auf und arbeitete eine für alle festen Gewebe passende Vorschrift der Methylgrün + Pyronin-Methode aus.

Dafür mußte sie in zwei wesentlichen Punkten verändert werden. Zunächst war das Verhältnis der beiden basischen Farben dem festen Gewebe anzupassen. In diesem war, entsprechend dem Vorwiegen reduzierender Gewebsmassen, das reduktionsliebende Pyronin gegenüber dem sauerstoffliebenden und reduktionsfeindlichen Methylgrün erheblich zu verstärken; statt 1 : 3 mußte es 5 (Pyronin) : 3 (Methylgrün) heißen. Sodann vereinfachte ich die Pappenheimsche Methode, indem ich die Beize der Farbflüssigkeit selbst einverleibte und das zuerst von mir vorgeschlagene Resorzin durch Karbolsäure ersetzte, während ein Zusatz von Alkohol die Niederschlagsfreiheit der komplizierten Mischung garantierte.

Die Ausfärbung nach Pappenheim-Unna geschieht also in folgender Weise. Man stellt sich die Mischung in diesen Verhältnissen her:

Methylgrün.	0·15
Pyronin	0·25
Alkohol	2·5
$\frac{1}{2}\%$ iges Karbolwasser ad	100·0.

1. Die Schnitte kommen in diese Mischung 20 Minuten kalt;
2. werden dann in (alkalischem) Leitungswasser kurz abgespült;
3. in Alkohol absolutus entwässert 1 Min. (!) und
4. durch Xylol in Öl und Balsam gebracht.

Diese Vorschrift genügt bei frischem Material oder solchem, das auf einem Wattebausch über absolutem Alkohol rasch gehärtet wurde. Wenn sich das Material in der sehr empfindlichen Farblösung weniger gut färbt, sei es, daß die Stücke in nicht absolutem Alkohol verweilt haben oder sonstwie geschädigt sind (z. B. durch provisorisches Einlegen in Formalin), so kann man es doch noch zu einer guten Färbung bringen, wenn man die Schnitte zuerst mit blauem Polychrom kräftig vorfärbt und dieses dann in einem zweiten Färbeakte durch die Mischung von Pyronin und Methylgrün verdrängt.

Durch eine gut ausgeführte Pyronin + Methylgrün-Färbung erhalten wir eine vorzügliche Abgrenzung der Nukleoproteide in der Zelle von den anderen sauren Eiweißen derselben. In dem mit pyroninrot gefärbtem Granoplasma mehr oder weniger erfüllten Zelleibe bemerken wir zunächst einen methylgrünen Kern (Bild 1). Mehr könnte man von einem mit zwei Farben arbeitenden Dibasichrom eigentlich nicht verlangen. Die Methylgrün + Pyronin-Methode leistet aber unerwarteterweise mehr. Bei ihr erscheinen nämlich vollständig eingeschlossen von dem Methylgrün des Kernes, im Innern des letzteren ein oder mehrere wiederum pyroninrote Kernkörperchen, welche trotz der gleichen Färbung nicht aus Granoplasma bestehen, wie die rote Substanz außen vom Kern im Zelleibe, sondern wie bereits oben (S. 10) erörtert, aus Globulin. Wir sehen also, daß unter besonders günstigen Verhältnissen mit einem Dibasichrom sogar drei saure Eiweiße scharf begrenzt und daher der mikrochemischen Analyse zugeführt werden können, dann nämlich, wenn sie in konzentrisch scharf geschiedenen Zonen liegen, so daß die Lokalisation jede Verwechslung ausschließt. Es gehört nur dazu, daß die gleichgefärbten, aber verschiedenen

Eiweiße überall durch die Substanz, welche die Kontrastfarbe aufnimmt, sauber getrennt sind, wie es hier der Fall ist. Durch diese günstige Farbenverteilung war es schon bald nach Bekanntgebung der chromolytischen Methode möglich, die chemische Differenz der zwei rotliebenden Eiweiße innen und außen von der Kernmembran zu bestimmen.

