

Kleinere Mitteilungen.

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Karls-Universität in Prag.)

Zur Frage der Natur der GUARNIERI'schen Körperchen.

Studien mit der Nuclealreaktion.

Von

P. F. Milovidov.

(Hierzu Tafel 7.)

WEIGERT hat 1874 in den Epithelzellen der Pockenpusteln neben den Zellkernen liegende eigenartige Gebilde gefunden, deren genauere Beschreibung PFEIFFER (1891) gegeben hat. Da er diese Gebilde auch in den Vakzinepusteln getroffen hatte, hat dieser Forscher sie als „Vakzinekörperchen“ bezeichnet. GUARNIERI (1892) zeigte, daß man die Entwicklung dieser Gebilde am besten in den Epithelien der geimpften Kaninchenkornea verfolgen kann. Er hat sie für die Entwicklungsstadien des amöbenartigen Microorganismus, *Cytorhyctes vaccinae et variolae*, gehalten. Zur Zeit sind sie als GUARNIERI'sche Körperchen allgemein bekannt. Einige Autoren halten diese Gebilde für die Stadien des Variolaeerregers (PROWAZEK's Chlamydozoon variolo-vaccinae z. B.; UNGERMANN und ZUETZER, 1920; GINS, 1922 u. a.), andere, wie RABINOWITSCH (1914) für Produkte der Toxine seines Streptodiplococcus, noch andere für metamorphosierte oder degenerierte Archoplasmen (Idiosomen) und andere veränderte Zellstrukturen (FERRONI und MASSARI, SCHILLING, 1912), einige für Lipoidstoffe (LUCKSCH), für aus dem Zellkern ausgetretene Nucleolen (HAMMERSCHMIDT, 1919, EBERBECK, 1929) oder Chromatinkörner (CONDREA, 1916) usw. Die Mehrzahl aber betrachtet sie als die Reak-

tionsprodukte des lebenden Virus oder als Resultat seiner chemisch verändernden Wirkung auf die Substanzen der befallenen Epithelzellen (PROWAZEK und MIYAJI, 1915, HALLENBERGER, 1918, HÜCKEL, LIPSCHÜTZ, 1920, SCHÜTZE, 1925). Aber auch in diesem letzten Fall sind die Autorenansichten über die Bedeutung und Art der Entstehung dieser Gebilde nicht übereinstimmend. So meinen PROWAZEK und MIYAJI (l. c.), daß das Virus in die Gewebe des Tieres als sog. „Elementarkörperchen“ eindringt und sich dann dort in größere „Initialkörper“ umbildet. Die Epithelzelle reagiert auf das Eindringen des Erregers „mit Chromatinplastinsubstanzen, die sich um viele Initialkörper ansammeln“ (p. 156). So können die GUARNIERI'schen Körperchen noch diese Initialkörperchen, sie umhüllend, einschließen (vgl. auch GALLI-VALERIO, 1912, HALLENBERGER, l. c., u. a.). Die GUARNIERI'schen Körperchen werden von diesen Forschern als Reaktions- und Abwehrstoffe der befallenen Zelle betrachtet. Andererseits bringen sie aber die GUARNIERI'schen Körperchen mit dem Entwicklungszyklus des Erregers in Verbindung. Dagegen weist HALLENBERGER (l. c.) auf die bemerkenswerten Verhältnisse, die zwischen der Virusentwicklung und den GUARNIERI'schen Körperchen vorhanden sind. So sieht man in den Zellen der Kaninchenkornea, die mit Vakzine geimpft wurde, eine große Zahl dieser Körperchen, ohne daß beträchtlicher Epitheluntergang und starke Virusvermehrung beobachtet werden. Dagegen sind in Pockenpusteln des Menschen bei einer starken Epithelzerstörung und Virusvermehrung nur sehr wenige GUARNIERI'sche Körperchen beobachtet worden. Deswegen nimmt HALLENBERGER an, daß der „Zweck“ dieser Körperchen der ist, den Erreger durch Umhüllung unschädlich zu machen. In diesem Sinne nimmt er die Epithelzellreaktion auf das Eindringen des Virus und meint, daß „die GUARNIERI'schen Körperchen mit dem intracellulären Entwicklungsgang des Pockenvirus nicht das Mindeste zu tun haben, sondern daß lediglich ein ursächlicher Zusammenhang zwischen Pockenvirus und GUARNIERI'schen Körperchen insofern besteht, als die GUARNIERI'schen Körperchen Reaktions- und Abwehrprodukte der befallenen Zellen sind“ (p. 97).

Es scheint mir, daß die genauere Auffassung und die Definition der GUARNIERI'schen Körperchen noch nicht festgestellt ist und daß verschiedene Autoren unter diesem Namen nicht immer dasselbe beschreiben, so daß dieser Begriff ziemlich dehnbar ist. Hier z. B. die von HALLENBERGER gegebene Definition: „Die GUARNIERI'schen Körperchen sind stark mit Kernfarbe sich färbende Gebilde von wechselnder Größe und Gestalt, sind meist von einer mit Plasmafarbe sich fär-

benden, körnigen Zone umgeben und finden sich in den Epithelien der geimpften Kaninchenkornea besonders in der Umgebung der Impfstelle“ (p. 89—90). Die Zelle reagiert auf das Erregereindringen „mit erhöhter Produktion von Chromatin und Plastin“ und umhüllt den Erreger mit diesen Reaktionsprodukten wie mit einem Mantel. „Dieser Mantel ist bei der Variolavakzine das GUARNIERI'sche Körperchen“ (p. 91). Dieser Prozeß geht so vor sich, daß der Initialkörper sich anfangs mit durchsichtiger Substanz umhüllt, die nach GIEMSA sich rot färbt, darüber aber, meistens polar, eine andere körnige Substanz ablagert, die sich blau färbt. „Diese beiden Komponenten sind die ersten Anfänge der GUARNIERI'schen Körperchen; es handelt sich um Reaktionssubstanzen der Zelle, um Chromatin (rot) und Plastin (blau)“ (p. 90). Auf diese Weise besteht nach HALLENBERGER das GUARNIERI'sche Körperchen aus Initialkörper, darüber Chromatinschichten und außen Plastinschichten; außerdem können auch die Initialkörper in der Plastinhülle vorhanden sein, wie es HALLENBERGER auf Taf. 2 Fig. 32 darstellt. In einigen Fällen kann aber das Plastin ganz fehlen, so daß ein „nacktes“ GUARNIERI'sches Körperchen vorhanden ist, hier aber würde es sehr schwer sein, dieses doppelchromatische Gebilde von den größeren gewöhnlichen nicht chromatinumhüllten Initialkörperchen zu unterscheiden. Zuweilen fehlt aber einer der Komponenten überhaupt (p. 94) oder der zentrale Einschluß (p. 98). In anderen Fällen sollen die GUARNIERI'schen Körperchen ungeheuerere, bizarre Formen (Taf. 2) mit allen möglichen Einschlüssen darstellen, die zuweilen fast die ganze Zelle einnehmen und sogar den Zellkern zerreißen. Hinreichend ist z. B. bei HALLENBERGER Taf. 1 Fig. 5, 6, 7, 12 mit Taf. 2 Fig. 32, 39, 40, 44, 45 zu vergleichen, um sich zu überzeugen, daß seiner Meinung nach die GUARNIERI'schen Körperchen weit verschiedene Form annehmen können.

