Download unter www.biologiezentrum.at

ÜBER EINE NEUE IMPRÄGNIERUNGSMETHODE ZUM IDENTIFIZIEREN DER KOLLOIDEN LIPOIDE UND LIPOPROTEINE IM NERVENSYSTEM

Mit 15 Abbildungen

Von FIL. DR. GUSTAF ALSTERBERG
Eksjö, Schweden

Die neue Imprägnierungstechnik und ihre Ergebnisse

a) Methodik

Das zu untersuchende unfixierte, aus den Nerven oder anderem Organgewebe stammende Objekt wird in die weitgehend abgekühlte Imprägnierungsflüssigkeit an einem Faden eingehängt. Diese ist folgendermaßen zusammengesetzt: 1,8 g JCN[1]), 80 ccm Aqua destillata sowie 20 ccm einer Ag-Chloratstammlösung[2]), die 2,2 g $AgNO_3$ entsprechen. Nach 3 Tagen wird das Objekt einige Stunden in Aqua destillata gewaschen, dann in 70, 80, 90, 96 und 100%igen Alkohol, Äther-Alkohol und ferner in 2, 4 und 6%ige Zelloidinlösung überführt. In jeder Flüssigkeit verbleibt das Präparat einen Tag. Nach $^1/_4$ Stunde in Benzolalkohol wird das Objekt in reines Benzol, Benzol-Paraffin und reines Paraffin eingebracht. Dieser Teil des Verfahrens stellt eine kombinierte Zelloidin-Paraffin-Methode dar, die wegen der weichen Beschaffenheit der Objekte geboten ist. Diese werden in 15 μ dicke Schnitte zerlegt, auf Objektträger aufgezogen, das Paraffin durch Xylol entfernt und die noch feuchten Schnitte schnell mit H_2S-Dampf behandelt, um die ausgefällten Ag-Salze in Ag_2S zu verwandeln. Die Schnitte werden mit 2—3 ccm Xylol mittels Pipette abgespült, in Kanadabalsam und mit Deckglas eingeschlossen.

[1]) JCN wird nach einer von mir ausgearbeiteten Methode (ALSTERBERG, 1928, 1941 b) dargestellt: 9 g $KClO_3$, 50 g J und 5 ccm konzentrierte HCl werden unter gleichzeitiger Abkühlung vermengt; sodann werden 40 ccm konzentrierte HCl zugesetzt, die Mischung unter schwachem Erwärmen geschüttelt und vom eventuell ungelösten Jod abgegossen. Die JCl-Lösung wird mit 25—30 g $Zn(CN)_2$ (nicht KCN!) versetzt, das ausgefällte JCN abfiltriert und mit Aqua destillata bis zum Freiwerden von Cl-Ionen gewaschen. Entsprechende Vorsicht ist zu beachten und die Synthese nur einem erfahrenen Chemiker anzuvertrauen.

[2]) Auch das $AgClO_3$ habe ich selbst dargestellt: 55 g $AgNO_3$ werden in 75 ccm Aqua destillata gelöst und mit 100 ccm 15%iger NaOH-Lösung versetzt. Das Ag_2O wird abfiltriert, gewaschen und mit einer Lösung von 50 g $Ba(ClO_3)_2$ in 150 ccm Aqua destillata versetzt. Darauf werden 15 g konzentrierte H_2SO_4, verdünnt mit 40 ccm Aqua destillata, zugesetzt (entsprechende Abkühlung!). Die erhaltene $AgClO_3$-Lösung wird durch Dekantieren vom $BaSO_4$-Niederschlag getrennt, der außerdem gewaschen wird, um $AgClO_3$-Reste zu gewinnen. Die ganze Lösung wird auf 500 ccm verdünnt und stellt so die oben erwähnte Stammlösung dar. Auch für die Durchführung dieses Verfahrens ist ein geübter Chemiker erforderlich. Früher benutzte ich als Imprägnierungsflüssigkeit $AgNO_3$, aber dieses zeitigt nicht so gute Resultate wie das Chlorat.

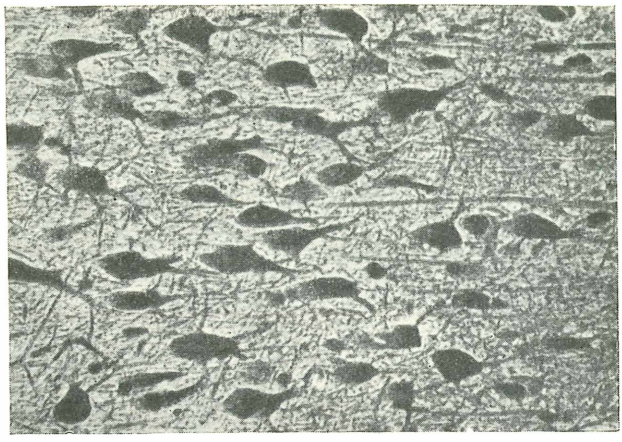


Abb. 1. Großhirn, Katze. Pyramidenzellen und protoplasmatische Glia. 450 1.

Die Imprägnierung zeigt im Block drei verschiedene Zonen: eine periphere, mit feinkörnigen, wenig deutlichen Strukturverhältnissen, eine Zwischenschichte mit den klarsten Bildern und schließlich eine innere Schichte mit grobkörnigem Ausfall der Versilberung.

b) Darstellung von Ganglienzellen und Dendriten

Am besten gelingt die Imprägnierung in Material aus dem zentralen Nervensystem von Säugetieren. Die Ganglienzellen, ihre Dendriten sowie oft auch die Kerne werden scharf sepiabraun imprägniert (Abb. 1). In der Gegend des Axonkegels ist jedoch weniger imprägnierbare Substanz vorhanden. Ab und zu ist der periphere Kernanteil hell, seine zentralen Anteile dunkel, was durch verschiedene Intensität der Imprägnierung bedingt ist. Sehr oft zeigt sich eine Imprägnation in Form gröberer, nicht scharf begrenzter Stränge, also keine feine Neurofibrillendarstellung. In den Rückenmarkelementen läßt sich sehr oft eine besondere Imprägnierung der Zellperipherie erkennen, dagegen aber keine solche der Kerne. Diese ungleichmäßige Verteilung der imprägnierbaren Substanz in den Zellen des Rückenmarks veranschaulicht Abb. 2.

In Schnitten, aus denen die Ag-Salze mit einer sehr schwachen KCN-Lösung innerhalb möglichst kurzer Zeit entfernt und mit Eisenhämatoxylin (SPIELMEYER 1930, S. 97) gefärbt wurden, treten die gleich unten erwähnten Nissl-Körper, aber keine Neurofibrillen zutage. Das Zelloidin in den Schnitten darf nicht entfernt werden, da sonst Schrumpfungen eintreten. Ich benutze daher zur Nachbehandlung des Schnittes statt Äthylalkohol Isopropylalkohol, in dem Zelloidin unlöslich ist.

Nach Färbung mit Gallozyanin (EINARSON 1932) zeigen die Ganglienzellen in ähnlich vorbehandelten Rückenmarkschnitten häufig ziemlich gute Nissl-Färbung. Offenbar füllen die erwähnten grobfädigen Strukturen in

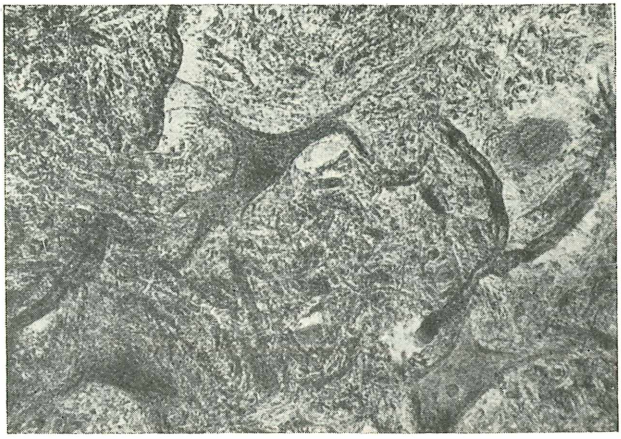


Abb. 2. Rückenmark, Kuh. Ganglienzellen mit fädigem Inhalt, Kapillaren. 450 1.

den gut imprägnierten Ganglienzellen die Spalten zwischen den Nissl-Körpern netzartig aus, wodurch diese als Spindeln oder Körner hervortreten. In den Rückenmarkzellen enthält die stark imprägnierbare Peripherie keine Nissl-Körper. In vor dem Imprägnieren mit kaltem Pyridin extrahierten Gewebeblöcken verschwinden die Nissl-Körper; die imprägnierbaren Strukturen treten aber trotzdem oft sehr scharf hervor. Wären diese und die Nissl-Körper identisch, so würde der pyridinbehandelte Zelleninhalt zerfallen und eine amorphe Masse bilden. Daß die beiden Substanzen nicht identisch und verschieden gelagert sind, geht auch daraus hervor, daß die Dendriten, die stärker als die Zellenkörper imprägniert werden, gleichzeitig eine schwächer ausgebildete Nissl-Struktur aufweisen.

