

# DIE HISTOLOGISCHE FÄRBUNG MIT DEM FLUOROCHROM DIOXYPYRENDISULFO-SAURES NATRIUM

Mit

5 Abbildungen

Von PRIV.-DOZ. DR. med. NORBERT SCHÜMMELFEDER  
und DR. med. KARL-BERND PFENNINGS

(Pathologisches Institut der Universität Münster, Westfalen.  
Direktor: Prof. Dr. med. H. Siegmund)

Die histologische Anfärbung toter Gewebssysteme mit wohldefinierten Farbstoffen erlaubt keine bindende Aussage über den physiologischen oder pathologischen Zustand der Zellen und Gewebe im Leben, denn die Färbungserscheinungen sind grundsätzlich unterschiedlich, und diese Änderung tritt mit dem Zelltod ein. Die Fixierung des Gewebes vermag zwar die histologische Färbbarkeit weitgehend zu beeinflussen, das Wesen der postvitalen Färbung ändert sie jedoch meistens nicht. Histologische und vitale Färbung unterscheiden sich nicht nur dadurch, daß abgestorbene Zellen nicht mehr die besonderen Permeabilitätsverhältnisse und Speicherfähigkeiten der lebenden Zellen besitzen, sondern es treten außerdem noch weitgehende Veränderungen physikalisch-chemischer Natur ein, deren Ausmaß durch die Art der Fixierung sehr stark beeinflußt werden kann (RIES, [1]). Nach Untersuchungen von PISCHINGER (2), ZEIGER (3) u. a. soll die histologische Färbung, d. h. also die Anfärbung toten Gewebematerials, in erster Linie von physikalisch-chemischen Faktoren, und zwar besonders den elektrostatischen Ladungsverhältnissen zwischen Substrat und Farbstoff, abhängig sein. Die Anfärbung histologischer Strukturen erscheint nach den genannten Untersuchern im wesentlichen als eine Elektroadsorption ungleich geladener Teilchen. Für das basische Fluorochrom Akridinorange konnte SCHÜMMELFEDER (4) an tierischem Gewebe in weitgehender Übereinstimmung mit STRUGGER (5) und Mitarbeiter, welche an pflanzlichen Objekten arbeiteten, feststellen, daß es sich bei der histologischen Anfärbung toten, unfixierten Gewebematerials mit diesem Farbstoff zwar zum überwiegenden Teil um Elektroadsorption an Zelleiweißkörper handelte, ein geringerer Teil des Fluorochroms (in seiner Menge von der Zellart abhängig wurde jedoch auch mittels VAN-DER-WAALSscher Adsorption gespeichert.

Zu den bisher durchgeführten histologischen Färbeversuchen an tierischen Geweben (PISCHINGER, ZEIGER, RIES u. a.) wurden fast ausschließlich Hellfeldfarbstoffe (Diachrome) benutzt, während Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorochrome) zwar empirisch zur histologischen Färbung angewandt wurden (HAITINGER [6] u. a.), doch fehlten, von wenigen Ausnahmen abgesehen, Färbungsversuche mit physikalisch-chemisch gut untersuchten Fluorochromen, welche nicht nur differenzierte Farbbilder geben, sondern auch auf das Wesen der histologischen Färbungserscheinungen Rückschlüsse erlauben. Fluorochrome besitzen für derartige Untersuchungen den erheb-

lichen Vorteil der hohen Nachweisempfindlichkeit, welcher es erlaubt, den Farbstoff in relativ geringer Konzentration zur Färbung anzuwenden und ihn auch in kleinsten Mengen innerhalb der Zellen und Gewebe nachweisen zu können.

Die eigenen Untersuchungen wurden durchgeführt, um festzustellen, inwieweit die Färbung histologischer Schnittpräparate von tierischen Geweben mit sauren Farbstoffen abhängig ist von dem Dissoziationsgrad des verwendeten Farbstoffes, und um den Versuch zu machen, den Mechanismus dieser Färbung aufzuklären. Wir benutzten für die vorliegenden Versuchsreihen den Fluoreszenzfarbstoff Dioxypyrendisulfosaures Natrium<sup>1)</sup> (chemische Formel in Abb. 1).

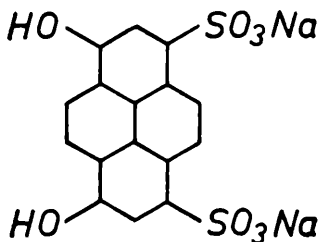


Abb. 1. 3-10-oxy-5-8-pyrendisulfosaures Natrium.