Im Falle des Fehlens der äußeren Plastinhülle wird das ganze GUARNIERI'sche Körperchen auf Chromatinschollen zurückzuführen sein, wie es z. B. aus den Abbildungen bei PROWAZEK und MIYAJI (l. c.) gut sichtbar ist, so bleibt der Unterschied zwischen den GUARNIERI'schen Körperchen und Initialkörperchen nur in ihrer Größe bestehen, da die beiden sich nach GIEMSA rot färben und beide in der Vakuole liegen können (Tafelfig. 2). Die Initialkörperchen stellen nach HALLENBERGER sehr scharf umgrenzte, nach GIEMSA tiefrot gefärbte Punkte, Doppelpunkte usw. dar, die bis $1\frac{1}{4} \mu$ groß sind.

Also würden für den Begriff der GUARNIERI'schen Körperchen folgende Gebildetypen passen:

1. Chromatin-Plastin (z. B. Taf. 1 Fig. 5, 22, 23, 25 von HALLENBERGER), dazu können noch die Initialkörper beitreten,
2. Chromatin: nacktes GUARNIERI'sches Körperchen (Taf. 1 Fig. 7, 12),
3. Plastin mit den Einschlüssen (Taf. 1 Fig. 39).

UNGERMANN und ZUETZLER (1920) finden in den großen, blassen GUARNIERI'schen Körperchen Körnchen, die sich stärker und dabei oft heterochromatisch färben. Diese Autoren betrachten die GUARNIERI'schen Körperchen als intracelluläre Kolonien des Pockenerregers. GINS (1922) betrachtet die GUARNIERI'schen Körperchen als charakteristische Entwicklungsformen des Variolavakzinevirus, die nicht nur in den Epithelzellen, sondern auch extracellulär liegen können. So betrachten diese Forscher die GUARNIERI'schen Körperchen nicht als Bestandteile des Zellkernes oder des Cytoplasmas der Epithelzellen.

Nach CONDREA (1916) dagegen stammen die GUARNIERI'schen Körperchen von den Kernen der Epithelzellen der Kornea, deren Chromatin an einem Ende halbmondförmig zusammengedrängt wird und die Chromatinkörner, die später im Cytoplasma freiliegen, abschnürt. Diese Körner müssen nach CONDREA als Übergangsformen betrachtet werden, obwohl sie mit BIONDI-Gemisch grün, als echtes Chromatin sich färben, die GUARNIERI'schen Körperchen aber nur graublau.

SCHÜTZE (1925) hält die GUARNIERI'schen Körperchen für echte cytoplasmatische Gebilde, die als Antwort auf Vergiftung der Zelle mit dem Virus sich bilden und die kein Verhältnis zum Entwicklungsgang des Virus haben. Ihre Vielgestaltigkeit und ihr gleiches Schicksal spricht nach diesem Autor eher für ihre physikalisch-chemische Natur, als für ihre vitale Auffassung.

Nach EBERBECK (1929) stammen im Gegenteil die GUARNIERI'schen Körperchen von den Zellkernen ab, dabei ein Teil von den ausgetretenen Nucleolen und der andere von den Chromatinteilchen, die aus dem amitotisch sich teilenden Kern sich ableiten müssen und nachfolgende körnige Umwandlung zeigen.

POT (1930) hat die sehr interessante Tatsache gefunden, daß auch bei der Impfung mit einigen Bakterienkulturen (z. B. *B. coli*, *B. paratyphi-A* u. a.) sich Körper bilden, die von den echten GUARNIERI'schen Körperchen nicht zu unterscheiden sind, so daß die letzten nicht als spezifisch betrachtet werden können. Da aber die GUARNIERI'schen Körperchen sich auch nach der Einwirkung der organischen Lösungsmittel bewahren, lehnt er die Meinung von LUCKSCH von ihrer Lipoidnatur ab.

NAUCK und PASCHEN (1932) behaupten, daß bei der Variolainfektion „infolge einer dadurch ausgelösten Dissoziation die in der normalen Zelle vereinigten Plastin- und Chromatinteile aus ihrer Verbindung getrennt und danach sichtbar werden in Form der Einschlüsse“¹⁾ (p. 94).

Viele Forscher, wie HÜCKEL, BORREL (1924), PASCHEN u. a. kommen in letzter Zeit zur Ansicht, daß zur Entstehung von GUARNIERI'schen Körperchen viele Faktoren verantwortlich sein dürften. So nimmt PASCHEN (1932) an, daß die GUARNIERI'schen Körperchen keine Lebewesen seien und daß sie aus verschiedenen Gebilden abstammen dürften und zwar:

1. aus phagocytierten Leucocyten in toto oder seinen Teilen,
2. aus ausgetretenen Nucleolen,
3. ausgetretenen Chromatinteilchen,
4. kappenartig dem Kerne aufsitzendem Gebilde mit feinen Körperchen im Innern, die mit den Elementarkörperchen übereinstimmen. Das ist die „Erregerkolonie, die in dem aus dem Kern ausgetretenen Chromatin sich entwickelt hat“ (p. 91) und endlich
5. „Der Hauptanteil wird gebildet durch im Plasma liegende Gebilde mit einer Chromatin- und Plastinkomponente“ (p. 91). Die Ursache ihres Auftretens ist nach PASCHEN „diffundierbares gelöstes Toxin, das eine dissoziierende Wirkung auf die im Plasma normalerweise vereinigten Chromatin- und Plastinteile ausübt“ (p. 91)¹⁾.

Wir müssen also anerkennen, daß der Begriff der GUARNIERI'schen Körperchen und die Auffassung ihres Ursprunges bis jetzt noch nicht festgestellt ist.

Da mir einiges Material zur Verfügung stand, prüfte ich es auf die Nuclealreaktion, um näher über die Natur der GUARNIERI'schen Körperchen zu entscheiden, oder wenigstens gewisse Klarheit in diese Frage zu bringen.