c) Darstellung von marklosen und markhaltigen Nervenfasern

Bei seinem Austritt aus der Zelle ist der Axon sehr dünn und tritt nur selten deutlich zutage. Dagegen wird der markhaltige Achsenzylinder sehr stark, oft schwarz, imprägniert und hebt sich daher z. B. in Rückenmarkschnitten scharf von der schwach gefärbten Markscheide ab (Abb. 3). Im allgemeinen ist die Schrumpfung der Achsenzylinder ziemlich gering. Bei genügender Vergrößerung kann man eine besondere, sehr dünne und scharf imprägnierte Hülle derselben unterscheiden (Abb. 4, Zeichnung), die ich zuerst als die äußere Schicht des Achsenzylinders, also als eine „Achsenzylindergrenzhaut" (JAKOB 1913) aufgefaßt habe (ALSTERBERG 1941 b). Bei Imprägnierung mit OsO_4 und damit verbundenen Versuchen konnte ich indessen feststellen, daß diese Schichte zur Markscheide selbst gehört und der inneren Schichte derselben, also der Mauthnerschen Scheide, entsprechen muß. Die Grenzhaut von JAKOB hingegen ist eine unmittelbar innerhalb dieser Scheide gelegene dünne Schichte, die infolge schwacher

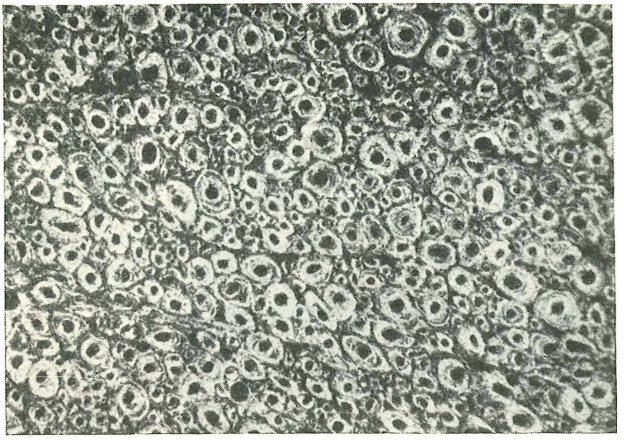


Abb. 3. Rückenmark, Kuh. Weiße Substanz. Querschnitt. 450 : 1.

Imprägnierung als eine helle Zone zwischen Mauthnerscher Scheide und dem Innenteil des Achsenzylinders nachzuweisen ist.

In den Achsenzylindern habe ich keine Neurofibrillen gesehen, weder in den imprägnierten noch in den mit Eisenhämatoxylin gefärbten Rückenmarkschnitten. Die Imprägnierung ist offenbar auch eine gute Fixierungsmethode sowohl für Ganglienzellen als auch für Achsenzylinder.

Zwischen efferenten und afferenten Fasern und ihren Scheiden konnte ich keine Unterschiede feststellen; abgesehen vom Kaliber haben sie ganz ähnlichen Bau. Dagegen geben die imprägnierten Milznerven der Kuh ein ganz anderes Bild; so ist z. B. hier der Gehalt an imprägnierbarer Substanz sehr gering.

d) Darstellung der Markscheiden

Die Markscheiden zeigen mit Ausnahme der schon erwähnten Mauthnerschen Scheide eine hellgelbe Farbe, die sich von der dunkelbraunen oder schwarzen der Achsenzylinder scharf abhebt. In den imprägnierten und auch in den mit Eisenhämatoxylin gefärbten Markscheiden habe ich sehr oft den von vielen Verfassern beschriebenen „Radspeichenbau" gefunden. In Abb. 3 treten konzentrische, ziemlich stark imprägnierte Strukturen hervor, die Querschnitte der Golgi-Lantermannschen Trichter, deren Darstellung im Rückenmark auch aus Längsschnitten hervorgeht (Abb. 5). Ähnlich treten diese Trichter in den peripheren Nerven zutage, die von den Achsenzylindern ohne Unterbrechung durchzogen werden. In nicht mit H_2S behandelten imprägnierten Schnitten, die lange Zeit dem Licht ausgesetzt waren und daher durch freies Ag stark gefärbt waren, habe ich eine besondere Anreicherung imprägnierbarer Substanzen in den Trichtern feststellen können. Auch konnte ich in solchen Präparaten Gliafäden wahrnehmen, die die Scheiden im Niveau der Trichter überquerten. In Längsschnitten von vorher pyridinbehandelten und dann imprägnierten Rückenmarkblöcken waren ein-

download unter www.biologiezentrum.at

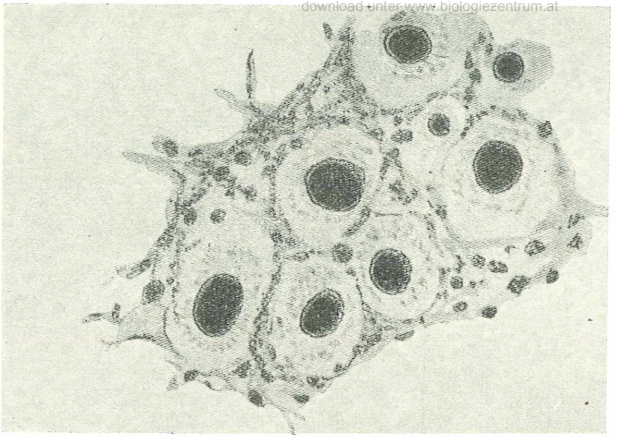


Abb. 4. Rückenmark, Kuh. Achsenzylinder mit der Mauthnerschen Scheide und der Achsenzylindergrenzhaut. Im Markscheidengebiet Reste der Radspeichen. Querschnitt. Zeichnung. 750: 1.

gerissene Reste von Rezzonico-Fäden zu sehen, die regelmäßigen Abständen mit dem Achsenzylinder in Verbindung standen. Auch in den vorbehandelten und dann mit Eisenhämatoxylin gefärbten Rückenmarkschnitten waren diese Strukturen sichtbar. Es kann sich also nicht um Artefakte handeln, sondern um intravitale Strukturen, deren zentrales Vorkommen hier zum erstenmal beschrieben wird. Dagegen sind die Radspeichen sicher als das Ergebnis einer radiär wirkenden Kontraktion des Achsenzylinders beim Fixieren aufzufassen.

In den peripheren Nerven wird die äußere Zone der Scheide stark imprägniert, doch weiß ich nicht, ob diese Imprägnierung die Schwannsche Scheide betrifft. Das Übergangsgebiet, in dem sich die zentrale Nervenfaser mit der peripheren Scheide umkleidet, hebt sich im mikroskopischen Bild sehr deutlich ab.

e) Darstellung der Gliagewebe

In den zentralen Teilen des Großhirns werden vor allem die astrozytischen Langstrahler der weißen Substanz dargestellt. Diese Gliazellen entsenden lange Fasern zu den Gefäßen, wo sie eine perivaskuläre Gliamembran bilden. Auch die Marginalglia wird häufig versilbert, wenn auch die peripheren Teile des Blockes und besonders die Molekularschichte wenig gute Bilder geben. Die protoplasmatischen Astrozyten in der grauen Substanz färben sich mehr braun und zeichnen sich durch Grobkörnigkeit aus (Abb. 6). Hier sind auch die perivaskulären Membranen schwächer ausgeprägt, und oft treten die Kapillaren nur als helle Streifen hervor.

Auch die Oligodendrogliazellen treten zuweilen als deutliche, mit den Ganglienzellen innig vergesellschaftete Satelliten zutage. Oft sind diese gar nicht oder nur teilweise imprägniert, aber im allgemeinen sieht man ihre kleinen, mehr oder weniger deutlich versilberten Kerne in einem einer

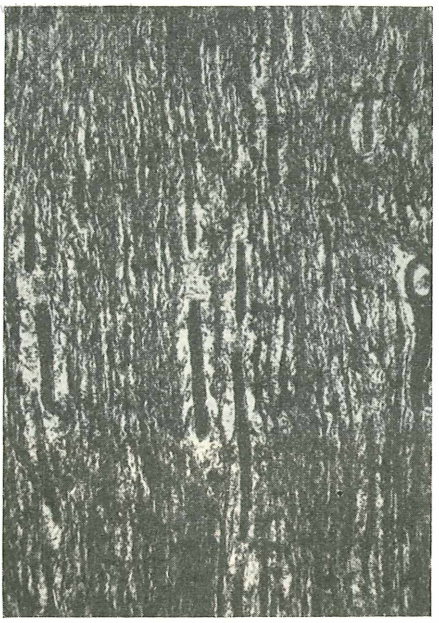


Abb. 5. Rückenmark, Kuh. Längsschnitt. 450 1.

