

Es ist leicht, aus den an Dünnschliffen von Mineralien und Gesteinen gewonnenen Erfahrungen die Folgerungen für die Beobachtung an biologischen Präparaten zu ziehen, und es ist eigentlich merkwürdig, daß bei diesen so selten in bewußter Weise von dem wunderbar einfachen und empfindlichen Hilfsmittel der BECKESchen Lichtlinie Gebrauch gemacht wird. Die Gleichheit oder Ungleichheit einzelner Substanzen, die an einem biologischen Präparat beteiligt sind, läßt sich sehr oft in einfachster und überzeugendster Weise durch Beachtung der Brechbarkeit und diese wieder durch Verwendung der Lichtlinie, oder Beachtung von Helligkeit, Relief und Chagrin feststellen. Es kann darum nicht eindringlich genug empfohlen werden, die Erscheinungen der BECKESchen Lichtlinie in viel höherem Maße als bisher auch in der biologischen Mikroskopie zu verwerten.

## FLUORESZENZ UND METACHROMASIE

Von DR. LEOPOLD STOCKINGER

(Histologisch-embryologisches Institut der Universität Wien. Vorstand Prof. Dr. V. Patzelt)

Die Ansichten über den Begriff Metachromasie sind recht verschiedene und haben im Laufe der Zeit mehrere Wandlungen durchgemacht. Nach EHRlich versteht man darunter im weiteren Sinne die Erscheinung, daß sich verschiedene Gewebssorte mit bestimmten Farbstoffen anders färben, als es dem Farbton der Farblösung entspricht. Über die Ursachen dieser Erscheinungen gehen die Meinungen weit auseinander. Abzugrenzen von den sogenannten echten metachromatischen Erscheinungen sind vor allem die, die durch Farbstoffverunreinigung oder Begleitstoffe hervorgerufen werden (LEHNER). Neben rein physikalischen Ursachen, wie Unterschiede im Brechungsindex verschiedener Gewebsbestandteile und Dispersitätsänderung der Farbstoffe, werden auch chemische Veränderungen, wie intramolekulare Farbstoffumlagerungen und Bildung von Gewebs-Farbstoffverbindungen, für das Auftreten der verschiedenen Farben verantwortlich gemacht (ZEIGER). Die Farbwechselmechanismen wurden bisher hauptsächlich an basischen Farbstoffen, wie Toluidinblau, Thionin, Neutralrot, Hämatoxylin usw., eingehender, daneben aber auch an sauren Farbstoffen, z. B. aus der Kongorotgruppe, untersucht. MÖLLENDORF unterscheidet zwischen Niederschlags- und Durchtränkungs-färbung, von denen erstere metachromatisch sein kann. Er nimmt an, daß dabei elektrostatisch bedingte Absorptionsverbindungen mit neuen farbgebenden Eigenschaften entstehen.

LISON, der ausgedehnte Untersuchungen auf diesem Gebiet durchgeführt hat, kommt zu dem Ergebnis, daß ein Teil der metachromatischen Erscheinungen durch sogenannte chromotrope Substanzen hervorgerufen wird, die durchwegs Schwefelsäureester höherer Polysaccharide darstellen,

die die wirksame Gruppe  $R-O-SO_3H$  enthalten. Er wies diese Gruppe in der Chondroitin- und Mucoitin-Schwefelsäure sowie in einer Reihe weiterer Polysaccharide nach, ausgehend von der Tatsache, daß die Basophilie der metachromatischen Bestandteile des Knorpels und des Schleimes an den Gehalt an Chondroitin- bzw. Mucoitin-Schwefelsäure gebunden ist. Auch in den Gewebsmastzellengranulis wurde eine ähnliche Gruppe nachgewiesen. Diese Erscheinungen treten so regelmäßig auf, daß sie unter gewissen Bedingungen als spezifische Reaktion auf höhere Schwefelsäureester aufgefaßt werden können. Diese Bedingungen sind gegeben bei wäßriger Lösung des Farbstoffes, schwacher Färbung und H-Ionenkonzentration unter 3 einerseits, andererseits außerdem durch das Bestehenbleiben der metachromatischen Effekte nach Einbettung in Kanadabalsam, Gummisirup usw. Die bekanntesten Erscheinungen dieser Art werden bei tierischem Material am Knorpel, Schleim und den Mastzellengranulis beobachtet. Weitere Farbwechselmechanismen hat CZAJA an pflanzlichem Material untersucht, und er führt diese auf das Vorhandensein eines sauren oder alkalischen Membran- oder Poreneffektes zurück, eine Ansicht, die nicht unwidersprochen blieb.

Neuere, hauptsächlich fluoreszenzmikroskopische Arbeiten auf pflanzenphysiologischem und histologischem Gebiet stammen von HÖFLER und STRUGGER, die in dieser Hinsicht Pionierarbeit geleistet haben. Ihren Arbeiten verdanke ich auch wertvolle Anregungen für meine Untersuchungen.

