

ÜBER EINE NEUE LIPOID- BZW. LIPOPROTEIDFÄRBUNG

(EINSCHLUSSFÄRBUNG IN EINEM WEINSTEINSAURE-KRESYLECHT-VIOLETTGEMISCH)

Hiezu 1 Abbildung auf S. 43

Von PROF. DR. FRIEDRICH FEYRTER, Wien

Das färberische Rüstzeug des Anatomen und des pathologischen Anatomen zur Erforschung des normalen und pathologischen Lipoid- und Lipoprotein-stoffwechsels im menschlichen Körper ist in letzter Zeit vermehrt worden durch die FEULGENsche Plasmalreaktion sowie durch die von mir angegebene Einschlußfärbung in einem Weinsteinensäure-Thioningemisch (1936). Die Plasmalreaktion zeigt die Anwesenheit der Azetalphosphatide auf, die Einschlußfärbung die Anwesenheit der sogenannten chromotropen Lipoid- und Lipoproteide, die offenbar zur Gruppe der Phosphatide und Zerebroside gehören, in ihrem feineren chemischen Aufbau jedoch erst unzureichend erforscht sind (5), vielleicht Stoffe der Phosphatid-Zerebrosidegruppe in chemischer Bindung an nichtlipoidige, möglicherweise kohlehydratige Gruppen darstellen.

Die Zahl der Fundorte, an denen die besagte chromotrope Reaktion und die Plasmalreaktion in weitgehend übereinstimmender Weise positiv sind, ist erstaunlich groß. Doch sind die Plasmareaktion und die chromotrope Reaktion nicht identisch. Zweifellos gibt es Orte, an denen die chromotrope Reaktion positiv, die Plasmareaktion hingegen negativ ausfällt und umgekehrt (7).

Ein weiteres, neues färberisches Rüstzeug zur Erforschung des Lipoid- und Lipoprotein-stoffwechsels und damit die Kenntnis einer weiteren, neuen Gruppe lipoidiger bzw. lipoproteidiger Stoffe vermittelt die vorliegende Arbeit.

Das färberische Verfahren zum Nachweis dieser Lipoid- bzw. Lipoproteide, die hinsichtlich ihrer lipoidigen Beschaffenheit vielleicht der Gruppe der Phosphatide zugehören, ist die Einschlußfärbung in einem Weinsteinensäure-Kresylechtviolettgemisch. Ich habe auf dieses Verfahren schon vor Jahren (4) kurz hingewiesen. Im einzelnen stellt es sich wie folgt dar:

1. Fixieren in Formaldehyd (10% ige Lösung, 24 Stunden).
2. Auswaschen der Gewebstücke in aqua destillata (15 Minuten) und Anfertigung dünner Gefrierschnitte; Auswaschen der Schnitte in aqua destillata (10 Minuten).
3. Aufziehen der Schnitte auf einen Objektträger und Auftropfen einer wässrigen Weinsteinensäure-Kresylechtviolettlösung.
4. Auflegen des Deckgläschens auf die Schnitte und Absaugen der Flüssigkeit vom Rande her bis zum Äußersten.
5. Umrahmen des Deckgläschens mit einer Kittmasse.
6. Ergebnis des Färbeverfahrens, am Beispiel der glandula submandibularis wiedergegeben (s. Abb.):

Das Epithel der Streifenstücke (Speichelröhren) blau, der Schleim rosarot bis gelbrot, die Zymogenkörnchen der serösen Drüsenzellen von heller gelblichgrüner Farbe, die Basis dieser Zellen graurot. Die Kerne graurot, glatte Muskelfasern und marklose Nervenfasern zart graurot getönt, markhaltige Nervenfasern schmutzigrot, kollagenes Bindegewebe ungefärbt oder leicht gelblich getönt.

Jede Einzelheit dieser Ergebnisse, also jeder der aufgezählten Farbtöne, tritt gesetzmäßig in Erscheinung und ist für sich von Bedeutung.