Ganglienzelle benachbarten hellen Gebiet liegen. Dies ist offenbar der Gliazellkörper selbst, von dem imprägnierte Ausläufer ausgehen, die sich in sehr charakteristischer Weise an die Ganglienzellen anschmiegen. Hier ist kein Raum für eine spezifische „Nisslsche graue Substanz" vorhanden, und es besteht kein Grund, in jenen Fällen besondere Verhältnisse anzunehmen, in denen die Glia so schwach imprägniert wurde, daß das ganze perizelluläre Gebiet als eine helle Zone erscheint. Bei schlechter Fixierung kommt es in diesem Gebiet leicht zu Zerreißungen, die nebst der geringen Färbbarkeit der Oligodendroglia zu der Auffassung beigetragen haben, daß die Ganglienzellen von Lymphspalten, den sog. Obersteinerschen Räumen, umgeben sein sollen. Dagegen stehen die Kapillaren in der grauen Substanz des Rückenmarks in innigem Kontakt mit den Ganglienzellen.

In der weißen Substanz des Großhirns werden die Zellkerne in den interfaszikularen Oligodendroglia-Anhäufungen und auch die zugehörigen, äußerst feinfaserigen Strukturen oft imprägniert, obgleich sich diese bei Verwendung einer anderen Methode, bei der ich Pd-Chlorür und JCN benutzte (ALSTERBERG 1941 b), wohl besser, aber „launenhaft" darstellen lassen. In diesen Gliaanhäufungen fand ich wahre Gitter von feinen parallelen Fasern, die quer über die Anhäufungen und auch quer über die Nervenfäden und die groben Astrozytenfasern verliefen, die sich längs der Interfaszikularglia erstrecken. Einige Zeit glaubte ich, daß die genannten feinen Fasern von den längsverlaufenden Astrozytenfasern ausgingen, um mit den Oligoglia-

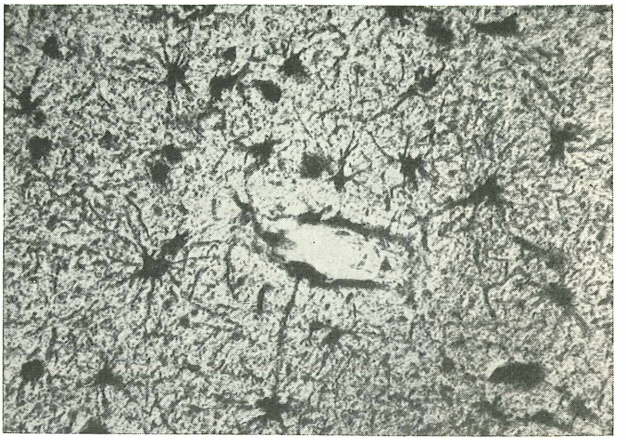


Abb. 6. Großhirn, Katze. Protoplasmatische Astrozyten und perivaskuläre Glia. 450 : 1.

zellen in Kontakt zu treten. Mit besseren optischen Hilfsmitteln habe ich später festgestellt, daß die Fasern den interfaszikularen Gliazellen angehören, deren Protoplasma jedoch nur selten deutlich imprägniert wird.

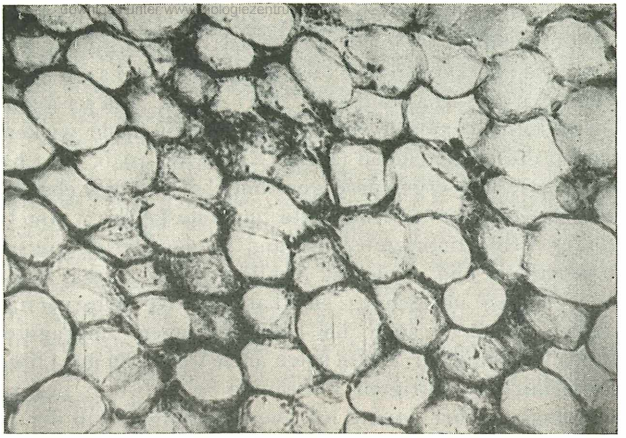
In der weißen Substanz des Rückenmarks treten bei gewöhnlicher Imprägnierung namentlich in Längsschnitten parallel zu den Nervenfasern angeordnete Gliafasern zutage, die allenthalben querverlaufende, sich um die Markscheiden windende Fasern entsenden. Das zellulare Zentrum der Fasern ist schwer festzustellen. Hier handelt es sich um eine Form der von RIO HORTEGA (1928) beschriebenen myelinbildenden Oligodendroglia. Die innige Verquickung der Glia mit den Golgi-Lantermannschen Trichtern habe ich schon früher erwähnt.

f) Die Chemie der Imprägnierung

Die charakteristische Beschaffenheit der mit meiner Methode erhaltenen histologischen Bilder förderte in hohem Grad weitere Untersuchungen über die Spezifität der Methode. Später in dieser Arbeit wird beschrieben, wie eine vorhergehende Behandlung mit lipoidlösenden Flüssigkeiten, wie Alkohol, Äther, Chloroform, Benzol, Xylol usw., die Imprägnierung in bestimmter Weise ausschaltet. Die Ansammlung der imprägnierbaren Substanzen in den genannten Extraktionsflüssigkeiten konnte auch quantitativ festgestellt werden, wobei als Maß der Verbrauch der den verschiedenen Proben zugesetzten Imprägnierungsflüssigkeit (hier JCN und $AgNO_3$) titrimetrisch ermittelt wurde. Schließlich habe ich die chemische Dynamik bei der Imprägnierung untersucht.

Als Untersuchungsmaterial benutzte ich das Gehirn von Kühen. Die Hirnhäute wurden entfernt, das Gehirn gemahlen, gewogen und mit kaltem Wasser, Azeton, Äther, absolutem Alkohol, Methylalkohol und Chloroform nacheinander extrahiert, wobei die Hirnsubstanz in Hinblick auf die ver-

Abb. 7. Nierenfett, Igel. 450 : 1.



schiedene Löslichkeit ihrer Bestandteile folgendermaßen fraktioniert wurde: 1. die Hirnsubstanz als solche, 2. der wässerige Extrakt, 3. die Cholesterinfraktion, 4. das Lezithin, 5. das Kephalin, 6. das Sphingomyelin, 7. die Galaktolipine und 8. der ungelöste Rückstand (ALSTERBERG 1940). Abgewogene und in Aqua destillata eingebrachte Proben dieser Substanzen wurden während einer bestimmten Zeit mit bestimmten Mengen Imprägnierungsflüssigkeit versetzt, worauf bei Abschluß des Versuchs die Mengen unverbrauchten JCN und Ag-Ionen und damit auch der Verbrauch dieser titrimetrisch festgestellt wurde. Die Werte des Ag-Verbrauchs gingen mit den Werten für den JCN-Verbrauch parallel und waren für die Kephalin- und die Lezithinfraktion besonders groß. Obgleich diese natürlich keine chemisch reinen Substanzen darstellten, ist doch anzunehmen, daß der JCN- und der Ag-Verbrauch und damit die Gewebeimprägnierung auf das Vorkommen von Lezithin und Kephalin zurückzuführen ist.

In bezug auf die Wirkungsweise der Imprägnierungsflüssigkeit kann man mehrere Möglichkeiten in Betracht ziehen. Das Ag-Salz kann die primär angreifende Substanz sein, worauf das JCN eine Oxydation des im Präparat ausgefällten Ag vermittelt. Indessen zeigen Präparate, die entsprechend dieser Annahme zuerst mit einem Ag-Salz und darauf mit JCN behandelt wurden, eine ganz andere und überdies schlechtere Imprägnierung als die gewöhnliche. Außerdem verursacht das JCN — auf Grund anderer Versuche erhärtet — keine nennenswerte Oxydation dieser Ag-Niederschläge. Es muß daher das JCN die bei der Imprägnierung aktive Substanz sein. Kolamin und Cholin könnten als Amine eine Bildung von in verschiedener Weise substituierten, unlöslichen Ag-Zyanamiden bedingen, aber diese Annahme stimmt mit dem geringen Fällungsvermögen des Sphingomyelins schlecht überein. Später fand ich tatsächlich, daß in einem während der Imprägnierung sauer gewordenen Medium keine Ag-Zyanamide gefällt werden.

Es besteht die Möglichkeit, daß die beinahe allen Phosphatiden vorkommenden ungesättigten Fettsäuren, also die Doppelbindungen zwischen den C-Atomen, die Angriffspunkte bei der Imprägnierung bilden. Diese sollte demnach wie eine Jodzahlmethode wirken. Zuerst verwarf ich jedoch diesen Gedanken (ALSTERBERG 1940, 1941 b) wegen der negativen Imprägnierungsergebnisse gewöhnlicher Fettgewebe, gleichgültig ob es sich um feste oder um weiche Fette handelte (Abb. 7). Im Innern der Fetttropfen gibt es keine Imprägnierung, und an der Peripherie ist die Fällung äußerst unbedeutend und wird laut Abbildung nur an den horizontalen Grenzflächen der Tropfen im Schnitt sichtbar. Es ist selbstverständlich, daß die vertikalen Flächen auch bei sehr geringer Imprägnierung scharf hervortreten. In ähnlicher Weise fielen auch Versuche mit Oliven-, Lein- und Fischöl sowie mit ungesättigten Fettsäuren in Substanz negativ aus.