Legt man nämlich die betreffenden Gewebsschnitte vor der Färbung in destilliertes Wasser bei Körpertemperatur 24 Stunden oder bei 60° 6 Stunden, so ergibt die Pappenheim-Unna-Färbung ein vollständiges Fehlen des den Kern umgebenden Granoplasmas, während der Kernkörpercheninhalt intakt geblieben ist und nun dunkelrot aus dem blaßgrünen Kern noch schärfer als gewöhnlich hervorleuchtet. Die Zellenalbumose (Zytose)¹⁾ ist eben geschwunden, das Zellglobulin dagegen erhalten geblieben.

Dieser einfache Versuch zeigt recht eindringlich, daß die gleiche Färbung verschiedener Gewebsteile mit einer Farbe, wie hier mit Pyronin, noch kein Beweis für die chemische Gleichheit derselben, sondern immer nur ein Index dafür ist, ob sie durch unsere Lösungsmittel entfernt sind.

Ein weiteres Licht auf die chemische Natur wirft der ebenso einfache Lösungsversuch mit 2%iger Kochsalzlösung; dann ist weder außen vom Kern noch im Kernkörperchen ein pyroninrotes Eiweiß bei der Pappenheim-Unna-Färbung mehr zu finden. An Stelle des letzteren ist nur noch ein grüner Ring vorhanden. Nach einem dritten Lösungsversuch mit 1%iger Kalilösung ist auch dieser verschwunden, was seine Nukleoproteidnatur beweist.

Die Chromolyse auf Grund der Pappenheim-Unna-Färbung bestätigt also das Vorhandensein der drei sauren Eiweiße, wie wir sie bereits mit dem blauen Polychrom als Farbenindex gefunden haben. Sie gibt aber vermöge ihrer guten Farbenkontraste im kleinsten Raume dasselbe Resultat noch schärfer.

Wir werden diesen Farbenindex daher bei der genaueren Chromolyse der sauren Zelleiweiße vorzugsweise anzuwenden haben. Mittels derselben soll nun das, was wir bisher aus nur drei Lösungsversuchen — nach Art von Stichproben — entnommen haben, exakt bewiesen werden.

In der folgenden Tabelle sind die wichtigsten Lösungen (= 0) und Fällungen (= +) der beiden Eiweiße: Zytose und Globulin zum Vergleich gruppenweise aufgeführt. Die erste Gruppe umfaßt ihr Verhalten zu Wasser und Alkohol. Es zeigt sich, daß das Globulin des Kernkörperchens unter allen Umständen im Wasser unlöslich ist, während die Zytose des Plasmaleibes nur in der Kälte mehr oder weniger unlöslich (angedeutet durch 0+), bei Körpertemperatur und beim Erhitzen aber vollkommen löslich ist (Bild 1 und 2). Auch in der Alkoholgruppe zeigt sich eine Differenz zwischen Globulin und Zytose, indem von 33%igem wässerigen Alkohol Zytose bereits gelöst, Globulin gefällt wird, während in stärker prozentuiertem Alkohol beide Eiweiße unlöslich sind.

Die Gruppe der Säuren enthält zunächst Borsäure, die in 1%iger Lösung Globulin fällt, Zytose löst, in 4%iger Lösung beide fällt. Dann Essigsäure, die

¹⁾ P. G. Unna und Golodetz, Zur Chemie der Haut, X. Über Granoplasma und eine allgemeine Methode zur mikrochemischen Erforschung eiweißartiger Zellbestandteile. Dermatologische Wochenschrift 1913, S. 2.

P. G. Unna, Granoplasma. Enzyklopädie der mikroskopischen Technik 1926.

Vergleichstabelle der Chromolyse von Zytose und Globulin.