Das Material: Kaninchenkornea mit Variolavakzine geimpft wurde speziell für das Studium der GUARNIERI'schen Körperchen im Institut Pasteur (Paris) mit 96 proz. Alkohol fixiert und in Paraffin eingebettet und mir liebenswürdig vor 5 Jahren von Herrn Prof. J. KOŘINEK zur Verfügung gestellt, wofür ich ihm an dieser Stelle meinen innigsten Dank ausspreche. Das Paraffin wurde von den Schnitten mit Xylol entfernt, die Präparate durch die Alkoholreihe durchgeführt und im 96 proz. Alkohol 24—48 Stunden gehalten, um die

¹⁾ Von mir gesperrt.

mögliche Plasmalreaktion zu vermeiden. Die Präparate wurden dann in destilliertem Wasser gewaschen, für kurze Zeit in zimmerwarme n-HCl übertragen und danach 7 bis 8 Minuten lang in n-HCl bei 60° C hydrolysiert, nachher von neuem in das kalte n-HCl gestellt und ohne Wasserabspülung 1 Stunde in der fuchsinschwefeligen Säure gehalten. Weiter wurden die Präparate in SO₂-Wasser, nachher in Leitungswasser gründlich ausgewaschen, entwässert und in Kanadabalsam nach üblicher Weise eingeschlossen. Einige Präparate wurden mit schwacher Lichtgrünlösung in 50 proz. Alkohol nachgefärbt.

Die Nuclealfärbung der Zellkerne der Kaninchenkornea ist ganz elektiv, grell in *substantia propria* und ganz deutlich in den Epithelzellen. Die Stelle, wo die Geschwulst sich bildet, ist durch die dichte Masse ordnungslos angehäufter Kernsubstanzkörperchen angedeutet, zwischen denen auch runde, blasenförmige, stärker an der Peripherie gefärbte Chromatinteilchen öfters auftreten. Diese Chromatinanhäufung, deren Herkunft auf die deformierten Korneazellkerne zurückzuführen ist, zerstreut sich allmählich in der Kornea, wobei die einzelnen Chromatinkörnchen von verschiedener Form und Größe sind und zuweilen auch sehr winzig sein können (Taf. 7 Fig. 24).

Die Kerne der Epithelzellen sind ziemlich groß, etwas ausgedehnt, relativ gleichmäßig gefärbt und enthalten im Innern öfters einige stärker gefärbte Chromatinschollen. Neben den Kernen wurden oft die GUARNIERI'schen Körperchen gefunden. Sie geben eine gute positive Nuclealreaktion. Die Konturen der GUARNIERI'schen Körperchen sind scharf, ihre Nuclealfärbung fast immer intensiver als die der Epithelzellkernen, in seltenen Fällen jedoch blaß (Taf. 7 Fig. 8, 9). Ihre Nuclealfärbung ist homogen, seltener an der Peripherie intensiver, dann sehen die Körner ring- oder eher blasenförmig aus (Taf. 7 Fig. 7, 21). Die Größe der GUARNIERI'schen Körperchen schwankt zwischen 1,5—2 μ , sie können aber auch größer sein. Ihre Form ist rundlich, kurzoval, zuweilen auch etwas eckig. Gewöhnlich fand ich in Epithelzellen je ein GUARNIERI'sches Körperchen, aber zuweilen auch mehr (2, 4) (Taf. 7 Fig. 7, 9). In einem Fall habe ich ein hantelförmiges Gebilde gefunden, ich bin aber nicht sicher, ob es intracellulär lag (Taf. 7 Fig. 8). Die GUARNIERI'schen Körperchen liegen neben dem Zellkern, manchmal aber drückt sich die Umhüllung des Körperchens in den Kern (Taf. 7 Fig. 3, 4, 10). Die bräunliche Färbung (Pigmente, Fette?) der Epithelzellen maskiert nicht die Nuclealfärbung der Kerne und der GUARNIERI'schen Körperchen. In einigen Fällen scheint es, als ob die GUARNIERI'schen Körperchen im Innern des Zellkernes liegen (Taf. 7 Fig. 12, 19),

wie es viele Autoren annehmen. So findet z. B. BÖING (1920, 1921) in den Kernen der Epithelzellen spezifische Gebilde, die mit den in den GUARNIERI'schen Körperchen gefundenen identisch sind. Ich kann in unseren Fällen aber nicht feststellen, ob die GUARNIERI'schen Körperchen im Kern lagen, da die Möglichkeit nicht ausgeschlossen ist, daß sie unmittelbar eng dem Kern angeschmiedet sind und von oben gesehen auf dem Kern sich projektieren. Andererseits können auch die stärker sich färbenden Chromatinschollen täuschen. Die oberen Fälle sind aber sehr selten. Ich kann auch nicht irgend welche andere Einschlüsse, besonders kleinere, die Nuclealfärbung geben, in größeren Mengen die Epithelzellen füllen und mit den Initialkörperchen oder Chromidien verglichen werden können, finden, wie es z. B. PROWAZEK und MIYAJI (l. c. Fig. 1 und 3) oder HALLENBERGER darstellen. Die GUARNIERI'schen Körperchen wurden in vielen, aber nicht in allen Epithelzellen gefunden. Kleine Körnchen von verschiedener Größe, die gute Nuclealfärbung geben, sind in großen Mengen in der substantia propria vorhanden, besonders nicht weit von der Entzündungsstelle, wobei sie hier verschiedene Formen haben, wie ausgedehnte oder geschnürte Stäbchen, Körner usw. Ob sie alle von den degenerierten Kernen der Zellen dieser substantia propria abstammen oder nicht, ist schwerlich zu entscheiden, die Mehrzahl hat aber zweifellos diesen Ursprung.

Also gibt uns die positive Nuclealreaktion der GUARNIERI'schen Körperchen die Möglichkeit zu behaupten, daß sie Thymonucleinsäure enthalten und somit aus Chromatin bestehen. Dabei lassen wir einstweilen die Frage beiseite, ob sie von einer Plastin-(Cytoplasma-)schicht umhüllt sind, oder nackt in einer Vakuole liegen und ob diese Vakuole ein Kunstprodukt (HALLENBERGER, POT) darstellt. Die elektive Nuclealfärbung in den Epithelzellen zeugt auch dafür, daß die Einschlüsse, die möglich in ihnen oder in dem Plastinmantel der GUARNIERI'schen Körperchen vorkommen können, da sie nicht vom Kernchromatin abstammen, nichts gemeinsames mit den sog. „Chromidien“ haben. HALLENBERGER (l. c.) gibt unter anderem an: „... ferner kann man die GUARNIERI'schen Körperchen durch Behandlung schon mit 10 proz. NaCl-Lösung zur Auflösung bringen“ (p. 90). Angeblich kann diese Behauptung die ganzen GUARNIERI'schen Körperchen nicht betreffen, da sich das Chromatin in Kochsalzlösung nicht löst. So gibt z. B. NĚMEC (1910) an, daß 20 proz. Lösung von NaCl keine sichtbare Wirkung nach 18stündiger Einwirkung auf das Kernchromatin in den Wurzeln von *Pisum sativum* ausübt. Außerdem würde in unserem Falle auch das Chromatin

des Kernes der Epithelzelle gelöst. Deswegen ist es sehr wahrscheinlich, daß dort die Rede von irgendeiner anderen nicht chromatischen Struktur in den Epithelzellen war.