Demgegenüber konnte ich aber feststellen, daß der Angriffspunkt der Imprägnierung die Doppelbindungen der fettsäurehaltigen Substanzen betrifft. Um dies sicherzustellen, wurden Öl- und Leinölsäure mittels KOH in Wasser gelöst und die Lösung dann mit HNO_3 neutralisiert, weil JCN von freiem Alkali angegriffen wird. Dann wurde die Imprägnierungsflüssigkeit rasch zugesetzt, wobei eine starke Fällung entstand, die außer aus gefällten Fettsäuren hauptsächlich aus AgCN bestand, während das Jod zum allergrößten Teil von der Fettsäure gebunden wurde, was ich direkt feststellen konnte. In gleicher Weise vorbehandelte Palmitin- oder Stearinsäure vermochte keine Ag-Salze zu fällen. Demnach ist die neue Methode für kolloidal verteilte Fette und damit für die obengenannten Phosphatide als mikroskopisches Diagnostikum spezifisch. Man hat versucht, diese Lipoide durch eine derartige Behandlung der Präparate nachzuweisen, da sie sich in Tropfen sammeln, also eine „demasquage lipophanerogène" durchmachen (ref. von LISON 1936). Es ist leicht einzusehen, daß die hierbei erhaltenen Bilder irreführend sein müssen. Selbes gilt dagegen nicht für die von FEYRTER (1946) und anderen Verfassern beschriebenen sehr wertvollen Methoden, die ganz andere Verfahren benutzen.

Auch habe ich mit ungefähr gleichem Ergebnis die Wirkung der Imprägnierung auf Allylalkohol geprüft. JCN ist offenbar etwas, aber nur unbedeutend hydrolisiert:

$$(1) \qquad JCN + H_2O \rightleftarrows HCN + HOJ.$$

Bei gleichzeitiger Anwesenheit von ungesättigten Verbindungen obengenannter Art sowie eines löslichen Ag-Salzes folgen die Reaktionen:

$$(2) \quad CH_2 \quad CH \cdot CH_2OH + HOJ = CH_2(OH) \quad CHJ \quad CH_2OH.$$

$$(3) \qquad HCN + AgClO_3 = AgCN + HClO_3.$$

download unter www.biologiezentrum.at

Die Hydrolyse des JCN muß sich also nach rechts verschieben.

Die alleinige Anwesenheit von Doppelbindungen hat wenig Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit, denn bei der Behandlung von ungesättigtem Fett mit JCN allein bleibt dieses ziemlich lange unverbraucht. Wesentlich ist hier die gleichzeitige Anwesenheit des löslichen Ag-Salzes. Zu diesem Ergebnis trägt der Umstand bei, daß JCN in Fett leicht löslich ist und daher von fetthaltigen Strukturen stark gebunden wird und dann seinerseits auf das lösliche Ag-Salz bindend wirkt. Ein größerer, nicht verbrauchter Überschuß an Ag-Salz muß dagegen das Imprägnierungsresultat ungünstig beeinflussen. Außerdem kann es durch Freimachen von Jod aus den jodierten Fettsäuren AgJ bilden. AgJ ist im Gegensatz zu AgCN in einem xylolfeuchten Schnitt nicht zu Ag_2S umsetzbar. Wahrscheinlich beruht die schlechtere histologische Beschaffenheit der peripheren Teile des imprägnierten Blocks auf Ausfällung von AgJ.

Vorkommen der Lipoide in den verschiedenen Bestandteilen des Nervensystems

a) Die Lipoide in den Ganglienzellen

Ich habe bereits 1945 versucht, an Hand der von mir am Anfang dieser Arbeit angegebenen Methodik die Fundstätten der einzelnen Lipoide in den Ganglienzellen durch Imprägnierung und mikroskopische Untersuchung von Nervengewebeblöcken zu lokalisieren, die vorher mit lipoidlöslichen Flüssigkeiten behandelt wurden (ALSTERBERG 1945 a, 1945 b). Wie wir später sehen werden, sind die Lipoide in den Geweben jedoch häufig besonders fest an Proteine gebunden. Ferner beeinflussen sich die verschiedenen Lipoide gegenseitig in ihrer Löslichkeit. Außerdem werden in den einzelnen Teilen des Blocks verschiedene Strukturbilder erhalten und die Extraktionsmöglichkeiten sind ganz andere, je nachdem es sich um eine feingemahlene Masse oder um einen histologischen Block handelt. Später wurde die histologische Analyse mit einer Analyse der gleichzeitigen Extrakte kombiniert. Hierbei zeigte sich im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Verfasser, daß die verschiedenen Extraktionsflüssigkeiten trotz allem eine ziemlich fraktionierende Wirkung auf die verschiedenen Fette ausüben. Verschiedene Teile des Nervensystems verhalten sich jedoch sehr ungleich; während z. B. die Pyramidenzellen und ihre Kerne sehr leicht extrahiert werden können, widerstehen die Ganglienzellen des Rückenmarks auch sehr energischen Extraktionen. Nach dem Verhalten der Pyramidenzellen hat man allen Grund anzunehmen, daß das wichtigste Phosphatid aus Lezithin besteht. Die Extraktionen gehen häufig mit stark deformierenden Schrumpfungen einher und es ist leicht zu verstehen, wie störend sich solche Deformationen in bezug auf die Nissl-Strukturen auswirken müssen, die laut Vorschrift nur in einem ausgiebig mit Alkohol vorbehandelten Material sichtbar werden.

b) Die Lipoide in den Markscheiden

Die stark imprägnierbaren Achsenzylinder müssen große Mengen von Phosphatiden enthalten, die Markscheiden dagegen nur geringe Mengen von diesen Substanzen, ein Befund, der zu der bisher gültigen und anscheinend wohlbegründeten diesbezüglichen Auffassung in direktem Widerspruch steht. Auf Grund ihres OsO_4-reduzierenden Vermögens, ihrer Doppelbrechung sowie ihres Vermögens, „Myelinformen" zu bilden, scheinen die Markscheiden diese beiden und andere Lipoide zu enthalten, während die Achsenzylinder in allen diesen Belangen wie „optisch leer" erscheinen. Auch nach einer sehr kurzdauernden Extraktion des Rückenmarkblockes mit kaltem Azeton werden die imprägnierten Markscheiden noch heller, offenbar infolge Herauslösens von Cholesterin, dessen reichliches Vorkommen in den Markscheiden nach COLLIN und CHAVAROT (1934) durch Fällen mit Digitonin nachgewiesen wurde. Ebenso gibt eine kurzdauernde Extraktion mit Pyridin gleicherweise infolge Cholesterinextraktion dasselbe Bild. Doch muß auf Grund der Art der Doppelbrechung der Markscheiden noch ein nicht ganz so leichtlösliches Lipoid im Markscheidenraum vorhanden sein. Es kann mit Alkohol und allmählich auch mit Azeton extrahiert werden. Da in diesem Extrakt außer Cholesterin nicht unbedeutende Mengen von Lezithin gefunden wurden, dagegen nur wenige Beimengungen anderer Lipoide, bin ich der Ansicht, daß auch dieses Phosphatid in den Markscheiden vorkommt, wo es in dem kurz mit Azeton behandelten Block in Form gleichmäßig verstreuter gelber Körner in Erscheinung tritt.

Durch einen glücklichen Zufall konnte ich schließlich die Frage, welche Markscheidensubstanzen für die Entstehung der bei Wasserbehandlung auftretenden Myelinformen verantwortlich wären, entscheiden. Vorausgeschickt sei, daß der Block unmittelbar nach der Azetonbehandlung in der Regel sorgfältig ausgewaschen wurde, um das Azeton zu entfernen. In einigen Fällen unterblieb jedoch das Auswaschen und der extrahierte Block wurde vom Azeton direkt in das Imprägnierungsmittel überführt. Die im Markscheidenraum ausgefällte, imprägnierte Substanz trat immer in Form einiger weniger konzentrischer Schichten auf, ohne den Raum auszufüllen, während bei der intermediären Wasserbehandlung eine fragmentierende Myelinformbildung sich zeigte, die den Markscheidenraum ausfüllte. Am wertvollsten war jedoch die Feststellung, daß von den Schnittflächen solcher kurz mit Azeton behandelter Blöcke in Aqua destillata keine Myelinformen abgeschieden wurden. Da also die Azetonbehandlung das Vermögen der Phosphatide des Markscheidenraumes — wahrscheinlich Lezithine —, solche Bildungen hervorzubringen, nicht aufgehoben hatte, kommt offenbar dieses Phosphatid hier nur in sehr geringer Menge vor.