Dieser Farbstoff wurde von STRUGGER (5) erstmalig für pflanzenphysiologische Untersuchungen benutzt, und es wurden hierbei in seinem Institut durch PERNER (7) die physikalisch-chemischen Konstanten desselben festgestellt. Es handelt sich bei dem Dioxypyrendisulfosauren Natrium um einen sauren Farbstoff, dessen Eigenfarbe in gepufferten Farblösungen  $p_H$ -abhängig ist. Frisch angesetzte Lösungen haben bis zu einer Wasserstoffionenkonzentration vom  $p_H$  4,8 eine schwach gelbliche Eigenfarbe, die mit zunehmendem  $p_H$ -Wert stärker wird, bis ab  $p_H$  7,0 die Farblösungen im alkalischen Bereich grün erscheinen. Auf Grund dieser Indikatoreigenschaft wurde durch PERNER kolorimetrisch die Dissoziationskurve bestimmt (Abb. 2). Die Fluoreszenzfarbe des Dioxypyrendisulfosauren Natriums ändert sich ebenfalls mit steigendem  $p_H$ -Wert. Bis zu  $p_H$  5,0 zeigen saure Lösungen ein intensives Eisblau. Bei Näherung an den Neutralpunkt verändert sich die Fluoreszenzfarbe durch Beimischung seegrüner Farbnuancen, im neutralen und alkalischen Bereich ist ein intensives Laubgrün charakteristisch. Die angesetzten Farblösungen verändern sich im Hellen und Dunklen in gleicher Weise verhältnismäßig rasch durch Alterung. Bereits nach 2 bis 3 Tagen tritt eine Vertiefung und später Änderung der Eigenfarbe zu Braun ein, bis nach 5—6 Tagen die Lösungen vollkommen un-

<sup>1)</sup> Herrn Prof. Dr. S. STRUGGER (Botanisches Institut der Universität Münster) danken wir für die freundliche Überlassung des Farbstoffes.

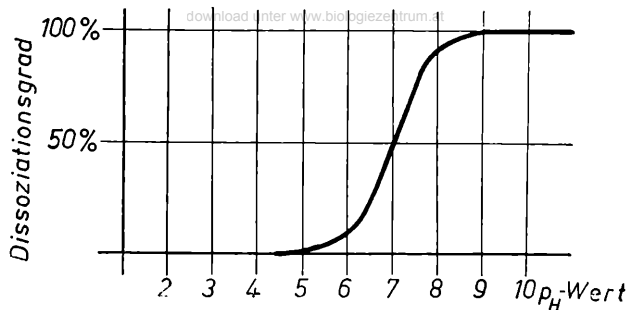


Abb. 2. Dissoziationskurve des 3-10-oxo-5-8-pyrendisulfosauren Natriums (nach PERNER).

durchsichtig sind. Die Fluoreszenzfarbe bleibt zunächst erhalten, wie wir ebenso wie PERNER feststellen konnten, doch beginnt nach mehreren Wochen die Fluoreszenzintensität der Lösungen nachzulassen. Nach etwa einem halben Jahr ist eine Fluoreszenz an den gealterten Lösungen nicht mehr festzustellen. Bei der Alterung der Farblösungen tritt eine geringfügige Dispersitätsverminderung ein, wie aus dem Diffusionsverhalten (Abb. 3) erkannt werden kann.

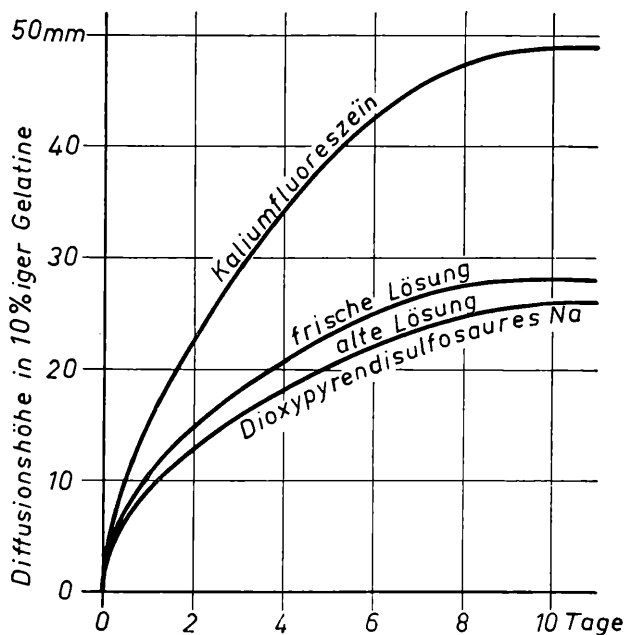


Abb. 3. Diffusionskurve des Dioxyppyrendisulfosauren Natriums (nach PERNER).

Aus dem Kurvenverlauf der Abb. 3 geht hervor, daß es sich bei dem angewandten Fluorochrom um einen gut diffusablen Farbstoff handelt, der allerdings die Werte des Kaliumfluoreszeins nicht erreicht. Die mit dem Altern der Lösungen einhergehende Verringerung der Dispersität des Farbstoffes scheint nach den Versuchen von PERNER geringfügig zu sein. Wesentlich für die theoretische Deutung des Färbungsausfalles ist die Tatsache, daß der untersuchte Farbstoff weder als Ion noch im molekularen Zustand lipoidlöslich ist, dagegen sich in Wasser leicht löst (PERNER).