Ich habe Entsprechendes schon für das Ergebnis der Einschlußfärbung in einem Weinsteinensäure-Thioningemisch betont (5) und PISCHINGER (8) hat folgerichtig alle Abweichungen vom eigentlichen Farbton der Farblösung als Ausdruck einer Chromotropie (Metachromasie) gewertet.

Doch soll in vorliegender Arbeit im wesentlichen nur von jenen Zellen und Stoffen die Rede sein, die bei Anwendung der Einschlußfärbung in einem Weinsteinensäure - Kresylechtviolettgemisch blaue Chromotropie (Cyanochromie) ¹⁾ zeigen; sie sind allein gemeint, wenn wir im folgenden von chromotropen Zellen bzw. Stoffen sprechen.

Bemerkungen zu dem Verfahren:

Zu 1: Die Chromotropie tritt nicht nur an frischem Untersuchungsgut, sondern auch in Gewebsstücken auf, die viele (24—48) Stunden nach dem Tode der Leiche entnommen wurden. An lange Zeit im Formaldehyd aufbewahrten Stücken gelingt die Färbung z. T. nicht mehr oder nur ganz schlecht.

Zu 3: Ich verwende in der Regel ein Weinsteinensäure-Kresylechtviolettgemisch in folgender Zusammensetzung: Kresylechtviolett²⁾ 1 g, Weinsteinensäure 0,5 g, destilliertes Wasser 100 g.

Zu 4: Luftblasen sind naturgemäß sorgfältig zu vermeiden und ebenso größere Faltenbildung im Schnitt.

Zu 5: Ich verwende zum Umrahmen der Schnitte das von B. ROMEIS empfohlene, von DU NOYER angegebene Lanolin-Kollophoniumgemisch oder den Deckglaskitt nach KRÖNIG der Firma E. LEITZ.

Zu 7: Das Färbeergebnis tritt sogleich ein. Es ist verschieden lang, in der Regel jedoch nur beschränkt haltbar.

Die Träger der blauen Chromotropie sind höchstwahrscheinlich lipoidige bzw. lipoproteidige Stoffe. Das erhellt schon daraus, daß minutenlange Vorbehandlung der Gefrierschnitte mit Alkohol (95 % iger Alkohol, 60° C) jegliche blaue Chromotropie beseitigt; die chromotropen Stoffe gehen hierbei in Lösung, finden sich im Abdunstungsrückstand des alkoholischen Auszuges

¹⁾ *κίανος* blau; *χρῶμα* Farbe.

²⁾ Kresylechtviolett besonders stark metachrom. Standardisierter Farbstoff „Bayer“, Firma Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig. Katalognummer H 148.

und zeigen, auf einem Objektträger ausgestrichen, bei Färbung mit dem Weinstein säure-Kresylechtviolettgemisch sattblaue Chromotropie³⁾.

Die lipoidige bzw. lipoproteidige Beschaffenheit der chromotrop blauen (cyanochromen) Stoffe geht auch daraus hervor, daß Gefrierschnitte alkoholfixierten Untersuchungsgutes (von Verschwemmungen abgesehen) jegliche blaue Chromotropie vermissen lassen.

Sie geht schließlich daraus hervor, daß die blaue Chromotropie auch in Gefrierschnitten unfixierten⁴⁾ Untersuchungsgutes eintritt, nach minutenlanger Vorbehandlung solcher Schnitte mit Alkohol jedoch ausbleibt. Sie fehlt nach Einbettung in Zelloidin oder Paraffin.

In Gefrierschnitten unfixierten Untersuchungsgutes erscheinen die verschiedenen chromotropen Zellen und Stoffe entweder zartblau (himmelblau) getönt und kaum gekörnt oder zartgraublau getönt und dabei grobflockig dunkelblau gekörnt.

Die Fixation der Gewebe in wässriger Sublimatlösung bewirkt, daß die Blaufärbung nur langsam eintritt und deutlich erst nach etwa 24 Stunden wird.