Was ist aber der Ursprung der GUARNIERI'schen Körperchen?

Wenden wir uns vor allem zu den Hypothesen, welche die Entstehung der GUARNIERI'schen Körperchen aus dem Protoplasma der Epithelzellen unter dem Einfluß der Virusinfektion zulassen. Ich würde z. B. folgende Anschauungen von HALLENBERGER (l. c.) zitieren: „Die beiden Komponenten der GUARNIERI'schen Körperchen, das Chromatin und das Plastin sind Stoffe, die das normale Cytoplasma in feinsten Verteilung enthält¹⁾; eine Rolle bei der Bildung der GUARNIERI'schen Körperchen spielen in der Kaninchenkornea wohl auch die in deren Epithelien nachgewiesenen Chromidien“ (p. 98). Er zeigt dabei auf seine Taf. 2 Fig. 30 und 34, „in denen doch scheinbar Kernsubstanzen aus dem Kern austreten“. HALLENBERGER findet Chromidien auch im Innern der GUARNIERI'schen Körperchen. Man muß sich aber sehr wundern, daß ähnliche Anschauungen auch noch in gegenwärtiger Zeit ausgesprochen werden können: ich habe schon analoge Ansichten von PASCHEN (1932) und von NAUCK und PASCHEN (1932) zitiert. Man kann sich freilich überhaupt nicht mit den archaischen Anschauungen über die Entstehung (Ausscheidung) von Chromatin aus dem Cytoplasma einverstanden erklären. Es betrifft speziell auch die Entstehung der GUARNIERI'schen Körperchen (resp. ihrer inneren Teile) auf diese Weise, wie es viele Forscher annehmen, d. h. als Reaktion der Zelle, resp. ihres Cytoplasmas auf das Eindringen des Erregers. Die Hypothesen über die Entstehung der Chromatinkörperchen aus dem Cytoplasma, wie auch die Chromidialtheorie sollte in unserer Zeit ganz wegfallen, da keine tatsächlichen Gründe dazu vorhanden sind, desto mehr keine Notwendigkeit für solche Hypothesen entsteht (vgl. MILOVIDOV, 1933). Die positive Nuclealreaktion zeigt, daß diese Körper aus Chromatin bestehen und daher von dem Zellkern abstammen. Das Chromatin hat immer seinen Ursprung im Kern. In der Gegenwart ist nur ein einziger Fall bekannt, wo die Thymonucleinsäure außerhalb dem Zellkern normal liegt, nämlich in den sog. Blepharoplasten einiger niederen Protozoen (z. B. Trypanosomen), deren Abstammung vom Kern nicht bewiesen ist. In allen anderen Fällen gerät das extranucleäre Chromatin in das Cytoplasma immer aus dem Zellkern. Es kann entweder durch Fragmentation des Kernes (z. B. die Caryomerenbildung wie unter dem Einfluß des Wassers von hoher Tem-

¹⁾ Von mir gesperrt.

peratur usw. (YAMAHA, MILOVIDOV u. a.), oder durch unregelmäßige Verteilung der Kernsubstanz bei der Kernteilung, die mit dem Chromosomenausfall (Eliminierung) verbunden ist, entstehen (sog. „Chromatinnucleolen“, vgl. STRASBURGER, NAWASCHIN), dem ich eine andere Arbeit widme (*Zebrina pendula*). Bei dem gegenwärtigen Stande der Wissenschaft haben wir weder Möglichkeit noch Notwendigkeit eine Reaktion der Zelle zuzulassen, die Chromatin aus dem Cytoplasma ausscheiden muß. Wenn man schon eine Zellreaktion auf das Erregereindringen im Falle der GUARNIERI'schen Körperchen zulassen wollte, so könnte man vielleicht nur die Cytoplasmaschicht, die den Erreger umhüllte, als Resultat solcher Reaktion betrachten (vgl. ähnliches bei Isolation der Pilzreste in Verdauungszellen der Mykorrhiza).

Auf Grund der positiven Nuclealreaktion der GUARNIERI'schen Körperchen, resp. ihrer inneren Teile, kann man folgende Schlüsse ziehen:

1. Die Hypothese über die Entstehung der GUARNIERI'schen Körperchen aus dissoziiertem Plasmachromatin (Punkt 4 von PASCHEN), oder aus Chromidien muß verlassen werden,

2. man muß auch die Vermutung über die Entstehung der GUARNIERI'schen Körperchen aus den Nucleolen fallen lassen (Punkt 2 von PASCHEN, HAMMERSCHMIDT, EBERBECK; Erwiderungen auch bei LIPSCHÜTZ),

3. es fällt auch die Weisung auf die Lipoidnatur dieser Gebilde (LUKSCH), da die Lipide keine Nuclealreaktion geben.

Auf diese Weise bleiben noch folgende theoretische Möglichkeiten:

a) Das Chromatin der GUARNIERI'schen Körperchen stammt aus den Kernen der Zellen des befallenen Organismus.

b) Das Chromatin gehört zu dem Kernstoff des Erregers.

c) Das Chromatin wird mit der Vakzine verschleppt.

d) Das Chromatin gehört dem Zellkern eines anderen fremden Organismus, der sekundär in die geimpften Gewebe gelangen kann.

Die letzte Vermutung scheint uns sehr unwahrscheinlich zu sein, da die Impfung unter den möglichsten Kautelen der Sterilität vor sich geht und die Impfstelle mit Kollodium bedeckt sein kann. Die Vermutung, daß das Chromatin der GUARNIERI'schen Körperchen aus dem Kernstoff des Virus abstammt, ist auch sehr zweifelhaft. Man kann sich vor allem schwerlich vorstellen, daß ein Entwicklungsstadium des Virus eine solche Größe und Kompaktheit des Chromatins in einer Stelle erreichen könnte. Wenn aber ferner die sog. Elementarkörperchen, die das erste sichtbare Anfangsstadium der

Erregerentwicklung sein sollten, in sich Chromatin enthalten, so müssen sie, in der Vakzine in großer Menge vorhanden, eine positive, wenn auch nur diffuse und makroskopische Nuclealfärbung geben.