## Eigene Untersuchungen

### Methodik

Die Untersuchungen wurden durchgeführt mit einer Fluoreszenzeinrichtung, die in den wesentlichen Punkten mit der von ELLINGER und HIRT (8) benutzten übereinstimmte. Sie bestand aus einer großen Lumineszenzbogenlampe (Fabrikat „Leitz“), welche mit gewöhnlichen Kohleelektroden besetzt war. Die Wärmestrahlung der Lampe und das äußerste rote Ende des Lichtspektrums wurden durch eine vorgeschaltete Küvette von 10 cm Schichtdicke, gefüllt mit 10%iger, angesäuertes Kupfersulfatlösung, absorbiert. Auf dieses Flüssigkeitsfilter folgte ein UG-Filter (Schott & Gen.) von 2 mm Dicke, wodurch das restliche sichtbare Licht aus dem Strahlengang entfernt wurde. Das Filter läßt ultraviolette Strahlen zwischen den Wellenlängen 3500 Å und 4000 Å passieren. Als Mikroskop diente ein übliches Zeißmodell. Zur Ausschaltung der noch durch das Okular gelangenden UV-Strahlung wurde ein Okularsperrfilter (Euphosglas) benutzt.

Bei Objektivvergrößerungen bis zur 30fachen war ohne weiteres ein klares Fluoreszenzbild sichtbar. Wurden jedoch stärkere Vergrößerungen angewandt, so machten sich Überstrahlungen störend bemerkbar. Einzelne Gewebsanteile leuchteten so stark, daß andere, schwächer fluoreszierende Nachbarpartien überstrahlt und somit unscharf abgebildet wurden. Hier mußte das sichtbare Licht gedämpft werden, doch bezog sich dies nur auf das sichtbare Licht, das von den selbstleuchtenden Teilchen des Objektes ausgestrahlt wurde, und nicht auf jenes der Bogenlampe. Zur Dämpfung des sichtbaren Fluoreszenzlichtes wurden bei stärkeren Objektiven eingebaute Irisblenden benutzt, wodurch zwar lichtschwächere, aber schärfer begrenzte Bilder mit größerer Tiefenschärfe erreicht wurden.

Zur Durchführung der Färbungsversuche mit Dioxypyrendisulfosaurem Natrium wurde Nierengewebe gewählt. Es kam unfixiertes und in verschiedener Weise gehärtetes Gewebe zur Anfärbung. Das Gewebematerial wurde bei Leichenobduktionen gewonnen. Eingefärbt wurden Mikrotomschnitte, die vom unfixierten und formalinfixierten Gewebe mittels Gefrier Technik gewonnen wurden. In Alkohol oder Carnoy'scher Flüssigkeit gehärtetes Gewebe wurde in Paraffin eingebettet, geschnitten und nach Entparaffinierung gefärbt. Von jeder Versuchsserie wurden Kontrollschnitte ohne Anfärbung im UV-Licht auf ihre Eigenfluoreszenz (Primärfluoreszenz) geprüft, damit eine einwandfreie Bewertung der Sekundärfluoreszenz nach Färbung gewährleistet war.

Es ergaben sich somit vier verschiedene Versuchsserien:

- a) unfixiertes Gewebe,
- b) in 4% igem Formalin fixierte Gewebestücke,
- c) in 96% igem Alkohol fixiertes Gewebe,
- d) in Carnoy'scher Flüssigkeit gehärtetes Gewebe.

Da der Farbstoff in seiner Dissoziation eine starke  $pH$ -Abhängigkeit aufweist, wurden die Anfärbungen bei unterschiedlichen  $pH$ -Werten der Farblösungen vorgenommen:

- A.  $pH$  4,6 (Farbstoff nicht dissoziiert),
- B.  $pH$  5,6 (Beginn der Dissoziation),
- C.  $pH$  6,4 (etwa  $\frac{1}{5}$  des Farbstoffes dissoziiert),
- D.  $pH$  9,9 (Farbstoff vollkommen dissoziiert).

Als Puffergemische wurden isotonische Natriumphosphatpuffer verwendet, in denen jeweils auch der Farbstoff gelöst war. Die Wasserstoffionenkonzentration der Puffer- und Farblösungen wurde elektrometrisch bestimmt.

Der Färbevorgang gestaltete sich für jedes Schnittpräparat nach folgendem Schema:

- |   |            |
|---|------------|
| 1. Vorbehandlung in farbfreier Pufferlösung   | 10 Minuten |
| 2. Färbung in gepufferter Farblösung . . . . .  | 10 Minuten |
| 3. Auswaschen in reichlicher Menge farbfreier Pufferlösung  | 10 Minuten |
| 4. Eindecken des Präparates in entsprechender Pufferlösung bei unfixierten Schnittpräparaten oder in fluoreszenzfreiem Paraffinöl bei fixiertem Material. |            |

Von jeder Serie wurden jeweils einige gefärbte Schnittpräparate nach der Färbung für längere Zeiten (24—36 Stunden) mit Puffergemischen ausgewaschen.