Früher glaubte ich in gewissen Präparaten die Entstehung von „Neurokeratinfasern" festgestellt zu haben, namentlich in vor der Imprägnierung azetonbehandelten Rückenmarkblöcken, die wie in der früher beschriebenen Methode mit Eisenhämatoxylin gefärbt wurden. Die von mir beobachteten

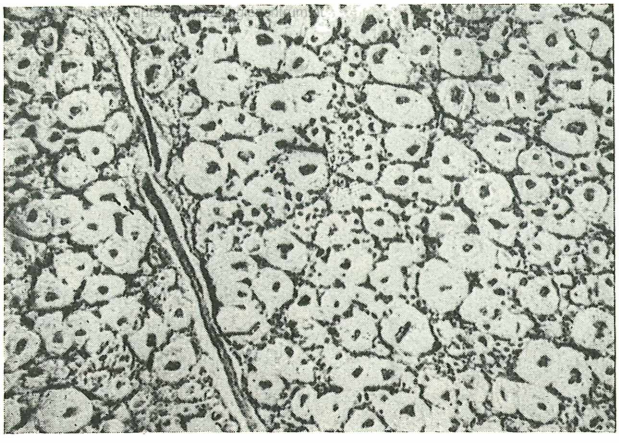


Abb. 8. Rückenmark, Kuh. Weiße Substanz, extrahiert mit warmem Chloroform und absolutem Alkohol. 450:1.

Fasern, die ein Gegenstück zu den Radspeichen bilden sollen und durch die Azetonbehandlung noch schärfer zutage traten, gehören indessen zu den Golgi-Lantermannschen Trichtern, also zur Glia.

Da OsO_4 die Markscheide stark imprägniert und man gleichzeitig der Ansicht war, daß diese im wesentlichen aus Phosphatiden aufgebaut sei, wurde daraus fälschlich geschlossen, daß hier eine für die Phosphatide spezifische Reaktion vorliege. Jedoch hat z. B. ESCHER (1919) in einem Diagramm gezeigt, daß Lezithin nur wenig auf OsO_4 reagiert. Tatsächlich enthalten die wäßrigen Extrakte von Hirnsubstanz gewisse Stoffe, die auf OsO_4 stark reduzierend wirken und auf Grund ihrer Löslichkeit kaum Lipoidnatur besitzen dürften. OsO_4 wird z. B. von Askorbinsäure und Zystein stark reduziert, und solche Substanzen können in der Markscheide vorkommen, namentlich in der oben erwähnten Mauthnerschen Scheide. Aus dieser läßt sich die OsO_4-imprägnierbare Substanz kaum mit lipoidlösenden Flüssigkeiten extrahieren. Die Mauthnersche Scheide nimmt nach einer starken Extraktion und darauffolgender Imprägnierung nach meiner Methode das Aussehen eines dunklen Schlauches an, dessen helles Innere aus dem stark extrahierten und gleichzeitig kontrahierten Achsenzylinder besteht (Abb. 8). Die imprägnierbare Substanz der Scheide kann demnach kaum aus Phosphatiden bestehen, wie ich es früher für diese Struktur fehlerhaft angenommen habe. Bei starker Schrumpfung des Achsenzylinders entstehen in diesem gewöhnlich Zerreißungen.

Die mit den ausgefällten Ag-Salzen imprägnierten Blöcke zeigen in den quergeschnittenen Markscheiden eine sehr stark negative Doppelbrechung, die auch in den H_2S-behandelten Präparaten einige Zeit nach Einschluß in Kanadabalsam bestehen bleibt, um dann zu verschwinden. Solche Imprägnierungen beweisen die Anwesenheit einer bestimmten Orientierung schon in der organischen Substanz (SCHMIDT 1937, S. 293). Dagegen ist in den mit lipoidlösenden Flüssigkeiten vorbehandelten Präparaten keine Doppel-

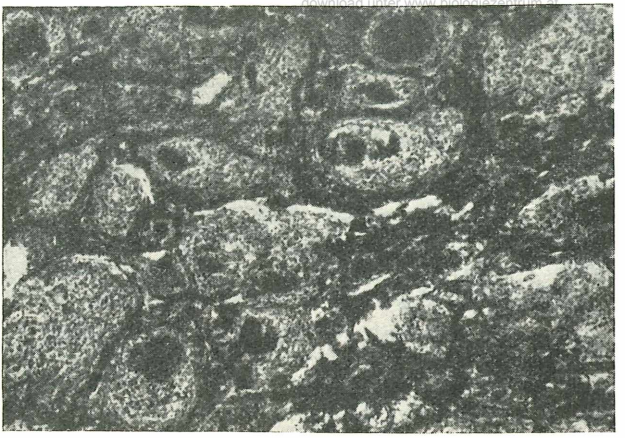


Abb. 9. Rückenmark, Kuh. Block in Aqua destillata zwei Tage. Querschnitt. 450 1.

brechung in den imprägnierten Markscheiden festzustellen. Durch die Extraktion geht die Orientierung der imprägnierbaren Markscheidensubstanz und damit auch die der hernach ausgefällten Ag-Salze in einen amorphen Zustand über. In Übereinstimmung hiermit konnte nachgewiesen werden, daß die neue Imprägnierung auch eine sehr gute Fixierungsmethode für die empfindlichen nervösen Gewebe darstellt.

c) Die Lipoide im Achsenzylinder

Bei Extraktion mit Azeton oder kaltem Pyridin konnten in den Achsenzylindern anfangs keine anderen Veränderungen beobachtet werden, als daß sie das Imprägnierungsmittel noch leichter aufnehmen. Dagegen wird bei monatelanger Behandlung von vorher azetonextrahiertem Material mittels kaltem, absolutem Alkohol die imprägnierbare Substanz besonders aus feinkalibrigen Achsenzylindern in der Nähe der Schnittfläche oft vollständig extrahiert. Dies zeigt, daß die Achsenzylinder Lezithin enthalten, und dieses wurde auch als wichtigster Bestandteil in der Extraktionsflüssigkeit aufgefunden. Die imprägnierbare Substanz ist jedoch, namentlich in den gröberen Achsenzylindern, sehr resistent und widersteht dem kalten Alkohol, während z. B. warmer Alkohol oder warmes Chloroform die Lipoide viel besser herauslösen.

Die bei der Behandlung von Nervenfasern mit Aqua destillata entstehenden „Myelinformen" hat man, wie schon erwähnt, seit altersher der Markscheide zugeschrieben (PERTIK 1881). In Querschnitten von wasserbehandelten und dann imprägnierten Rückenmarkblöcken ist jedoch deutlich ersichtlich, daß die imprägnierte Substanz den Achsenzylinder verläßt und daß dieser in gleichem Maße „ausschmilzt" (Abb. 9). Es gelang auch, Längsschnitte von mit Aqua destillata während längerer Zeit vorbehandelten und dann imprägnierten Rückenmarkblöcken herzustellen. Der mit einem

Abb. 10. Rückenmark, Kuh. Block in Aqua destillata zwei Tage. Der äußere Teil der Myelinschicht. Längsschnitt. 450:1.

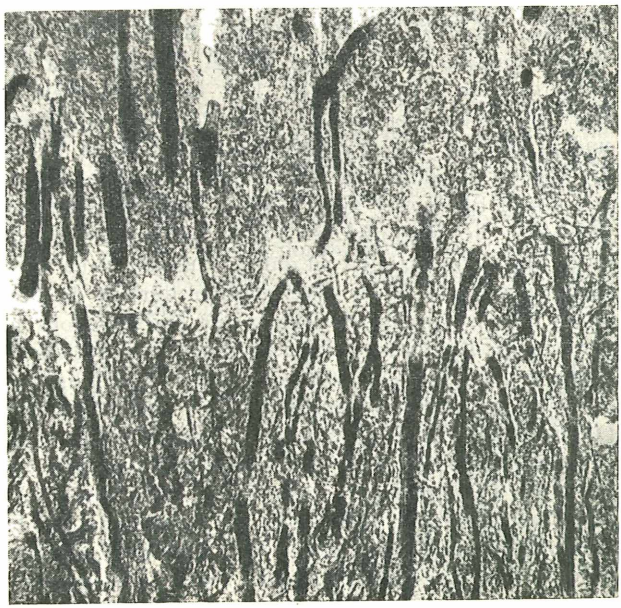


Abb. 11. Dasselbe Präparat. Der innere Teil der Myelinschicht und der periphere Teil des Blokkes; die Kontaktfläche erscheint als eine helle Zone. 450 1.

download unter www.biologiezentrum

Abb. 12. Rückenmark, Kuh. Block in Aqua destillata 30 Minuten. Beginnende Myelinschichtbildung. Längsschnitt. 450:1.

scharfen Messer glattgeschnittene Block wurde in paraffindurchtränktes Papier eingewickelt, so daß dessen Ränder etwa 0,5 cm über die ebenen Schnittflächen hinausreichten. Der so eingewickelte Block wurde während einer entsprechenden Zeit in Aqua destillata eingehängt, darauf imprägniert und in üblicher Weise eingebettet. Durch diese Versuchsanordnung werden die äußerst empfindlichen Myelinformen möglichst geschont. Abb. 10 stammt von einem Block, der zwei Tage in Aqua destillata eingehängt wurde. Hier sieht man die Myelinformen gleich Ballons den Spitzen der Achsenzylinder aufsitzen. Offenbar sind sie durch Ausschmelzen derselben entstanden. Auf Grund der Form dieser Myelinfiguren dürften die Achsenzylinder vielleicht durch eine rotierende Bewegung der Myelinballons gleichsam aufgewickelt werden. Im Berührungsgebiet zwischen der Myelinschichte und der Schnittfläche des Blocks sieht man noch nicht vollständig ausgeschmolzene Achsenzylinder, die sich — offenbar erst aus dem Block herausgetreten — gerade hinaus in die Einbettungsmasse erstrecken (Abb. 11).