Das geschilderte Färbeergebnis läßt sich auch bei gewöhnlicher Vornahme der Färbung an Gefrierschnitten im Schälchen erzielen. Es erhält sich jedoch nicht beim Einschließen der Schnitte in Balsam; das ist aus der lipoidigen Beschaffenheit der chromotropen Stoffe leicht verständlich. Aber auch beim Einschließen der Schnitte in Glyzerin oder Lävulose scheint der blaue Farbton abzublassen, und dies ist nicht ohne weiteres erklärbar. Das Verfahren der Wahl zur gestaltlichen Erforschung der besagten chromotropen Zellen und Stoffe ist demnach vorerst die sogenannte Einschlußfärbung (4), d. h.: der Einschluß der Schnitte im Farbgemisch, wie ich dies oben genau geschildert habe.

Doch sind auch diese Schnitte in der Regel auf die Dauer nicht haltbar, einmal infolge starken Nachdunkelns der unfixierten Schnitte, ein andermal infolge Auftretens grober Niederschläge in den formolfixierten Schnitten und wieder ein andermal infolge des Ablassens und schließlich völligen Schwindens der Chromotropie. Schnitte formolfixierten Untersuchungsgutes dürfen vor Anstellung der Färbung nicht zu lange gewässert werden, also im allgemeinen nur etwa 15 Minuten, sonst erscheint das chromotrope Blau sehr blaß und mehr grau getönt, oder es tritt gegebenenfalls schließlich (nach Tagen) überhaupt keine Chromotropie mehr ein. Ich möchte diese Erscheinung an Gefrierschnitten formolfixierten Untersuchungsgutes dahin-

³⁾ Völlig beweisend für die fettige Natur der chromotropen Stoffe, die im Alkohol in Lösung gehen, ist der besagte Vorgang an sich nicht. Es könnte sich denkbarerweise um nicht fettige, wasserunlösliche oder nicht leicht in Wasser lösliche, stets mit Fetten zusammen vorkommende Stoffe handeln, die sich zugleich mit diesen Fetten lösen.

⁴⁾ Zur Färbung von Gefrierschnitten unfixierten Untersuchungsgutes eignet sich die reine 1⁰/₀ige Kresylechtviolettlösung ohne Weinstein säurezusatz besser. Am unfixierten Untersuchungsgut färbt sich übrigens der Schleim der glandula submandibularis nicht (s. Abb.).

gehend deuten, daß die chromotropen Stoffe durch das Wässern eine chemische Änderung erfahren, welche das Erlöschen der Chromotropie zur Folge hat. Meines Erachtens können demnach chromotrope Zellen in Gefrierschnitten formolfixierten Untersuchungsgutes ihre Chromotropie durch zweierlei Eingriffe verlieren:

1. Infolge Behandlung mit Alkohol; dabei schwinden die tragenden Stoffe der Chromotropie aus den Geweben wegen ihrer fettigen Natur durch Lösung.

2. Infolge längeren Wässerns; dabei erfahren die Träger der Chromotropie meines Erachtens eine chemische Abänderung (s. o.), welche den Verlust ihres chromotropen Vermögens zur Folge hat.

Aus diesem Grunde ist Gelatineeinbettung nicht angezeigt, für manche Organe (z. B. Bauchspeicheldrüse) sogar unbrauchbar.

Auch Gefrierschnitte unfixierten Untersuchungsgutes büßen durch längeres Wässern ihr Chromotropievermögen merklich oder völlig ein.

In Stücken formolfixierten Untersuchungsgutes geht bei längerem Aufenthalt der Stücke in der Fixierungsflüssigkeit das chromotrope Vermögen bestimmter Zellen und Stoffe verloren; meines Erachtens infolge hierbei eintretender chemischer Abänderung dieser Zellen und Stoffe.