## Versuchsergebnisse

### a) Unfixiertes Gewebe

Die ungefärbten Schnitte weisen im UV-Licht eine kaum wahrnehmbare, blaugrünliche Eigenfluoreszenz auf. Die Glomeruli, insbesondere die Bowmannsche Kapsel, und die ableitenden Gangsysteme der Zona basalis fluoreszieren heller als die eben erkennbaren Tubulusabschnitte. Infolge der unterschiedlichen Fluoreszenzintensität sind die einzelnen Abschnitte des Nephrons relativ gut voneinander abgrenzbar. Die elastischen Fasern zeigen eine helle, weißlich-violette Eigenfluoreszenz, wodurch die Blutgefäße im Präparat besonders deutlich erkannt werden können. Suspendierung der Schnittpräparate in den farbfreien Pufferlösungen verstärkte in allen untersuchten  $pH$ -Bereichen geringfügig die Intensität der Eigenfluoreszenz, wobei weder der Farbton noch das unterschiedliche Verhalten der einzelnen Gewebsabschnitte verändert wurde.

Die nach der oben angegebenen Methodik gefärbten Schnittpräparate lassen die im folgenden beschriebene Sekundärfluoreszenz erkennen:

#### *A. Puffer- und Farblösung vom $pH$ 4,6*

Elastisches Gewebe hellviolett, dabei stärker leuchtend als in den ungefärbten Schnittpräparaten. Das Nierenparenchym weist im ganzen gesehen eine stark leuchtende, helle, seegrüne Fluoreszenz auf. Die einzelnen Abschnitte des Nephrons sind infolge unterschiedlicher Leuchtintensität gut voneinander abzugrenzen. Die verhältnismäßig flachen Epithelien der Tubuli contorti II fluoreszieren erheblich schwächer als die höheren Tubulus-

epithelien. Die einzelnen Epithelzellen können nicht voneinander abgegrenzt werden, ebensowenig sind innerhalb der Zellen Kerne oder sonstige Strukturen sichtbar. Die Malpighischen Körperchen zeigen, abgesehen von der etwas heller leuchtenden Bowmannschen Kapsel, nur eine wenig stärkere Fluoreszenz als die Epithelien der Tubuli contorti II. Das interstitielle Gewebe gleicht in seiner Fluoreszenzstärke den Kapillarschlingen der Glomeruli. Die Erythrozyten innerhalb der Gefäße zeigen eine sehr schwache, gelbliche Fluoreszenz und sind von einem stärker leuchtenden grünlichen Hof umgeben.

Längeres Auswaschen der Schnittpräparate mit entsprechender Pufferlösung ( $pH$  4,6) führte zu keiner Abnahme der Fluoreszenzintensität oder Änderung der Fluoreszenzfarbe.

#### *B. Farb- und Puffergemisch vom $pH$ 5,6*

Im ganzen gleicht das Bild der gefärbten Präparate weitgehend dem der vorhergehenden Serie bei  $pH$  4,6. Die Farbe ist dabei mehr nach laubgrün verschoben, und es ist eine geringfügige Abschwächung der Leuchtintensität eingetreten.

Wurden die Schnittpräparate längere Zeit bei  $pH$  5,6 mit Pufferlösungen ausgewaschen, so ergab sich kein Unterschied zu den nur 10 Minuten lang behandelten Präparaten.

#### *C. Puffer- und Farblösung vom $pH$ 6,4*

Die Helligkeitsabnahme gegenüber der ersten Versuchsreihe hat stärkere Grade erreicht, dabei ist jetzt der Farbton der Fluoreszenz eindeutig laubgrün. In einzelnen Epithelien sind die Kernterritorien von einem dunkleren Hof umgeben und daher abgrenzbar.

Auch hier veränderte längeres Auswaschen das Bild nicht.

#### *D. Farb- und Puffergemische vom $pH$ 9,9*

Die sichtbaren Fluoreszenzerscheinungen gleichen vollkommen denen des ungefärbten Gewebes. Nur die Primärfluoreszenz ist zu erkennen, und zwar in gleicher Leuchtstärke und Farbtönung wie bei den mit farblosen Pufferlösungen der gleichen Wasserstoffionenkonzentration behandelten Schnittpräparaten.

### **b) Formalinfixiertes Nierengewebe**

Die Primärfluoreszenz der formalinfixierten Nierenschnitte ist gering, wenn auch etwas heller als die des unfixierten Schnittmaterials. Der allgemeine Fluoreszenzfarbton ist matt graublau, doch lassen sich morphologisch die einzelnen Abschnitte des Nephrons einigermaßen gut voneinander abgrenzen, da sie sich in ihrer Leuchtintensität und Farbtönung unterscheiden. In der genannten Farbnuance und Helligkeit leuchten die

Glomeruli und die flacheren Epithelien der Tubuli contorti II. Die übrigen Epithelien fluoreszieren heller in einem mehr blaugrünen Farbton. Das elastische Gewebe, insbesondere innerhalb der Gefäßwände, fluoresziert hellblau bis blauviolett. Eine Abgrenzung der Zellterritorien oder die Erkennung von Einzelheiten innerhalb der Zellen ist nicht möglich.