Ferner habe ich zwei Mikrophotographien von einem Block beigegeben (Abb. 12, 13), der nur $^1/_2$ Stunde mit Aqua destillata behandelt wurde. Für den Uneingeweihten erscheinen sie unterexponiert. Um jedoch einen Vergleich zu ermöglichen, wurde hier dieselbe Expositionszeit benutzt wie im vorigen Fall. Die Bilder 12 und 13 sind im Gegensatz zu 10 und 11 äußerst

download unter www.biologiezentrum

Abb. 13. Dasselbe Präparat. 450:1.

dunkel, was auf die Anwesenheit von massiven, stark imprägnierten Achsenzylindern zurückzuführen ist, die im vorigen Präparat, das zwei Tage in Aqua destillata verweilte, zum großen Teil verschwunden sind. Diese Ergebnisse beweisen also, daß es die Achsenzylinder sind, die bei der Behandlung des Blockes mit Aqua destillata entfernt und ausgeschmolzen worden sind. Des weiteren zeigen sie das erste Stadium der Entstehung der Myelinschicht. In Abb. 12 links sieht man die angeschwollenen, aus dem Inneren des Blockes herausgepreßten terminalen Teile der Achsenzylinder auf der Oberfläche des Blockes, wo sie kontinuierlich in eine ziemlich dünne, aber stark imprägnierte Schicht übergehen. Dies ist die Myelinschicht in ihrem ersten Bildungsstadium. Im gleichen Bild rechts und auch in Abb. 13 hat sich die Schicht, wahrscheinlich infolge störender Einflüsse beim Imprägnieren, von der Schnittfläche des Blockes losgelöst, obgleich sie noch immer durch nicht abgerissene Achsenzylinder an dieser befestigt ist, deren Spitzen im dunkelsten Teil der Myelinschicht endigen. Auch diese Bilder lassen erkennen, daß es die Achsenzylinder sind, die bei Anwesenheit von Aqua destillata die Entstehung der Myelinfiguren verursachen, und erbringen so einen neuen Beweis dafür, daß die Achsenzylinder aus Phosphatiden aufgebaut sind.

An der Oberfläche azetonbehandelter Blöcke war von Myelinformen keine Spur zu finden. Das Azeton bewirkt eine Fällung nicht nur der Phosphatide, die hierbei in keiner Weise verändert werden, sondern auch eine irreversible der Proteinsubstanzen. Soll die Proteinfällung die Bildung von Myelinformen verhindern können, so müssen Proteine und Phosphatide aneinander chemisch gebunden, d. h. als Lipoproteine vorhanden sein. Dies ist in den Ganglienzellen auch sicher der Fall, aber verschieden stark in verschiedenen Zellen, denn die Löslichkeit der Phosphatide war sehr ungleich. So wurden sie aus den Pyramidenzellen schon leicht mit Alkohol herausgelöst, aus den Rückenmarkzellen dagegen erst durch langdauernde Extraktion mit heißem Chloroform oder anderen energischen Lösungsmitteln und auch dann nur unvollständig. Ich konnte deutlich beobachten, daß die Ganglienzellen in den Schnittflächen auch frischer Blöcke nicht zur Entstehung von Myelinformen Anlaß geben. Die Lipoide müssen in diesen daher sehr innig an die Proteine gebunden sein.

Es bleibt noch zu erklären, weshalb die Phosphatide in den Ganglienzellen nicht doppelbrechend sind. Eine bestimmte Anordnung der Teilchen in einer Substanz bedingt Anisotropie, während Isotropie auf einen amorphen Zustand hinweist. Die Phosphatide sind also in den Ganglienzellen, den Dendriten und den verschiedenen Teilen der Neuriten offenbar amorph verteilt und demnach sind diese Histölipoide durch ihre kolloidale Verteilung, durch ihr Vorkommen als Lipoproteine und durch ihre amorphe Beschaffenheit in dreifachem Sinn „masquées" (LISON 1936). Diese Tatsache wird noch dadurch erhärtet, daß der normal imprägnierte Achsenzylinder weder im Quer- noch im Längsschnitt Doppelbrechung zeigt.

Unsere Feststellungen führen zu weiteren sehr wichtigen Schlußsätzen. Es wurde bereits auf das Bestehen einer mehr oder weniger festen Verbindung zwischen den Lipoid- und Proteinsubstanzen in den gangliösen Elementen hingewiesen, wonach auch die Proteine in einem amorphen Zustand vorhanden sein müssen. Nun dürften aber diese Proteine den Grundstock der Neurofibrillen bilden. Daraus geht jedoch hervor, daß diese Strukturen postmortal entstanden sein müssen, denn das Fibrillennetz erhält je nach der Präparation ein sehr verschiedenes Aussehen. Damit habe ich meinen früheren Standpunkt (ALSTERBERG 1941 b, S. 384) aufgegeben, demzufolge die Fibrillen als wirklich bestehende Bildungen mit mechanischen Aufgaben aufzufassen wären. Ich habe auch die Doppelbrechung von imprägnierten und darauf KCN-behandelten Schnitten von Nervengewebe in Wasser untersucht und eine solche weder in Längs- noch in Querschnitten feststellen können. Von Bedeutung ist hierbei, daß die Strukturen keiner postmortalen Kontraktion bzw. Expansion ausgesetzt werden.

d) Die Lipoide in der Glia

Die Glia enthält reichliche Mengen von imprägnierbaren Lipoiden, die jedoch wegen Schwierigkeiten verschiedener Art schwer zu identifizieren sind. Meine diesbezüglichen Untersuchungen sind daher in diesen Belangen

noch weit vom Ziel entfernt. Bei alkoholischer Extraktion von Großhirnblöcken fand ich in den unschönen Präparaten, daß wenigstens die Zellen der Faserglia insofern erhalten waren, als zumindest die gröberen Vorsprünge und die Zellkörper selbst aufgefunden werden konnten, während nach Ätherextraktion von vorher alkoholextrahierten Blöcken diese Zellen vollkommen verschwunden waren. Auch die peripheren Anteile von Blöcken der weißen Substanz des Rückenmarks zeigen nach Behandlung mit Äther zuweilen eine starke Extraktion der Glia. Hieraus wurde geschlossen, daß in der Faserglia Kephalinsubstanzen die wichtigsten Phosphatide sind. Aber auch hier, wie sonst immer, muß damit gerechnet werden, daß die Löslichkeit der Lipoide durch an diese gebundene Proteine verändert werden kann. Eine ergänzende Untersuchung des Ätherextraktes wäre hier sehr aufschlußreich gewesen, aber eigentümlicherweise sind im Äther nach Extraktion von vorher alkoholextrahiertem Hirnmaterial nur sehr geringe Substanzmengen vorhanden. Die histologische Untersuchung zeigte, daß die vom Äther aus den Zellen herausgelösten Substanzen in Rissen oder an anderen Stellen des Blockes ausgefallen sind. Dagegen gehen bei der Extraktion von vorher azetonbehandeltem Material die extrahierten Substanzen in Äther über, ohne im Block Niederschläge zu bilden. Aber diese Extrakte sind dafür um so komplexer zusammengesetzt. In zuerst mit Alkohol und dann mit Chloroform extrahierten Rückenmarkblöcken war leicht festzustellen, daß die Glia früher und vollständiger gebleicht wird als die gangliösen Anteile. In den Extrakten gab es verschiedene Phosphatide, aber unter diesen besonders Kephalinsubstanzen, die ziemlich sicher von den gliösen Strukturen herstammen. Aber auch bei dieser Extraktion werden sekundäre Niederschläge gebildet. Hierzu kommt, daß die Glia aus sehr verschiedenen Elementen besteht und auch das Kephalin keine einheitliche Substanz ist. Laut MACARTHUR (1914) und FOLCH (1941, 1942, 1943) besteht diese Substanz vor allem aus Verbindungen mit Serin, Kolamin und Inositol. Auf Grund von Untersuchungen von FOLCH (l. c.), STETTEN (1941) und VIGNAUD (1940) ist es leicht, einen mit Substanztransporten einhergehenden Stoffwechsel in den verschiedenen Gliatypen auch in den Satelliten und den Golgi-Lantermannschen Trichtern zu den Ganglienzellen vom Serinkephalin[1]) über das Kolaminkephalin[1]) zum in Ganglienzellen und Achsenzylindern vorhandenen Lezithin aufzuzeigen. Vielleicht bildet die stark OsO_4-reduzierende Substanz in der Markscheide den mit Sulphhydrylgruppen ausgerüsteten Rest einer Aminosäure, die beim Aufbau von Lezithin aus Kolaminkephalin die nötigen Methylgruppen abgegeben hat.