Um diese Frage etwas zu erleuchten, habe ich die Vakzine auf die Nuclealreaktion erprobt¹⁾. Die Ausstriche wurden auf gewöhnliche Weise auf dem Objektträger gemacht, von denen einige vorher mit filtriertem Eiweiß-Glyceringemisch bedeckt waren, wurden feucht mit konzentrierter Sublimatlösung fixiert und nachher durch eine Flamme ausgetrocknet. Einige Ausstriche wurden danach noch 48 Stunden in 96 proz. Alkohol gehalten. Die Hydrolyse dauerte 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 Minuten und der Aufenthalt in der fuchsinschwefeligen Säure 1—24 Stunden. Die nachfolgende Behandlung wie gewöhnlich. In keinem Fall konnte ich in der Vakzine Körper finden, die ihrer Größe nach mit den Elementarkörperchen verglichen werden konnten und die positive Nuclealreaktion gaben. Ich konnte aber ziemlich große Mengen der Gewebereste konstatieren, in denen die Zellen mit gute Nuclealfärbung gebenden Kernen oder seinen pyknotischen Fragmenten zu sehen waren. Es ist also nicht ausgeschlossen, daß die Kernfragmente mit der Vakzine bei der Impfung in die Korneazellen mitverschleppt werden können.

Die sog. Elementarkörperchen (PASCHEN'sche Körperchen), die von vielen Forschern in der Vakzine gefunden wurden, wurden von vielen als Variolaerreger betrachtet (PROWAZEK u. MIVAJI; FORNET: *Microsoma variolae s. vaccinae*; HALLENBERGER; in der neuen Zeit: EAGLES, HARDY u. LEDINGHAM, 1932, NAUCK u. PASCHEN, 1932 u. a.). Die anderen Autoren aber (z. B. HUNTERMÜLLER) zeigen, daß sie weder morphologisch, noch färberisch von den Kolloidgranula unterschieden werden können. Es scheint mir, daß wenn diese kokkenartigen Körperchen eine Menge von Chromatin enthalten, so müssen sie bei großer Anhäufung eine positive Nuclealreaktion geben, wir haben aber nichts ähnliches an unseren Ausstrichpräparaten beobachten können. Deswegen wird auch diese Möglichkeit der Entstehung der GUARNIERI'schen Körperchen aus dem Elementarkörperchenchromatin immer weniger wahrscheinlich.

Es scheint uns daher wahrscheinlicher, daß das Chromatin der GUARNIERI'schen Körperchen von den Zellkernen der Korneazellen stammt. Hier sind wieder zwei Möglichkeiten vorhanden: die GUARNIERI'schen Körperchen stammen entweder aus den Kernen der

¹⁾ Ich benutze die Gelegenheit Herrn Dr. K. URBÁNEK, dem Vorstand der zweiten Abteilung der Staatsgesundheitsanstalt in Prag, meinen besten Dank für die mir freundlichst überreichte Vakzine auszusprechen.

Epithelzellen oder aus den Kernen der Leucocyten, die zwischen die Epithelien eindringen und später phagocytirt werden können. Im ersten Fall ist es möglich z. B. die Unregelmäßigkeiten der Kernteilungen in den Epithelzellen unter dem Einfluß des Virus und die Ausschließung einiger Elemente (Chromosomen oder seiner Teile) zuzulassen. So z. B. bleiben bei Tradescantien während der Pollenbildung zuweilen einige Chromosomen, die keinen Anteil an der Tochterkernbildung nehmen, in der Vakuole in der Nähe des Pollenkernes liegen. Rein äußerlich sehen solche Chromatinkörner, die im Pollenkorn neben dem Zellkern liegen, den GUARNIERI'schen Körperchen sehr ähnlich.

Die andere Möglichkeit ist der Austritt der Chromatinschollen aus dem Zellkern in das Cytoplasma, der theoretisch durch die Beschaffenheit der Kernmembran zulässig wäre. Auch durch Amitose oder Kernknospung ist die Bildung der Chromatinkörper vorstellbar, aber solche Caryomeren haben gewöhnlich viel lockere Struktur als die GUARNIERI'schen Körperchen. Außerdem muß man dabei solche Prozesse in den Epithelzellen beweisen. Ich habe einige amöboide Zellkerne in den Epithelzellen beobachtet. UNGERMANN und ZUETZLER (l. c.) zeigen, daß der Impfeffekt durch Degeneration und Zerfall der Epithelzellen begleitet wird, die solche Formen annehmen, die zur Verwechslung mit GUARNIERI'schen Körperchen Anlaß geben können¹⁾.

Am wahrscheinlichsten scheint mir die Annahme zu sein, daß das Chromatin der GUARNIERI'schen Körperchen von den Zellkernen der Leucocyten, die sich an der Entzündungsstelle versammeln und später von den Epithelzellen phagocytirt werden, stammt. PROWAZEK und MIYAJI (l. c.) erwähnen z. B. solche phagocytirte Leucocyten, die GUARNIERI'sche Körperchen vortäuschen können (p. 149).

Die Leucocytenreste kommen zum Vorschein als ein oder einige Chromatinkörner, die entweder nackt liegen, oder von den Cytoplasma-resten noch umringt sind („Plastinhülle“). In dem Cytoplasma können auch verschiedene Einschlüsse vorhanden sein, wie z. B. Mitochondrien usw., die mit den Initialkörperchen usw. verwechselt werden können. Die Chromatinkörner färben sich anfangs durch die Nuclealfärbung grell, später werden sie blasser, ihre Konturen werden unklarer, was auf ihre Verdauung in den Epithelzellen deuten kann. METSCHNIKOFF, SALMON, BORREL, PASCHEN halten solche Phagocytose für möglich. Der letztere schreibt: „ . . . der Kernstab wird pyknotisch und zerfällt in eine größere Zahl von oft gleich großen runden Teilen“

¹⁾ Übrigens sinkt der Wert dieser Hindeutung, da diese Forscher mit Ausstrichpräparaten, in denen Kerndeformationen üblich sind, arbeiten.