Die mit ungefärbten Pufferlösungen vorbehandelten Schnittpräparate lassen unabhängig vom  $p_H$ -Wert bei Erhaltung der gleichen Farbtonung eine geringfügige Steigerung der Primärfluoreszenz erkennen.

#### *A. Einfärbung mit Farblösungen vom $p_H$ 4,6*

Helle eisblaue bis weißlich-seegrüne Fluoreszenz des gesamten Schnittpräparates. Die Leuchtintensität zeigt in den einzelnen Nierenabschnitten erhebliche Differenzen, so daß eine morphologische Abgrenzung der verschiedenen Teile des Nephrons ermöglicht wird. Die flachen Epithelien des zweiten Hauptstückes, des Überleitungsstückes und der Sammelröhren leuchten ebenso wie die Glomeruli schwächer als die hohen Epithelien des ersten Hauptstückes. Das interstitielle Gewebe der Zona basalis fluoresziert heller als das Epithel der Ausführungsgänge in teils seegrünem, teils gelbgrünem Farbton. Das elastische Gewebe tritt in seiner Leuchtintensität nicht besonders hervor. Die Grenzen der Epithelzellen können kaum erkannt werden, nur in Einzelfällen lassen aus dem Verband gelockerte Zellen eine Anreicherung des Farbstoffes an den Zellgrenzflächen erkennen. Das Verhalten der Kerne der Zellen ist unterschiedlich. Die Epithelzellkerne sind teilweise heller leuchtend als das Plasma, das gleiche gilt auch für einen Teil der Kerne des Endothels der Glomerulusschlingen. Andere Epithelzellkerne sind jedoch als dunkle Gebilde ausgespart, ihre Grenze zum Zellplasma ist als heller, seegrüner Hof deutlich sichtbar. Die Kerne der Bindegewebszellen sind durchweg prägnanter gefärbt.

#### *B. Farb- und Pufferlösungen vom $p_H$ 5,6*

Bei gleicher Farbtonung und -verteilung ist die Leuchtintensität in allen Abschnitten etwas geringer. Zellgrenzen sind dabei deutlicher auszunehmen als in den Schnittpräparaten der vorhergehenden Serie.

#### *C. Puffer- und Farbgemische vom $p_H$ 6,4*

Erhebliche Abnahme der Leuchtstärke des Präparates. Der Fluoreszenzfarbton ist bei dieser Wasserstoffionenkonzentration hell laubgrün. Die einzelnen Nierenabschnitte zeigen sonst gleiches Verhalten wie bei den beiden vorhergehenden Versuchsansätzen, nur das elastische Gewebe läßt stärker den blauvioletten Farbton der Primärfluoreszenz erkennen.

#### *D. Einfärbung der Präparate bei $p_H$ 9,0*

Das Bild gleicht vollkommen dem des ungefärbten Präparates. Eine Farbstoffaufnahme durch das Gewebe konnte nicht nachgewiesen werden.

Ein Teil der nach der angegebenen Methodik eingefärbten Präparate wurde entsprechenden Pufferlösungen 36 Stunden lang ausgewaschen. Die bei  $p_H$ -Werten von 4,6 und 5,6 behandelten Schnittpräparate zeigten keine Abnahme der Leuchtintensität, es waren jedoch die beschriebenen Einzelheiten infolge besserer Differenzierung deutlicher sichtbar. Die in Lösungen vom  $p_H$  6,4 eingefärbten und danach 36 Stunden ausgewaschenen Gewebsschnitte zeigten zwar noch den grünen Farbton des Dioxyppyrendisulfosauren Natriums, doch war die Leuchtintensität gegenüber den nur 10 Minuten lang ausgewaschenen Schnitten derart herabgesetzt, daß sie sich von der Primärfluoreszenz nicht wesentlich unterschied.

### c) Alkoholfixiertes Nierengewebe

Gegenüber dem formalinfixierten Material ist eine Zunahme der Eigenfluoreszenz festzustellen, diese erreicht fast die Helligkeit der Sekundärfluoreszenz des unfixierten Gewebes nach Einfärbung mit Dioxyppyrendisulfosaurem Natrium aus sauren Farblösungen. Der Farbton der Fluoreszenz ist grauweiß unter Beimengung einer blaugrünen Farbkomponente. Die einzelnen Nierenabschnitte sind gut voneinander zu unterscheiden, wobei sich die Epithelien des Tubulusapparates im Gegensatz zum unfixierten Material durch helleres Leuchten hervorheben.