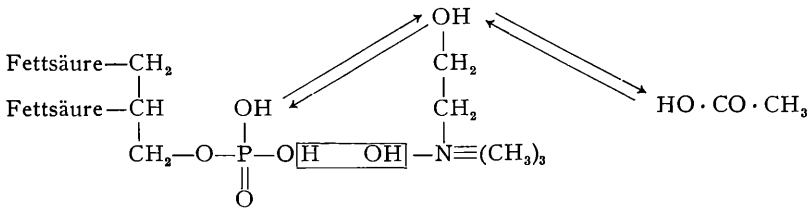
Außerdem gibt es im Nervengewebe andere Lipoide, die aus theoretisch-chemischen Erwägungen heraus oder bei direkten Experimenten sich als von der beschriebenen Imprägnierung nur wenig beeinflußt erwiesen, so das Dihydrolezithin (THANNHAUSER 1946), das Sphingomyelin und die Zerebroside. Über ihre zellulare Lokalisation kann ich mich nicht äußern.

[1]) Statt der von FOLCH vorgeschlagenen verwickelten chemischen Bezeichnungen würde ich die oben von mir vorgeschlagenen Bezeichnungen der von ihm kürzlich beschriebenen Kephalinsubstanzen vorziehen.

e) Die Chemie des Nervenimpulses

In bezug auf die Natur des Nervenimpulses sind bis in letzter Zeit die Ansichten von DALE und LOEWI im Vordergrund gestanden (DALE 1939). Natürlich muß bei der cholinergischen Überführung der Ursprung des Cholinradikals des Azetylcholins in den nach den hier erörterten Untersuchungen überall in den Ganglienzellen und ihren Ausläufern vorhandenen Phosphatiden, besonders im Lezithin gesucht werden. Überdies muß aber noch eine Azetylmuttersubstanz vorkommen, die jedoch nicht genauer identifiziert ist. Außer der Cholinesterase, also dem azetylcholinspaltenden Enzym, hat man in allerletzter Zeit eine besonders im Nervengewebe vorkommende Cholinazetylase, also das entsprechende synthetisierende Enzym beschreiben können (NACHMANSOHN und MACHADO 1943; LIPTON und GUZMAN 1946). Es fehlt einstweilen eine genügende Kenntnis von der Wirksamkeit einer Lezithinase oder Sphingomyelinase, die imstande ist, das Cholinradikal aus seiner Esterbindung in den Phosphatiden herauszubrechen und damit der Azetylierung zugänglich zu machen (SPERRY 1947).

In letzter Zeit hat man indessen die wirklich humerale Bedeutung des Azetylcholins — im Sinne von DALE und LOEWI — mehr und mehr angezweifelt. Laut MACINTOSH (1938) trat bei Durchspülung des Zervikalganglions der Katze mit Lockescher Lösung bei Vagusreizung Azetylcholin auf, während bei normaler Blutzirkulation kein Reizstoff festgestellt werden konnte (in beiden Versuchen bei Anwesenheit von Eserin). Das Azetylcholin sollte also von nervösen Elementen nur bei tiefgreifenden experimentellen Eingriffen an die Körperflüssigkeit abgegeben werden. Unter normalen Verhältnissen sollte es sich jedoch vom Phosphatid niemals abspalten, sondern in azetyliertem Zustand an seine Phosphorsäure in der Form eines Salzes gebunden bleiben. In den letzten Jahren hat man „inaktive" azetylcholinliefernde Substanzen gefunden (TRETHEWIE 1938), die vielleicht Lezithin- oder Sphingomyelinnatur besitzen. Die Reaktionen bei der Entstehung des Impulses sollen durch die unten angeführte Formel veranschaulicht werden.



Die Oxyäthylgruppe des Cholinradikals sollte also unter Esterbildung

zwischen der Phosphorsäuregruppe und der Azetylgruppe hin- und herpendeln. Diese Annahmen werden in besonderer Weise durch Untersuchungen gestützt, die von Isolde HAUSSER (1935) über das dielektrische Verhalten organischer Zwitterionen unter besonderer Berücksichtigung von Molekülen der Hirn- und Nervensubstanz durchgeführt worden sind. Während im Lezithin und Sphingomyelin die langen Fettsäureketten infolge ihrer geringen Dipolarität nur in sehr spärlichem Maße Krafteinflüssen, namentlich elektrischer Beschaffenheit, ausgesetzt sind und daher in Lösungsmitteln sich in fast vollständiger Ruhe befinden, ist der stark polare Cholinphosphorsäure-Arm um so beweglicher und schwingt „mit einer definierten Eigenschwingung um eine Ruhelage". Letzteres wird durch eine von den Fettsäureketten ausgehende richtunggebende Kraft verursacht. Man kann sich leicht vorstellen, daß in den amorphen Phosphatiden im Inneren der Achsenzylinder die Cholinphosphorsäure-Arme, ohne innere Zwitterionen zu bilden, sich an angrenzenden Molekülen kettenförmig verankern. Man weiß auch seit langem, daß das Innere der Achsenzylinder an der Leitung der Impulse nicht teilnimmt. Anders verhält sich die Achsenzylinderoberfläche, die Achsenzylindergrenzhaut von JAKOB, da hier die Cholinphosphorsäure-Arme als „molekulare elektrische Pendel" frei nach außen schwingen können, ohne von naheliegenden Phosphatidmolekülen gebunden zu werden. Wenn eine solche Fläche von einem Impuls getroffen wird, erfolgt vielleicht ein „Aufklappen" des Zwitterions (MURALT 1939) und simultan eine Azetylierung des Cholins. Beim Abklingen des Impulses dagegen erfolgt eine Deazetylierung und ein Zuklappen, also eine erneute Esterbildung zwischen Phosphorsäure und Cholin. Die chemischen Reaktionen müssen sowohl als synchronisierte wie in gleicher Weise gerichtete Bewegungen der Moleküle im Achsenzylinder angesehen werden, die von Veränderungen in der elektrischen Spannung der Achsenzylinder und der Grenzhaut begleitet sind. Die elektrische Spannung greift auf angrenzende, noch in „Eigenschwingung" befindliche Zwitterionen über, worauf ein Aufklappen dieser stattfindet usw., d. h. daß der Impuls auf diese Weise weitergeleitet wird. Es ist klar, daß hiermit Veränderungen in den übrigen Ionen der Grenzflächen einhergehen müssen.

Außerdem kommen aber vielleicht andere Verschiebungen vor. Wie erwähnt, konnte ich feststellen, daß die Pyramidenzellen reich an locker gebundenem Lezithin sind, während in den Rückenmarkzellen und auch in den Purkinjezellen das an Protein innig gebundene Phosphatid nur in geringer Menge vorkommt. Vielleicht bestehen hier interessante Unterschiede in der Funktion der Substanzen. Im Fall der Pyramidenzellen ist eine größere Beweglichkeit des Phosphatidapparates erforderlich, um höhere seelische Funktionen vermitteln zu können, während im Fall der Purkenje- und der Rückenmarkzellen die für die Impulse festgelegten Bahnen im Zusammenhang mit der stereotypen Ausformung der Reflexe weniger Phosphatidmobilisation erfordern, also sozusagen in dieser Hinsicht „markiert" sind. Vielleicht können gewisse Nervenkrankheiten durch „Abnormitäten" der Phosphatidverteilung im Nervengewebe verursacht werden.

download unter www.biologiezentrum.at

Abb. 14. Plexus chorioideus ventric. quarti. Hund. 450:1.

f) Die Phosphatide in anderen Körperzellen

Ein sehr interessantes Bild gibt der Plexus chorioideus ventr. quarti (Abb. 14). Hier wird das Plasma der epithelähnlichen, dem Hohlraum des vierten Ventrikels zugekehrten Ependymzellen stark imprägniert. Die Zellkerne werden überhaupt nicht imprägniert. Im Bild sind auch — obgleich nur schwach — Querschnitte von Kapillaren und auch von größeren Blutgefäßen zu sehen. Ich habe mit diesen Organen keine Extraktionsversuche der vorbeschriebenen Art ausgeführt, aber es besteht keinerlei Gegenargument, daß die in diesen gliahomologen Zellen vorhandene Substanz nicht auch aus Phosphatiden bestünde.