und weiter: „Die tote Zelle mit den Teilen zerfällt in entsprechend viele Einzelteile, und nun beobachtet man kleine, mit einem Plasma-saum umgebene Gebilde“ (p. 90). Zugunsten solcher Phagocytose würde vielleicht auch die umgreifende Form des Kernes der Epithelzelle sprechen, welche den GUARNIERI'schen Körperchen umgreift und die nicht selten in diesen Zellen beobachtet werden kann. Die Nuclealfärbung mit der nachfolgenden Färbung mit Lichtgrün gibt uns ein gutes technisches Mittel, um diesen Prozeß der Phagocytose in allen seinen Hauptphasen zu verfolgen. In unserem Material konnten wir Schnittpartien finden, wo die Leucocyten zwischen den Epithelzellen oder zwischen der Epithelschicht und der *substantia propria* lagen; sie zeigen ein grün gefärbtes Cytoplasma und intensive violette Zellkerne resp. seine Teile mit charakteristisch stärker gefärbter Kernperipherie (Taf. 7 Fig. 17, 22, 23); Größe, Anzahl und Form dieser Chromatinteilchen, können variieren. Ähnliche Gebilde, aber öfters mit sehr kleinen Chromatinteilchen werden auch in der *substantia propria* nicht selten gefunden. Man kann auch sehen, wie ein solcher Leucocyt zwischen die Epithelzellen eindringt, sich zwischen ihnen eng drängt, sein Cytoplasma wird reduziert und färbt sich nicht mehr (Taf. 7 Fig. 18), weiter ist schwerlich die Grenze zwischen den in eine Vakuole isolierten Leucocytenresten und den ihn umringenden Zellen zu unterscheiden (Taf. 7 Fig. 20). Endlich finden wir die Leucocytenreste schon im Innern der Epithelzellen, wo die Kernfragmente ihr typisches bläschenförmiges Aussehen noch behalten (Taf. 7 Fig. 7, 15, 21). Später werden die Chromatinkörner ganz homogen, aber noch intensiv gefärbt und nur viel später kann man auch blasse Teilchen finden. Das weitere Schicksal der GUARNIERI'schen Körperchen ist mir unbekannt, man kann aber auf Grund von Abbildungen anderer Forscher und unserer Beobachtungen voraussetzen, daß sie allmählich blässer werden und dann verschwinden. Die größere Kompaktheit und Färbung der GUARNIERI'schen Körperchen im Vergleich zu den Epithelzellkernen spricht auch zugunsten des Ursprunges der GUARNIERI'schen Körperchen aus den Leucocytenkernresten, die sehr intensiv gefärbt und kompakt sind. Durch den Bau der Leucocyten (Kern, Cytoplasma mit Mitochondrien usw.) und deren allmählichen Degeneration kann man auch jene komplizierte Strukturen der GUARNIERI'schen Körperchen erklären, die von verschiedenen Forschern beschrieben wurden.

Bei der Impfung sind die GUARNIERI'schen Körperchen nicht absolut obligatorisch. So gibt z. B. GINS (l. c.) an, daß aus 100 geimpften Kaninchen nur 54, d. h. etwa $\frac{1}{2}$, gutes GUARNIERI-

sches Phänomen aufwiesen. Außerdem zeigt er, daß die GUARNIERI'schen Körperchen auch zwischen den Epithelzellen sich befinden können, aber nur bei junger Infektion. Die GUARNIERI'schen Körperchen liegen nicht in allen Epithelzellen, was man mit ihrer Leucocytenabstammung in Zusammenklang bringen könnte, da nicht jede Epithelzelle unbedingt Leucocyten fressen muß. Auch die von GINS beschriebene Tatsache spricht zugunsten unserer Ansicht, da bei den späteren Infektionsstadien die Leucocytenreste schon im Innern der Epithelzellen eingezogen sind und wie GUARNIERI'sche Körperchen aussehen. Es ist auch interessant zu bemerken, daß gerade dort, wo die Leucocytenansammlungen vorhanden sind, die GUARNIERI'schen Körperchen gewöhnlich fehlen, und die GUARNIERI'schen Körperchen dort in den Zellen erscheinen, wo die Leucocyten schon verschwinden, was verständlich wird, wenn wir die Abstammung der GUARNIERI'schen Körperchen von den Leucocytenresten annehmen. Endlich sind die Versuche von POT (l. c.) mit den Bakterienimpfungen für die Entscheidung der nicht spezifischen Natur der GUARNIERI'schen Körperchen sehr wichtig. Unsere Figuren des Leucocytenzerfalls sind den Zerfallsformen der Leucocyten in der Vakzinepustel, die von PASCHEN (1932) auf Fig. 1 abgebildet sind, sehr ähnlich. Die auf Tafelfig. 1 von PROWAZEK u. MIYAJI (l. c.) dargestellten typischen GUARNIERI'schen Körperchen sind bis zu ihrer Form, ihrer Verteilung und ungefärbten Arealen ganz mit unseren Abbildungen der degenerierten Leucocyten in den Epithelzellen der Kaninchenkornea identisch, von der Lichtgrün-Nachfärbung abgesehen, die aber nicht überall vorhanden ist.

Der Mangel an Material gibt mir leider keine Möglichkeit eine systematische cytologische Untersuchung mit Hilfe der Nuclealreaktion über die Entstehung und das weitere Schicksal der GUARNIERI'schen Körperchen zu unternehmen. Diese Untersuchungen sind aber notwendig, da man nur durch detailliertes Studium aller nacheinander folgenden Stadien die Überzeugung bekommen kann, ob die GUARNIERI'schen Körperchen nur aus den degenerierten Leucocyten sich bilden, oder ob auch die Kerne der Epithelzellen der Kornea an diesem Prozesse teilnehmen. Ich bin überzeugt, daß die Nuclealreaktion hier, wie auch in allen ähnlichen Fällen, uns gute Dienste leisten kann. Allerdings ist die Revision der Frage über die Entstehung der GUARNIERI'schen Körperchen mit Hilfe der neuesten Methoden ganz unentbehrlich.

Die positive Nuclealreaktion der GUARNIERI'schen Körperchen beweist also zweifellos die Kernnatur der GUARNIERI'schen Körperchen

resp. ihrer inneren Teile. Die beobachteten Degenerationsstadien der Leucocyten machen die Voraussetzung sehr wahrscheinlich, daß das Chromatin der GUARNIERI'schen Körperchen von den Kernen der Leucocyten abstammt, die von den Epithelzellen phagocytiert sind und eine Zeitlang in den Zellvakuolen isoliert liegen bleiben. Was aber die Reaktion der befallenen Zelle auf das Eindringen des Erregers (Virus) anbetrifft, so kann man in diesem Falle nur von der Reaktion des ganzen Gewebes sprechen, speziell nur von dem Leucocytenanteil (und in dem Fall bilden sich die GUARNIERI'schen Körperchen nur als Folge dieser Reaktion), oder von der Reaktion des Epithelzellkernes (Fragmentation, Unregelmäßigkeiten bei der Kernteilung, Kerndegeneration usw.), oder endlich von einer Cytoplasmareaktion der Epithelzelle, welche die Leucocyten umhüllt und die Kernreste in den Vakuolen isoliert. Die Lehre über die Ausscheidung des Chromatins vom Protoplasma steht aber mit dem gegenwärtigen Zellbegriff nicht im Einklang.

Zusammenfassung.