#### A. Einfärbung bei $p_H$ 4,6

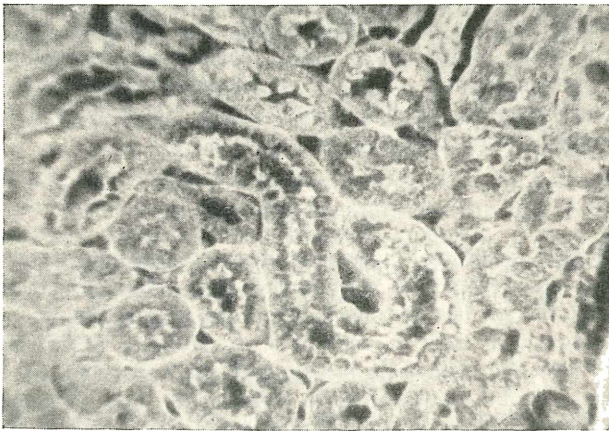
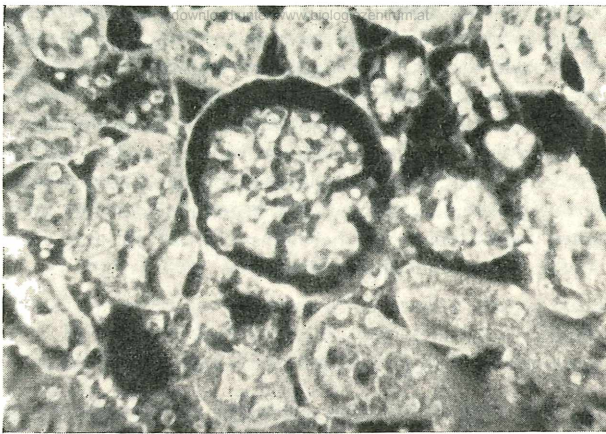
Strahlend helle, seegrüne Fluoreszenz, deren Leuchtintensität weit diejenige der gefärbten unfixierten und formalinfixierten Schnittpräparate übertrifft. Die Tubulusepithelien des gesamten Nephrons übertreffen in untereinander gleicher Helligkeit in ihrer Leuchtstärke die übrigen Gewebelemente. Die Kerne der Epithelien sind teils kräftig gefärbt, teils sind sie mit der Ölimmersion als dunkle Aussparungen erkennbar. Die einzelnen Epithelzellen sind häufig infolge Farbstoffanreicherung an den Zellgrenzflächen deutlich voneinander abgrenzbar. Die Glomeruli leuchten weniger stark, ebenso das interstitielle Gewebe, wobei in diesem jedoch einzelne Bindegewebsfasern heller aufleuchten. Die elastischen Elemente der Gefäßwände zeigen eine gegenüber den ungefärbten Schnittpräparaten verstärkte blauviolette Fluoreszenz. Die Erythrozyten in den Gefäßen fluoreszieren schwach gelblich, während die weißen Blutzellen sowie das Plasmaeiweiß hellgrün leuchten.

Alkoholfixiertes Gewebe einer unmittelbar nach dem Tod entnommenen Meerschweinchenniere zeigte die gleichen Fluoreszenzerscheinungen (Abb. 4 und 5).

#### B. Färbung mit Lösungen vom $p_H$ 5,6

Kein Unterschied zu der Färbung bei einem  $p_H$ -Wert von 4,6.





*Abb. 4 und 5.*

*Meerschweinchenniere. Fixation in 96% igem Äthylalkohol. Paraffineinbettung. Dioxyipyrendisulfosaures Natrium 1 10.000 in Phosphatpuffer vom pH 4,6. Färbedauer 10 Minuten. Fernrohrmiflex mit Kontax (Zeiß). Agfa ISS <sup>23</sup>/<sub>10</sub><sup>0</sup> Din. Objektiv 30: 1. Okular 6X.*

#### *C. Farb- und Pufferlösungen vom pH 6,4*

Abgesehen von einer Farbänderung zu Laubgrün und einer erheblichen Abschwächung der Lichtstärke ist das morphologische Bild des Präparates ohne Unterschied zu den vorhergehenden.

### D. Farb- und Pufferlösungen vom $pH$ 9,9

Kein Unterschied in Fluoreszenzintensität und -farbe zur Primärfluoreszenz der ungefärbten Präparate.

Längeres Auswaschen der Schnittpräparate mit den jeweiligen Pufferlösungen führte zu keiner Änderung des Fluoreszenzbildes.

#### d) Fixierung des Gewebes in Carnoyscher Flüssigkeit

Weder die Primärfluoreszenz der ungefärbten Präparate noch die Lumineszenzerscheinungen nach Einfärbung mit Dioxyppyrendisulfosaurem Natrium unterscheiden sich von den in 96%igem Alkohol fixierten Gewebepreparaten. Wir verweisen daher auf die obige Beschreibung.

## Erörterung der Ergebnisse

Da an dieser Stelle in erster Linie das Wesen der Färbung mit dem sauren Fluorochrom Dioxyppyrendisulfosaures Natrium interessiert, bringen wir in Tabelle 1 eine kurze Zusammenstellung der für diesen Punkt wichtigen Ergebnisse.