Die Tatsache, daß Kresylechtviolett (von EHRlich und MORGENROTH in die Mikrotechnik eingeführt, s. R. KRAUSE, Encyclopädie der mikroskopischen Technik, 3. Aufl., 1926, 1242) einen durch stark metachromatische Eigenschaften ausgezeichneten Farbstoff darstellt, ist seit langem bekannt.

In den Handel kommen bzw. kamen die Marken R extra, RR, RB, B, BB (nach R. KRAUSE, 1926), Kresylechtviolett rein, standardisierter Farbstoff „Bayer“ (Firma Dr. K. HOLLBORN & SÖHNE, Leipzig. Katalognummer H 147) und Kresylechtviolett besonders stark metachrom. Standardisierter Farbstoff „Bayer“ (Firma Dr. K. HOLLBORN & SÖHNE, Leipzig. Katalognummer H 148). Ich vermochte lediglich die beiden letztgenannten Marken auszuprobieren, da die anderen Marken nicht erhältlich waren, und meine Angaben beziehen sich, wie bereits betont, ausschließlich auf die farbenfrohere der beiden untersuchten Marken, nämlich auf das besonders stark metachrom. Kresylechtviolett.

Über die Ergebnisse der Kresylechtviolettfärbung schlechthin macht R. KRAUSE folgende Angaben:

„Rein blau färbt sich das Zellprotoplasma, die Schleimzellen der Magenschleimhaut, die Belegzellen der Fundusdrüsen, schwachblau die kontraktiven Fibrillen der Muskelfasern, tiefblau die interstitiellen Körner der letzteren, rotviolett das Chromatin der Kerne und die Körner der Hauptzellen der Fundusdrüsen, rot die kollagenen Fasern, die Schleimkörner der Becherzellen und der Schleimdrüsen, die Grundsubstanz des Hyalinkorpels, die Körner der Mastzellen, rotorange die Markscheiden und reingelb die Erythrocyten.“

KRAUSE gibt bereits an: „Im Alkohol verschwindet die Metachromasie mehr oder weniger.“ Daß aber hierbei die blaue Chromotropie die stete An-

wesenheit diffus verteilter Lipoide bzw. Lipoproteide anzeigt, blieb unbemerkt und bildet erst den Gegenstand vorliegender Mitteilung.

Die Angaben KRAUSES über Einzelheiten des Färbeergebnisses weichen von meinen Feststellungen ersichtlich mehrfach ab. Ob dieser Mangel an Übereinstimmung aus der Verschiedenheit der verwendeten Marken oder aus der Verschiedenheit der angewandten Beobachtungsverfahren zu verstehen ist, vermag ich aus äußeren Gründen im Augenblick nicht zu erklären.

Über die chemische Beschaffenheit der chromotrop blauen (zyanochromen) Stoffe.

Daß es sich bei den chromotrop blauen Stoffen, die unter der Einwirkung des Alkohols stets in Lösung gehen, regelmäßig um eine lipoidhaltige Masse bzw. um einen lipoidhaltigen Komplex handelt, erscheint mir genügend sicher.

Doch habe ich mit meinen Schülern (1) schon früher eingeräumt, daß die Löslichkeit einer chromotropen Masse in Alkohol nicht völlig beweisend für die fettige Natur des Trägers der Chromotropie selbst in dieser chromotropen Masse sei und betont: „Es könnte sich denkbarerweise um nicht fettige, wasserunlösliche oder nicht leicht in Wasser lösliche, stets mit Fetten zusammen vorkommende chromotrope Stoffe handeln, die sich zugleich mit den Fetten lösen.“

Die bisherige chemische Analyse, die an frischem Herzfleisch, das ungewöhnlich reich an chromotrop blauen Stoffen erscheint, vorgenommen wurde, ergibt (Prof. Dr. HALDEN, Dr. KALAJDJEFF):

Alkoholextrakt = 2,2% der gesamten frischen Muskelmasse. Petrolätherextrakt = 90% des Alkoholextraktes oder 2% der gesamten Muskelmasse.