1. Die GUARNIERI'schen Körperchen resp. ihre inneren Teile enthalten die Thymonucleinsäure und bestehen also aus „Chromatin“.
 2. Die Ansichten über die Lipoidnatur der GUARNIERI'schen Körperchen müssen wegfallen.
 3. Die GUARNIERI'schen Körperchen können nicht aus dem Kern der Epithelzellen ausgetretene Nucleolen vorstellen.
 4. Die Vorstellung über die Ausscheidung des Chromatins aus dem Protoplasma der befallenen Zellen unter dem Einfluß des Erregers steht mit dem gegenwärtigen Zellbegriff im Widerspruch. Daher müssen die Hypothesen, die GUARNIERI'schen Körperchen als Produkte der direkten Zellreaktion auf die Viruseindringung aufzufassen, fallen gelassen werden.
 5. Die Entstehung der GUARNIERI'schen Körperchen soll man in dem Kernstoff der Zellen des befallenen Organismus suchen. Es ist sehr wahrscheinlich, daß sich die GUARNIERI'schen Körperchen aus den von den Epithelzellen phagocytierten Leucocytenresten bilden.
 6. Die GUARNIERI'schen Körperchen stellen nicht Entwicklungsstadien des Virus vor.
 7. In den Ausstrichpräparaten der Variolavakzina, die der Nuclealfärbung unterworfen waren, sind Zellenreste mit nuclealpositiven Kernen, aber keine feinsten Körperchen, die mit den Elementarkörperchen verglichen werden könnten, gefunden worden.
-

Literaturverzeichnis.

(Die mit den Sternchen gezeichneten Arbeiten sind mir nur nach Referaten bekannt.)

- *BÖING, W. (1920): Zur Färbung der GUARNIERI'schen Körperchen. Berl. klin. Wochenschrift p. 299. Ref.: Zentralbl. f. Bakt. Abt. I Bd. 70 p. 484, 1920—1921.
— (1920): Untersuchungen über Vaccine. Arb. a. d. Reichsgesundheitsamt Bd. 52 p. 615. Ref.: Ibid. Bd. 71 p. 482, 1921.
- *CONDREA, P. (1916): Sur la formation des corpuscules de GUARNIERI dans la vaccine. Comptes rend. Soc. biol. T. 79 p. 91. Ref.: Zentralbl. f. Bakt. Abt. I Bd. 67 p. 318, 1919.
- *EAGLES, HARDY and LEDINGHAM (1932): Vaccina and the PASCHEN body: infection experiments with centrifuged virus filtrates. Lancet I p. 823—826. Ref.: Zentralbl. f. Bakt. Abt. I Bd. 108 p. 194—195, 1932.
- *EBERBECK, E. (1929): Über die GUARNIERI'schen Körperchen (GK), ihre Beziehung zu den sog. Geflügelpockenkörperchen usw. Arch. f. Tierheilk. Bd. 59 p. 111—131. Ref.: Zentralbl. f. Bakt. Abt. I Bd. 94 p. 435—436, 1929.
- *FERRONI u. MASSARI: Handb. d. path. Protozoenkunde.
- GALLI-VALERIO, B. (1912): Observations sur les corpuscules de la vaccine. Zentralbl. f. Bakt. Abt. I (Orig.) Bd. 63 p. 53—58, 1912.
- *GINS, H. (1922): Untersuchungen über die für Variola und Vaccine spezifischen Zellveränderungen. Zeitschr. f. Hygiene Bd. 95 p. 255. Ref.: Zentralbl. f. Bakt. Abt. I Bd. 74 p. 50, 1923.
- *GUARNIERI (1892): Arch. per le scienze med.
- HALLENBERGER (1918): Beitrag zur Ätiologie der Variola. Zentralbl. f. Bakt. Abt. I (Orig.) Bd. 80 p. 89—105.
- *HAMMERSCHMIDT, J. (1919): Über die Herkunft der GUARNIERI'schen Körperchen. Zeitschr. f. Hygiene und Infektionskrankh. Bd. 89 p. 49. Ref.: Zentralbl. f. Bakt. Abt. I Bd. 70 p. 483—484, 1920—1921.
- HUNTERMÜLLER (1917): Kritische Studien über Morphologie und Züchtung von filtrierbaren Virusarten. Zentralbl. f. Bakt. Abt. I (Orig.) Bd. 79 p. 36—40.
- *LIPSCHÜTZ, B. (1920): Über Chlamydozoa-Strongyloplasmien. Wien med. Wochenschr. p. 1356. Ref.: Zentralbl. f. Bakt. Abt. I Bd. 71 p. 483, 1921.
- MILOVIDOV, P. (1932): Einfluß von Wasser hoher Temperatur auf den Kern der Pflanzenzellen im Lichte der Nuclealreaktion. Protoplasma Bd. 17 p. 32—88.
— (1933): Independence of chondriosomes from nuclear matter. Cytologia Vol. 4 No. 2 p. 158—173.
- NAUCK, E. u. PASCHEN, E. (1932): Der morphologische Nachweis des Pockenerregers in der Gewebekultur. Zentralbl. f. Bakt. Abt. I (Orig.) Bd. 124 p. 91—95.
- NAWASCHIN, S. (1911): Über eine Art der Chromatindiminution bei Tradescantia virginica. Ber. d. d. bot. Gesellsch. Bd. 29 p. 437—449.
- NĚMEC, B. (1910): Das Problem der Befruchtungsvorgänge und andere cytologische Fragen. Berlin.
- PASCHEN, E. (1932): Über die Herkunft der GUARNIERI'schen Körperchen. Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. (Orig.) Bd. 124 p. 89—91.
- *POT, A. (1930): De lichaampjes van GUARNIERI. Inaug.-Diss. Utrecht. Ref.: Zentralbl. f. Bakt. Abt. I Bd. 103 p. 3—4, 1931.
- PROWAZEK, S. u. MIYAJI, S. (1915): Weitere Untersuchungen über das Vaccinevirus. Zentralbl. f. Bakt. Abt. I (Orig.) Bd. 75 p. 144—157.
- *RABINOWITSCH (1914): Berl. klin. Wochenschr. Nr. 7.

- SCHILLING, V. (1912): Über die mögliche Umwandlung von Strukturen zu Pseudoparasiten, Chlamydozoenkörpern usw. in Erythrocyten und anderen Zellen. Zentralbl. f. Bakt. Abt. I (Orig.) Bd. 63 p. 393—400.
- *SCHÜTZE, V. (1925): Beiträge zur Kenntnis der GUARNIERI'schen Körperchen. Zeitschr. f. Hygiene Bd. 95 p. 1. Ref.: Zentralbl. f. Bakt. Abt. I Bd. 82 p. 8, 1926.
- *UNGERMANN, E. u. ZUELZNER, M. (1920): Beiträge zur experimentellen Pockendiagnose, zur Histologie des kornealen Impfeffektes und zum Nachweis der GUARNIERI'schen Körperchen. Arb. a. d. Reichsgesundheitsamte Bd. 52 p. 41. Ref.: Zentralbl. f. Bakt. Abt. I Bd. 71 p. 484—485, 1921.
- STRASBURGER, E. (1882): Über den Teilungsvorgang der Zellkerne und das Verhältnis der Kernteilung zur Zellteilung. Arch. f. mikr. Anat. Bd. 21 p. 497.
- YAMAHA, G. (1927): Experimentelle cytologische Beiträge. II. Mitt.: Über die Wirkung des destillierten Wassers auf die Wurzelspitzen von *Vicia faba* bei verschiedenen Temperaturen. Journ. Fac. sc. Imp. Univ. Tokyo. Sect. III Vol. 2 p. 215—296.