	Konzentration	Temperatur	Zytose	Globulin
Aqua dest.		kalt	0 +	+
Aqua dest.		37°	0	+
Aqua dest.		90°	0	+
Alkohol	33 %		0	+
Alkohol	65—96 %		+	+
Borsäure	1 %		0	+
Borsäure	4 %		+	+
Essigsäure	10 %		+	+
Essigsäure	100 %		+	0
HCl und H ₂ SO ₄	1 % 1 % 5 %		+	+
HNO ₃	1 %		+	+
HNO ₃	5 %		+	+
HNO ₃	10 %		0	0
Kochsalz	2 %		0	0
Kochsalz	gesättigt		+	+
Kochsalz mit 2 % Essigsäure angesäuert	2 %	kalt	+	+
Kochsalz mit 2 % Essigsäure angesäuert	2 %	90°	0	0
Ammoniumsulfat	2 %		0	0
Natriumsulfat				
Ammonsulfat	gesättigt		+	+
Natriumsulfat				
Zinksulfat	2 %		+	+
Magnesiumsulfat	gesättigt		+	+
Bleiazetat			+	+
Silberazetat				
Kupferazetat	2 %		0	+
Kupfersulfat				
Gerbsäure			+	+
Pikrinsäure				
Trichloressigsäure				
Phosphorwolframsäure mit HCl angesäuert			+	+
Phosphormolybdänsäure mit HCl angesäuert				
Jodkaliumjodquecksilber mit HCl angesäuert				
Jodkaliumlösung			+	+
Jodtinktur				
Bromwasser				
Pepsin 0, 5 % + HCl 0, 2 % . . .	1 %		0	+

unter allen Umständen Zytose fällt, Globulin in 10%iger Lösung ebenfalls fällt, aber in 100% löst. Es folgen die Mineralsäuren, HCl und H_2SO_4 , die in 1%iger und 1%iger Lösung beide Eiweiße fällen, aber von 5%iger Lösung angefangen beide lösen (Bild 4). Diese Lösung bei höherer Konzentration beginnt bei HNO_3 erst mit 10%.

In der Neutralsalzgruppe treffen wir zuerst NaCl, das bei 2% beide Eiweiße löst (Bild 3), bei Sättigung beide fällt, bei Zusatz von Essigsäure aber auch schon bei 2% beide fällt, um sie bei Erhitzung auf 90° wieder in Lösung zu bringen. Ebenso wie Kochsalz verhalten sich Ammonsulfat und Natriumsulfat, während Zink- und Magnesiumsulfat in allen Konzentrationen fällen, ebenso Blei- und Silberazetat. Isoliert stehen Kupferazetat und -sulfat da, welche in 2%iger Lösung Zytose lösen, aber Globulin fällen.

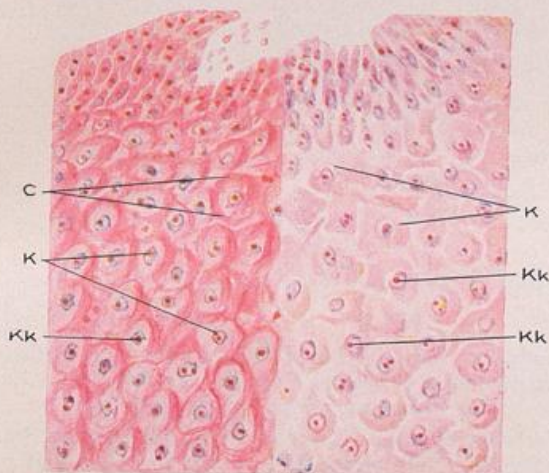


Bild 1.

Bild 2.

Bild 1. Epithelzellen. Spitzes Kondylom. Paraffinschnitt. Pappenheim-Unna-Färbung: Zytose (C) rot, Kerne (K) grünlichblau, Kernkörperchen (Kk) rot.

Bild 2. Dasselbe. Vorbehandlung mit warmem Wasser. Zytose (C) verschwunden, Kerne (K) und Kernkörperchen (Kk) erhalten, Schlußfolgerung: Zytose ist wasserlöslich, Nukleoproteide und Globulin der Kernkörperchen nicht.