Rückstand des Petrolätherextraktes = 10% des Alkoholextraktes oder 0,2% der gesamten Muskelmenge.

Der Petrolätherextrakt ergibt mit Kresylechtviolett eine blaue Färbung, mit Thionin eine rote Färbung, mit Nilblausulfat eine blaue Färbung. Der Phosphorgehalt beträgt 5,8%, der Stickstoffgehalt 2,83%, $P/N = 0,94$.

Nach der bisherigen Analyse „handelt es sich offenbar um ein Gemisch verschiedener Phosphatide und deren Umwandlungsprodukte, denen andere Lipoide in geringen Mengen beigemischt sein dürften“ (KALAJDJEFF).

Meine eigenen Untersuchungen haben zunächst ergeben, daß es sich um Neutralfett, Cholesterin und Cholesterinester nicht handeln kann. Das lehrt schon die einfache Erfahrung an histologischen Schnitten, noch eindeutiger die färberische Probe⁵⁾ an den genannten chemischen Körpern in reiner Form. Ungefärbt bleiben die Palmitinsäure, die Stearinsäure, die Oleinsäure, die Cholsäure; auch die Linolensäure nimmt zunächst keine Farbe an, später (nach Wochen) erscheint sie, eingeschlossen in das Kresylechtviolett-Weinsteinsäuregemisch, zart graublau bis hellblau.

⁵⁾ Der Ausfall der Färbung an allen untersuchten Stoffen war durchaus unabhängig von einer etwaigen Vorbehandlung mit Formaldehyd. Die untersuchten fettigen Stoffe zeigten, ob mit Formaldehyd behandelt oder nicht, das nämliche färberische Verhalten.

Bläulich bis rotviolett färben sich in sehr kräftigem Ton sowohl das Lezithin wie das Sphingomyelin. Die Zerebroside bleiben an ein und demselben Untersuchungsgut zum Teil ungefärbt, zum Teil erscheinen sie rötlich bis rot gefärbt; diese färberischen Proben wurden angestellt am Zerebron, zerebronschwefelsauren Kalium, Kerasin, Gangliosid und an einem Zerebrosidegemisch⁶⁾.

Die Untersuchung an chemisch reinen Fettstoffen hat demnach kein eindeutiges Ergebnis gezeitigt. Wohl nehmen die Phosphatide einen bläulichen bis rotvioletten Farbton an, aber dieser Farbton weicht doch wohl von dem chromotrop blauen in Rede stehenden Farbton ab. Der an Phosphatiden so reiche Petrolätherextrakt gibt zwar eine chromotrop blaue Reaktion, aber er stellt keine reine Lösung dar und es bleibt wie oben betont fraglich, welcher chemische Körper in diesem Gemisch der eigentliche Träger der chromotropen Reaktion ist.

PISCHINGER hat die Vermutung ausgesprochen, daß der Träger der Chromotropie bei der von mir aufgedeckten Lipoproteidfärbung ein Eiweißkörper, der stets mit Lipoid in Alkohol übergehe, sein könnte, und hat in diesem Zusammenhang auf die blaue Chromotropie des nukleinsäuren Natrium verwiesen (9).

Die weitere Klärung der Frage möchte ich von der fortgesetzten Zusammenarbeit zwischen gestaltlicher Betrachtung und chemischer Zerlegung erwarten, für die Prof. Dr. E. KLENK (Köln) gewonnen ist.

Neben den chromotrop blauen Lipoiden bzw. Lipoproteiden gelangen in Gefrierschnitten formolfixierten Untersuchungsgutes durch die Einschlußfärbung in einem Weinstein säure-Kresylechtviolettgemisch auch anders gefärbte Lipoide bzw. Lipoproteide, z. B. gelbrot gefärbte solche Stoffe im Nervengewebe, zur Darstellung. Ich habe diese Lipoide bzw. Lipoproteide wegen ihres wenig auffälligen und einprägsamen, anscheinend wechselnden Farbtones einer Schilderung vorerst nicht unterzogen.