Tafelerklärung.

Tafel 7.

Die Umrissse aller Figuren sind mit dem Zeichenapparat von ABBÉ-ZEISS auf dem Niveau des Mikroskopisches bei einer Tubuslänge von 160 mm gezeichnet. Okular: ZEISS 8 comp., Objektiv: Apochromat 1,5 mm ZEISS. Vergrößerung ca. 1500. Nuclealreaktion. Fig. 15, 17, 21, 22, 23, 24 mit Gegenfärbung mit Lichtgrün.

Fig. 1—16. Epithelzellen der mit Vakzine geimpften Kaninchenkornea mit den GUARNIERI'schen Körperchen. Auf Fig. 9 sind 4 GK sichtbar. Auf den Fig. 7 und 15 zeigen die GK offenbar den Charakter der degenerierten Leucocytenkerne. Auf Fig. 15 ist der Cytoplasmarest (grün) auch sichtbar. Auf Fig. 7 ist ein doppeltes GUARNIERI'sches Körperchen mit stärker gefärbter Peripherie.

Fig. 17 und 22. Die degenerierenden Leucocyten neben den Epithelzellen (Zellkerne, die Zellengrenzen sind nicht gezeigt).

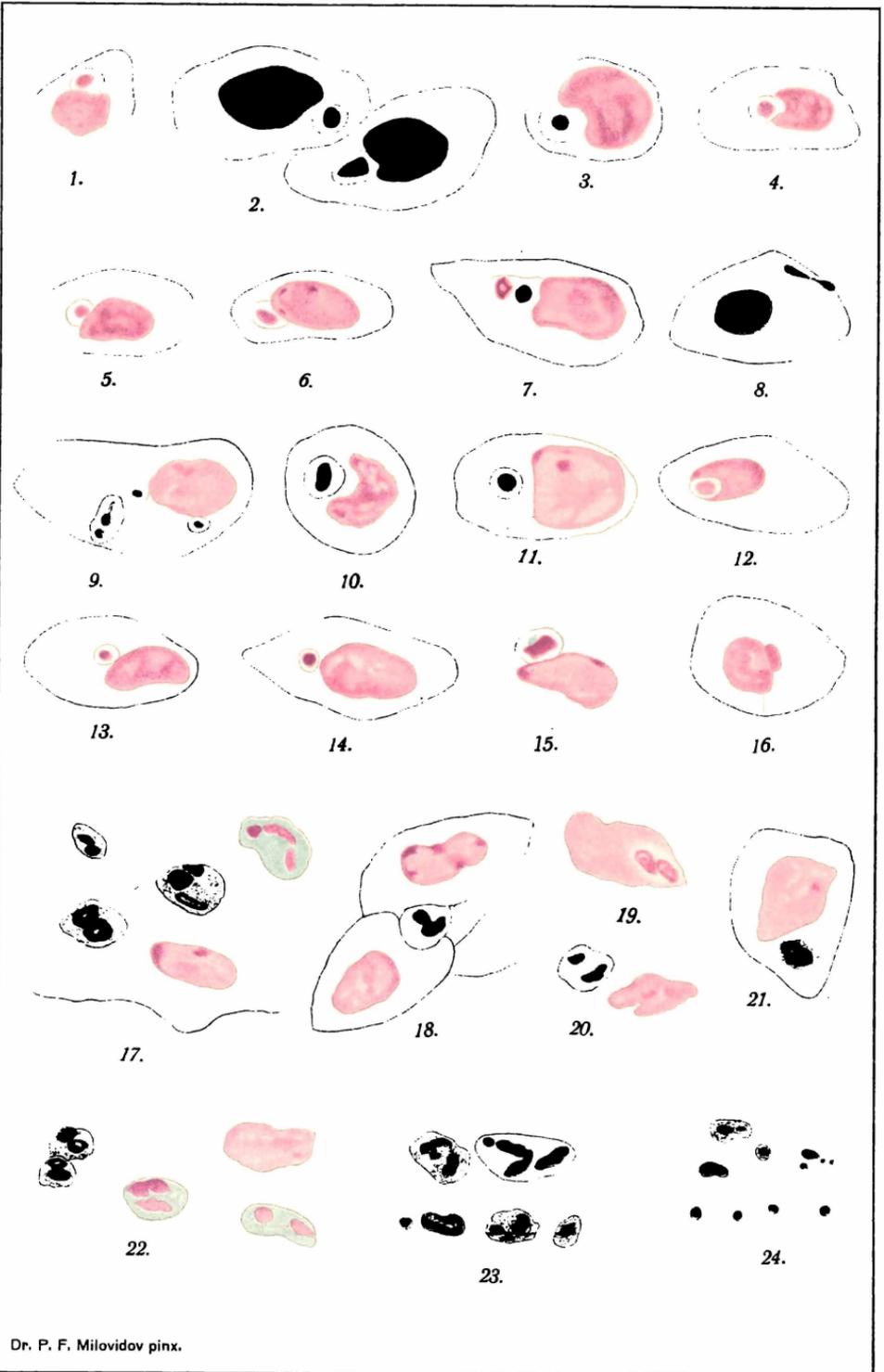
Fig. 18. Ein Leucocyt mit dem Kernreste, der eng zwischen den Epithelzellen geklemmt ist.

Fig. 19—21. Die GUARNIERI'schen Körperchen, die offenbar Leucocytenreste vorstellen. Auf Fig. 19 liegt das GK scheinbar im Innern des Zellkernes. Auf Fig. 20 ist das GK noch extra-, auf Fig. 21 schon intracellulär. Cytoplasmarest grün.

Fig. 23. Die Leucocytenreste mit den Kernfragmenten.

Fig. 24. Die Chromatinteilchen aus substantia propria, einige Reste sind mit Cytoplasma (grün) umringt.

Auf Fig. 3, 4, 10 haben die Zellkerne eine umgreifende Form.



Dr. P. F. Milovidov pinx.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Archiv für Protistenkunde](#)

Jahr/Year: 1934

Band/Volume: [81_1934](#)

Autor(en)/Author(s): Milovidov P.F.

Artikel/Article: [Zur Frage der Natur der Guarnieri'schen Körperchen. Studien mit der Nuclealreaktion. 179-194](#)