Im Nierengewebe (Abb. 15) der verschiedensten Säugetiere wird besonders das Epithel der Tubuli contorti in einer an die obige Imprägnierung erinnernden Form deutlich imprägniert, das Epithel der geraden Nierenkanälchen und besonders der Glomeruli dagegen nur wenig. Namentlich die Stäbchenstrukturen von HEIDENHAIN werden als zu den Nierenkanälchen senkrecht verlaufende Stäbchen deutlich gefärbt. Der imprägnierte Teil der Stäbchen erreicht die Basalmembran nicht ganz. Die imprägnierbare Substanz konnte mit Alkohol extrahiert werden und besteht demnach aus Phosphatiden, aber außerdem ist eine entsprechende Proteinstruktur vorhanden.

Abb. 15. Niere, Igel. Rechts unten ein Glomerulus, von dem angeschlossenen Nierenkanälchen überlagert, 450:1.

Da man der Ansicht ist, daß vom Plexus chorioideus fast reines Wasser in die Gehirnventrikel hineintransportiert wird, kann in gleicher Weise Wasser vom verdünnten Primärharn abtransportiert werden, der hierdurch eine Konzentration erfährt. In beiden Fällen sollte eine gleichartige Arbeit mit einem Wassertransport von Orten höheren osmotischen Druckes mit Hilfe der Phosphatidstruktur in einer Weise ausgeführt werden, die mit dem Vermögen der Phosphatide, Myelinformen zu bilden, zusammenhängt.

Die imprägnierte Skelettmuskulatur und auch die Herzmuskulatur zeigen eine besonders schöne Querstreifung, die durch eine Extraktion des Blockes vor der Imprägnierung eliminiert wird. Der Block muß jedoch im Extraktionsmittel (Methylalkohol und darauf Chloroform) gekocht werden. Ich habe die Zusammensetzung des Extraktes nicht untersucht. In der Herzmuskulatur dürfte sicher das kürzlich beschriebene Kardiolipin (PANGBORN 1947) vorkommen, das Linolen- und Ölsäure enthält. Gerade die Phosphatide können die bei der Bewegungsmechanik aktive Substanz darstellen, wobei die Muskelbewegungen durch Wassertransport vor sich gehen dürften. Es muß aber auch rückläufige, noch unbekannte Prozesse geben.

Die Zellkerne der Skelettmuskulatur zeigen nie, die der Herzmuskulatur dagegen stets eine sehr starke und fest haftende Imprägnierung.

Kurz sei erwähnt, daß ich auch Leber und Nebennieren, einstweilen jedoch

in keiner Weise abschließend, untersucht habe. Die Zellen der Zona fasciculata zeigen bei vielen Tierarten eine wabige Struktur. Die in den tiefen Rindenschichten gelegenen Blutkapillaren haben sehr oft einen ziemlich scharf imprägnierten Inhalt. Die Zellkerne in der Nebennierenrinde zeigen sehr charakteristische Unterschiede, sie werden in gewissen Schichten sehr stark imprägniert, in anderen dagegen überhaupt nicht. Die Zellen des Nebennierenmarks und ihre Kerne werden sehr schwach imprägniert und die Grenze zwischen Mark und Rinde erscheint daher scharf.

Die Ergebnisse der Versilberung der Leber sind insofern von Interesse, als die Zellgrenzen hier und da fast schwarz imprägniert werden, was auf eine Imprägnierung der Zellmembran schließen läßt. Eingelagerte dünne Bindegewebsstränge oder Kittsubstanzen können jedoch positive Ergebnisse vortäuschen. Bei roten Blutkörperchen in den Gefäßen habe ich eine deutliche Imprägnierung der Membran beobachtet.

Es ist für mich eine besonders angenehme Pflicht, Herrn Assistenten Fil. Kand. K. J. GUSTAFSSON, Stockholm, für seinen sachverständigen Beistand bei der Anfertigung der Mikrophotographien zu danken.

Zusammenfassung

1. Das Objekt wird in eine Imprägnierungsflüssigkeit gebracht, die aus JCN, Ag-Chlorat und Aqua destillata besteht.

2. Dann wird der Block in Zelloidin und schließlich in Paraffin eingebettet. Die Schnitte werden mit H_2S behandelt und in üblicher Weise in Kanadabalsam eingeschlossen.

3. Im Material aus dem zentralen Nervensystem von Säugetieren treten die Ganglienzellen, die Dendriten, die Achsenzylinder, die Gliazellen verschiedener Art sowie die Golgi-Lantermannschen Trichter scharf hervor, schwach dagegen die Axonen und die Markscheiden.

4. Die imprägnierten Strukturen in den Ganglienzellen liegen zwischen den Nissl-Körpern.

5. Die Imprägnation trifft die Doppelbindungen der ungesättigten Phosphatide, besonders des Lezithins und des Kolaminkephalins, die in den vorhergenannten nervösen Elementen kolloidal, also „maskiert" vorkommen. Fetttröpfchen auch von mikroskopischer Größe werden kaum dargestellt.

6. Die Markscheiden sind arm an Phosphatiden, geben also in Aqua destillata keine „Myelinformen". Diese werden von den Achsenzylindern gebildet.

7. Die optische Isotropie der phosphatidreichen nervösen Elemente wird von der amorphen, also optisch maskierten Verteilung der Phosphatide verursacht.

8. Dabei sind die Phosphatide verschieden fest an amorph verteilte Proteine gebunden, also als Lipoproteine chemisch maskiert.

9. Die Proteine bilden bei geeigneten Präparationen die „Neurofibrillen", die also postmortal entstanden sind.

10. Der Verfasser ist der Meinung, daß besonders das Lezithin, möglicherweise auch das Sphingomyelin, für die cholinergische Herkunft und Weiterleitung des Nervenimpulses in den Ganglienzellen und deren Ausläufern verantwortlich ist.

11. Das Azetylcholin wird also nicht nur in den Synapsen und den anderen Kontakten, sondern in der ganzen Nervenbahn während des Fortleitens des Nervenimpulses gebildet.

12. Auch in anderen Körperzellen ist es gelungen, die mikroskopische Verteilung der Phosphatide festzustellen. Besonders interessant sind die Strukturen in den gliahomologen Zellen des Plexus chorioideus und in den Nierenzellen.

Literatur

Alsterberg G., Bot. Not. Lund, 1927.

— Über Bau und Funktion der Nebennierenrinde. Gleerupska Univ.-Bokhandeln. Lund, 1928.

— Ark. Zool., K. Sv. Vet.-akad. **32 A** (1940); **33 B** (1941a); **36 A** (1945a); **36 B** (1945b).

— Z. Zellforsch. mikroskop. Anat. Abt. **A, 31** (1941b).

Collin R. und *Chavarot M.,* C. R. Soc. Biol. **115** (Paris, 1934).

Dale H., Science **90** (1939).

Einarson L., Amer. J. Path. **8** (1932).

Escher H. H., Correspondenz-Blatt schweiz. Ärzte **49** (1919).

Feyrter F., Mikroskopie **1** (1946).

Folch J. und Mitarbeiter, J. biol. Chem. **137** (1941); **139** (1941); **146** (1942); **147** (1943).

Hausser I., Sitzber. Heidelb. Ak. Wiss. Math.-nat. Kl. (1935).

Jakob A.; Histologische und histopathologische Arbeiten über die Großhirnrinde. Herausgegeben von Nissl und Alzheimer **5** (1913).

Lipton M. A. und *Guzman E. S.,* J. biol. Chem. **166** (1946).

Lison L., Histochimie animale. Coll. actualités Biol. (Paris, 1936).

MacArthur C. J., J. amer. chem. Soc. **36** (1914).

MacIntosh F. C., J. Physiol. **94** (1938).

Muralt A. v., Naturwiss **27** (1939).

Nachmansohn D. und *Machado A. L.,* J. Neurophysiol. **6** (1943).

Pangborn M. C., J. biol. Chem. **168** (1947).

Pertik O., Arch. mikr. Anat. **19** (1881).

Rio Hortega, P. del, Mem. Soc. espań. Hist. natur. **14** (1928).

Schmidt W. J., Die Doppelbrechung von Karyoplasma, Zytoplasma und Metaplasma. Protoplasma-Monogr. **11** (1937).

Sperry W. M., J. biol. Chem. **170** (1947).

Spielmeyer W., Technik der mikroskopischen Untersuchung des Nervensystems (Berlin, 1930).

Stetten, De Witt, jr., J. biol. Chem. **140** (1941).

Thannhauser S. J. und Mitarbeiter, Ibid. **166** (1946).

Trethewie E. R., Austral. J. exper. Biol. and med. Science **16** (1938).

Vignaud, V du und Mitarbeiter, J. biol. Chem. **134** (1940).

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: 1948

Band/Volume: 3

Autor(en)/Author(s): Alsterberg Gustaf

Artikel/Article: Über eine neue Imprägnierungsmethode zum Identifizieren der kolloiden Lipoide und Lipoproteine im Nervensystem. 136-159