Z u s a m m e n f a s s u n g.

1. In Gefrierschnitten unfixierten oder fixierten Untersuchungsgutes tritt unter der Einwirkung einer wässrigen Weinstein säure-Kresylechtviolett-lösung eine eigenartige chromotrop blaue Anfärbung (Cyanochromie) bestimmter Zellen und Stoffe kennzeichnend und gesetzmäßig in Erscheinung, zum Teil unter musterhaften und gewöhnlichen, zum Teil unter abwegigen und krankhaften Verhältnissen. Das Verfahren der Wahl zur Darstellung der besagten Stoffe ist der Einschluß der Gefrierschnitte in der Farblösung (so genannte Einschlußfärbung) (4).

2. In alkoholvorbehandelten Gefrierschnitten bleibt diese Chromotropie regelmäßig aus, infolge Lösung der chromotropen Stoffe aus den Schnitten. Im Abdunstungsrückstand des alkoholischen Auszuges (z. B. des Herz-

⁶⁾ Diese Stoffe wurden mir freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. E. KLENK (Köln) überlassen.

fleisches) lassen sich die chromotropen Stoffe durch die besagte histochemische Probe nachweisen. Sie erscheinen hierbei sattblau.

3. Bei den in Alkohol sich lösenden chromotrop blauen (cyanochromen) Stoffen handelt es sich offenbar stets um Lipoid- bzw. Lipoproteide oder jedenfalls um stets lipoidhaltige Komplexe. Die Frage, ob der eigentliche Träger der Chromotropie in den chromotrop blauen Massen von lipoidiger (besonderer phosphatidiger?) oder andersartiger chemischer Beschaffenheit ist, bedarf der weiteren Erforschung durch gestaltliche Betrachtung und chemische Zerlegung in enger Zusammenarbeit.

4. Mit den anderen bisher bekannten diffus im Protoplasma verteilten Lipoiden: den Azetalphosphatiden und den sogenannten chromotrop roten Lipoiden bzw. Lipoproteiden (bei Einschlußfärbung in einem Weinsteinsäure-Thioningemisch) sind die sogenannten cyanochromen lipoidigen bzw. lipoproteidigen Stoffe (bei Einschlußfärbung in einem Weinsteinsäure-Kresylechtviolettgemisch) nicht identisch. Die angegebene Färbung deckt somit einen bisher unbekanntem Lipoid- bzw. Lipoproteidgehalt bestimmter Zellen, Gewebe und Stoffe des menschlichen Körpers auf.

Literatur

1. *Bienwald*, Virchows Arch. **303**(1939): 578
2. *Feulgen R.* und *Bersin Th.*, Z. physiol. Chem. **260** (1939): 217
3. *Feulgen R.*, *Bersin Th.*, *Behrens*, Kongreßbericht II des 16. internationalen Physiologischen Kongresses in Zürich 1938, 105
4. *Feyrter F.*, Virchows Arch. **296**, (1936): 645
5. — Z. mikr.-anat. Forschg **51**, (1942): 610
6. *Feyrter F.*, Wien. klin. Wschr. **55** (1942): 461
7. *Feyrter F.* und *Pischinger A.*, Wien. klin. Wschr. **55**, (1942): 463—464
8. *Pischinger A.*, Z. mikr.-anat. Forschg. **53**, (1943): 46
9. — Wien. klin. Wschr. **57**, (1944): 389—390.
10. *Romeis B.*, Taschenbuch der mikroskopischen Technik, 14. Auflage. 1943.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

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

Jahr/Year: 1946/1947

Band/Volume: [1](#)

Autor(en)/Author(s): Feyrter Friedrich

Artikel/Article: [Über eine neue Lipoid- bzw. Lipoproteidfärbung \(Einschlussfärbung in einem Weinstein säure-Kresyl-Echtviolettgemisch\). 49-55](#)