Tabelle 1

Farbe und Intensität der Sekundärfluoreszenz nach Einfärbung mit Dioxyppyrendisulfosaurem Natrium im Plasma der Tubulusepithelien

pH der Lösungen	Färbergebnis			
	unfixiertes Gewebe	formalin- fixiertes Gewebe	alkohol- fixiertes Gewebe	nach Carnoy fixiertes Gewebe
4,6	++(+) seegrün hell	+++ eisblau — seegrün hell	++++ seegrün hell	++++ seegrün hell
5,6	++ grün hell	++(+) seegrün hell	++++ seegrün hell	++++ seegrün hell
6,4	+ laubgrün	+(+) laubgrün	+(+) laubgrün	+(+) laubgrün
9,9	0 nur Eigen- fluoreszenz	0 nur Eigen- fluoreszenz	0 nur Eigen- fluoreszenz	0 nur Eigen- fluoreszenz

Aus den Versuchsergebnissen geht hervor, daß Dioxyppyren-disulfosaures Natrium nur in molekularer Form vom toten (!) Zytoplasma aufgenommen und gespeichert wird. Dieses Ergebnis stimmt auffallend gut überein mit den Befunden von PERNER (7) an lebenden (!) Zellen der Oberepidermis der Zwiebelchuppe von *Allium cepa*, bei denen sich eine kräftige Färbung des Vakuoleninhaltes der Zellen aus Farblösungen vom pH 3,15—5,42 und eine schwächere Anfärbung bis pH 6,28 zeigte. Allerdings wurde bei diesen Untersuchungen an lebenden pflanzlichen Zellen eine entsprechende Anfärbung des Vakuoleninhaltes erst nach erheblich längeren Färbezeiten (bis zu 24 Stunden) gefunden. Im Gegensatz zu den eigenen Befunden an toten tierischen Zellen fand PERNER jedoch keine Anfärbung des Zellplasmas oder der Kerne. Hier machen sich die bereits eingangs erwähnten unterschiedlichen Permeabilitäts- und Speicherungsverhältnisse bei lebenden und toten Zellen deutlich bemerkbar. Die Speicherung des Farbstoffes im Vakuoleninhalt der pflanzlichen Zelle beweist jedoch, daß auch das lebende Protoplasma für das undissoziierte Farbmolekel in einem gewissen Ausmaß permeabel ist.

Es fragt sich nun, an welche Zellbausteine in den eigenen Versuchen der saure Farbstoff gebunden wird. Eine Lösung des Farbstoffes in der lipoiden Phase des Zytoplasmas ist ausgeschlossen, da das Fluorochrom Dioxyppyren-disulfosaures Natrium extrem lipoidunlöslich ist (STRUGGER [5] PERNER [7]). Auch kann der Farbstoff nicht allein nach Diffusion in der wässrigen Phase der Intermizellarräume des abgestorbenen Zytoplasmas festgehalten werden, da in den sauren Farblösungen nicht nur ein Konzentrationsausgleich stattfindet, sondern der Farbstoff über die Höhe der Außenkonzentration hinaus gespeichert wird. Wenn es sich um einen einfachen Diffusionsvorgang handeln würde, so müßte gefordert werden, daß der Farbstoff relativ leicht auswaschbar sein würde. Dies konnte jedoch in den eigenen Versuchen mit bis zu 36 Stunden langem Auswaschen nicht festgestellt werden. Als Erklärungsmöglichkeit bleibt somit einmal die Annahme einer elektroadsorptiven Bindung der sekundär im Gewebe dissoziierten Farbanionen an positiv geladene Zellkolloide und (bzw. oder) eine echte (elektro-neutrale) Adsorption der Farbmolekel mit Hilfe VAN-DER-WAALSscher Kräfte an kolloidale Strukturen der Zellen. Die chemische Bindung (Chemisorption), welche STRUGGER (1937) noch gesondert als theoretische Möglichkeit für die Speicherung von Farbstoffen angibt, ist an sich nicht grundsätzlich unterschiedlich von der elektroadsorptiven Bindung. Durch die bisherigen eigenen Untersuchungen kann keine Entscheidung für die eine oder andere Möglichkeit gegeben werden, doch deutet ein bei den vorliegenden Versuchen nicht näher untersuchter Befund, nämlich die Auswaschbarkeit wenigstens eines Teils des gespeicherten Farbstoffes durch Äthylalkohol, darauf hin, daß keine reine Elektroadsorption vorliegt, sondern auch die VAN-DER-WAALSsche Adsorption bei der Speicherung beteiligt ist.

Die angewandte Fixierung war ohne Einfluß auf die physiko-chemischen

Bedingungen des Färbeverganges selbst, doch war das sich ergebende Fluoreszenzbild etwas unterschiedlich. Die stärkste Fluoreszenzintensität zeigte das in Alkohol oder Carnoyscher Flüssigkeit fixierte Gewebe, die schwächste das unfixierte Gewebematerial. In der gleichen Weise war aber auch, wie aus Tabelle 2 ersichtlich, die Primärfluoreszenz unterschiedlich.