In der Tabelle folgen nun die Alkaloidfällern: Gerbsäure, Pikrinsäure, Trichloressigsäure, angesäuerte Phosphorwolfram- und -molybdänsäure, Jodkaliumjodquecksilber, dann noch Jodkaliumlösung, Jodtinktur und Bromwasser. Alle diese Reagenzien fällen beide Eiweiße. Den Schluß macht Pepsin + HCl, welches Zytose löst, Globulin fällt. Alle diese Lösungs- und Fällungsreaktionen sind ebenso gut an Schnitten nachzuweisen mit Benutzung der Methylgrün + Pyronin-Methode als Farbenindex wie makrochemisch an Globulinlösungen (z. B. aus Pferdeblut, Kuhmilch) und an der im großen gewonnenen Zytose.

Überblickt man die ganze Tabelle, so erkennt man nur an sechs Stellen, die durch Rahmen hervorgehoben sind, Unterschiede zwischen Zytose und Globulin. Diese betreffen Wasser und Alkohol, Borsäure und Essigsäure,

Kupfersalze und Pepsin + HCl. Die Lösung in 1%iger Borsäure gibt ein bequemes Mittel, die Zytose aus den Geweben im großen rein zu gewinnen, ohne Verunreinigung durch Globulin und ohne daß bakterielle Zersetzungen stattfinden.

Gleich verhalten sich Zytose und Globulin gegenüber 2%igem Kochsalz und 5%iger Salzsäure als Lösungsmittel. Die Figuren 3 und 4 geben die betreffenden Bilder an Schnitten von spitzem Kondylom mit dem Färbungsindex:

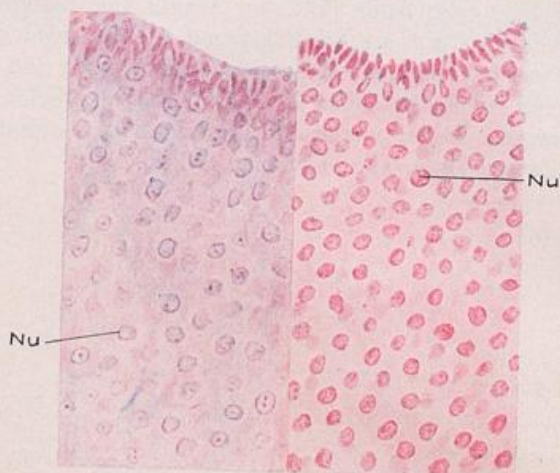


Bild 3.

Bild 4.

Bild 3. Spitzes Kondylom. Paraffinschnitt. Pappenheim-Unna-Färbung. Vorbehandlung mit 2%iger Kochsalzlösung: Zytose und Globulin verschwunden. Nukleoproteide (Nu) der Kerne gequollen, nahezu unfärbbar.

Bild 4. Dasselbe. Vorbehandlung mit 5%iger Salzsäure: Globulin und Zytose verschwunden. Nukleoproteide in Nuklein (Nu') verwandelt, scharf konturiert und pyroninrot gefärbt.

Pappenheim-Unna. In beiden ist sowohl Zytose wie Globulin aus den Epithelzellen verschwunden, und doch besteht ein wesentlicher Unterschied zwischen ihnen. Derselbe beruht auf dem Verhalten der Nukleoproteide gegen Salze einerseits, Säuren andererseits. In Kochsalz (Bild 3) quellen dieselben bis zur Unfärbbarkeit, in Salzsäure treten sie im Gegenteil schärfer hervor (Bild 4), da sich die Nukleoproteide dabei in Nuklein umwandeln, welches ganz säureunlöslich ist.

B. Darstellung der basischen Zelleiweiße durch saure Färbungen. — Farbenindex: Bordo — Hämatein + Alaun-Färbung.

I. Die basischen Kerneiweiße.

Ein Fundamentalsatz der Zellchemie besagt, daß, wenn durch geeignete Lösungsmittel sämtliche saure Eiweiße aus dem Zellleibe herausgelöst sind, ein Zellenrumpf zurückbleibt, der aus