Tabelle 2

Intensität der Primärfluoreszenz im Plasma der Tubulusepithelien

Fixierung	Vorbehandlung der Schnittpräparate mit				
	Wasser bzw. physiologischer Kochsalzlösung	pH 4,6	pH 5,6	pH 6,4	pH 9,9
unfixiert	(+)	+	+	+	+
Formalin	+	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)
Alkohol	++	++(+)	++(+)	++(+)	++(+)
Carnoy	++	++(+)	++(+)	++(+)	++(+)

Es war überhaupt auffällig, daß in den untersuchten Schnittpräparaten vom Nierengewebe die Fluoreszenzintensität der einzelnen Gewebelemente durch die Färbung mit Dioxypyrendisulfosaurem Natrium aus sauren Lösungen lediglich verstärkt wurde (entsprechend Tabelle 1). Dabei trat dann auch die typische, pH-abhängige Fluoreszenzfarbe des Farbstoffes auf. Eine elektive Hervorhebung einzelner Gewebelemente durch die Färbung konnte über das bei der Primärfluoreszenz vorhandene Maß praktisch nicht erreicht werden, wenn auch die wesentlich kräftigere Sekundärfluoreszenz die Beobachtung von Einzelheiten erheblich erleichterte.

### Zusammenfassung

1. An Schnittpräparaten vom Nierengewebe wurden Färbungsversuche mit gepufferten Farblösungen verschiedener Wasserstoffionenkonzentration des Fluorochroms Dioxypyrendisulfosaures Natrium durchgeführt.

2. Eine Anfärbung der Schnittpräparate konnte nur aus sauren Farblösungen, und zwar im Bereich von pH 4,6—6,4, erreicht werden. Vom unfixierten oder in Formalin, Alkohol oder nach Carnoy fixierten Gewebe werden demnach nur die undissoziierten Farbmolekel aufgenommen und gespeichert.

3. Bei der Speicherung des Farbstoffes handelt es sich um einen adsorptiven Vorgang, jedoch konnte mit den bisherigen Versuchen nicht geklärt werden, ob Elektroadsorption oder (und) VAN-DER-WAALSsche Adsorption vorliegt.

4. Bei der Farbstoffspeicherung werden keine bestimmten morphologischen Strukturen bevorzugt, infolgedessen unterscheidet sich das Fluoreszenzbild nach Anfärbung von der Primärfluoreszenz nur durch den Farbton und die wesentlich stärkere Fluoreszenzintensität.

### Literatur

1. *Ries E.*, Grundriß der Histophysiologie. Leipzig, 1938.
2. *Pischinger A.*, Z. Zellforsch. **3** (1926): 169; **5** (1927): 347.
3. *Zeiger K.*, Physiko-chemische Grundlagen der histologischen Methodik. Dresden und Leipzig, 1938.
4. *Schümmelfeder N.*, Naturw. **35** (1948): 346; 1948/49 (im Druck).
5. *Strugger S.*, Arch. exper. Zellforsch. **19** (1937): 199.  
— Zellphysiologie und Protoplasmatik
6. *Haitinger M.*, Fluoreszenzmikroskopie. Leipzig, 1938.
7. *Perner E. S.*, Studien über die Aufnahme und Speicherung sulfosaurer Fluorochrome durch lebende Pflanzenzellen und Gewebe. Diss. Münster, 1949.
8. *Ellinger Ph.* und *Hirt A.*, Abderhaldens Handb. Biol. Arbeitsmeth. Abt. **V** (1930), Teil 2/2: 1753.

## BERICHTIGUNG

In der Arbeit

### HERSTELLUNG DÜNNER STAHLPROBEN DURCH SCHNEIDEN MIT DEM MIKROTOM

von Prof. Dr. Carl BENEDICKS und Dr. Olaf TENOW, Mikroskopie **4** (1949), 5/6: 129—157, ist folgendes zu berichtigen:

Seite 139, letzte Zeile von unten, anstatt „Druck“ richtig „Drehmoment“ und anstatt „kg/qcm“ richtig „kg . cm“.

Weiters sind die Abbildungsmaßstäbe der Mikrophotographie wie folgt nachzutragen.

Abb. 7:	220 :1
12:	2,5:1
13:	2,8:1
14:	0,8 . 500 = 400 :1
15:	0,8 . 500 = 400 :1
16:	0,8 . 50 = 40 :1
17:	0,8 . 50 = 40 :1
18:	0,8 . 110 = 88 :1
19:	0,8 . 500 = 400 :1

Abb. 20:	0,8 . 500 = 400:1
21:	0,8 . 45 = 36:1
22:	0,8 . 48 = 36:1
23:	0,8 . 600 = 480:1
24:	0,8 . 90 = 72:1
25:	0,8 . 230 = 180:1
26:	0,8 . 1250 = 1000:1
27:	0,8 . 1250 = 1000:1
28:	0,8 . 1250 = 1000:1

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mikroskopie - Zentralblatt für Mikroskopische Forschung und Methodik](#)

Jahr/Year: 1949

Band/Volume: [4](#)

Autor(en)/Author(s): Schümmelfeder Norbert, Pfennings Karl-Bernd

Artikel/Article: [Die histologische Färbung mit dem Fluorochrom Dioxypyrendisulfosaures Natrium. 202-214](#)