Bei der Beobachtung der sekundären Fluoreszenz verschiedener menschlicher Gewebe nach Fluorochmierung mit Akridinorange fiel mir besonders ein gleichartiges Verhalten von Knorpel, Schleim und Mastzellen auf, das sich von allen übrigen Gewebsbestandteilen deutlich unterscheidet. Es ist dabei wesentlich, diese Färbungen mit stark verdünnten Farbstofflösungen durchzuführen. Bei den hier angeführten Untersuchungen wurden jeweils 1 Tropfen der 1%igen Farbstofflösung in 10 ccm Verdünnungsflüssigkeit angesetzt, was einer ungefähr 30 000- bis 50 000fachen Verdünnung entspricht. In diesem Farbbad bleiben die Schnitte 5—10 Minuten. Nach kurzem Auswaschen in Aqua destillata oder der entsprechenden Verdünnungsflüssigkeit wurden die Schnitte ganz kurz mit Alkohol abgespült und mit Terpeneol aufgehellt und schließlich in Aftuol eingebettet. Kontrollschnitte, die im entsprechenden Lösungsmittel untersucht wurden, zeigten im wesentlichen dasselbe Ergebnis. Die vollständige Entwässerung der Schnitte bietet neben der Möglichkeit einer längerdauernden Haltbarkeit der Schnitte außerdem den Vorteil, daß die lästige Fluoreszenz des im wäßrigen Milieu in Lösung gehenden Farbstoffes wegfällt. Als Untersuchungsmaterial verwendete ich menschliche Rippenknorpel verschiedener Altersstufen, die nach Fixierung in 10%igem Formol uneingebettet geschnitten wurden. Weiters wurden Gefrier-, Paraffin- und Celloidinschnitte von weichem Gaumen, Dickdarm, Duodenum und Appendix nach vorangegangener Fixierung in 10%igem Formol untersucht. Erwähnenswert erscheint es mir, daß auch

Celloidinschnitte nach sorgfältiger Entcelloidinierung in Ätheralkohol mit gutem Erfolg zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung verwendet werden können. Freilich bieten Gefrier- und Paraffinschnitte von, kurz fixiertem Material wesentliche Vorteile bezüglich ihrer Eigenfluoreszenz und Kernfärbung.

Die verwendeten Farbstoffe wurden zum Teil reinem, zum Teil in mit HCl bzw. NaOH abgestuftem Aqua destillata, zum Teil in Pufferlösungen verdünnt. Als Pufferlösungen gebrauchte ich die Phosphat- und Zitratpuffer nach SOERENSEN sowie die Puffergemische nach STAMPE. Zur groben Kontrolle des  $p_H$ -Wertes der einzelnen Puffer und Verdünnungslösungen verwendete ich die  $p_H$ -Meßstreifen der Firma Galvapol, die sich zur raschen Orientierung gut eignen.

Die methodisch durchgeführten Reihenuntersuchungen zeigten nun im einzelnen folgende Ergebnisse:

**Knorpel** Im sauren Bereich von  $p_H$  1—3 leuchtet das Perichondrium und die anschließende Knorpelgrundsubstanz dunkelblau, die Zellen im Perichondrium sind undeutlich als grau-weißliche Streifen sichtbar. Etwas tiefer tritt um die hier platten Knorpelzellen zuerst eine zarte kupferrote Kapsel und anschließend ein schmaler zitronengelber Hof auf, der immer breiter wird. Ganz ähnlich sehen auch die tieferliegenden Territorien aus; um die Knorpelzellen findet sich dort eine kupferrot bis orangerot gefärbte Zellkapsel, die bei isogenen Zellgruppen auch die Tochterzellen umgibt, der zitronengelbe Innenhof ist hier breiter, der Außenhof blau, die interterritoriale Grundsubstanz wiederum zitronengelb. Die Asbestfasern zeigen nach dem Verdämmern der zuerst etwas intensiver gefärbten Territorien zunehmend gelb bis gelborange gefärbte Streifen, zum Teil aber auch weißliche Eigenfluoreszenz. Die stark geschrumpften Knorpelzellen leuchten in blau-weißlicher Farbe. Bei steigendem  $p_H$ -Wert des Farbbades verschwindet über  $p_H$  3 allmählich zuerst der Unterschied zwischen interterritorialer Grundsubstanz und den Höfen, während die orangerote Zellkapsel besonders in den Randpartien der Schnitte zuerst noch erhalten bleibt. Auch das Perichondrium wird wie die Grundsubstanz mehr grau-weiß bis weißlich, die Kerne treten jetzt weißlich-gelb hervor. Bei weiterer Erhöhung der H-Ionenkonzentration büßt das Präparat immer mehr an Farbkontrasten ein. Bei  $p_H$  5 ist auch die Zellkapsel nur mehr als ein etwas heller gefärbter Streifen erkennbar, während der Unterschied zwischen den Zellhöfen und der Grundsubstanz nur mehr angedeutet erscheint. Um  $p_H$  7 sind Struktureinzelheiten nur durch verschiedene intensiv grün-gelblich leuchtende Areale gegeben. Nur in den Asbestfasern leuchten noch einzelne Streifen grün-weißlich auf. Im alkalischen Bereich verschwindet schließlich jede Sekundärfluoreszenz, und das Präparat zeigt nur mehr Eigenfluoreszenz.

**Weicher Gaumen** (Gefrier-, Paraffin- und Celloidinschnitte). Auch hier zeigt die Untersuchung in der mit HCl abgestuften Farbbadreihe von der sauren Seite her beginnend bei  $n/100$ -HCl-Lösung, also  $p_H$  2, eine gelbgrüne bis gelborange bzw. kupferrote Fluoreszenz des epithelialen Muzins.

Zellgrenzen und Grenzmembranen sind in diesem Bereich besonders an Celloidinschnitten sehr deutlich erkennbar. Die Zellkerne und auch die albuminösen Drüsen der nasalen Seite erscheinen grau-gelblich. Das kollagene Bindegewebe fluoresziert dunkelblau, die elastischen Elemente zeigen intensive weißglänzende Eigenfluoreszenz. Bei  $n/1000$ -HCl-Lösung, das ist also etwa  $p_H$  3, wird die Schleimfärbung durch die leuchtend kupferrote bis gelborange bzw. gelbgrünliche Fluoreszenz elektiv sichtbar. Auch in den gemischten Drüsen der nasalen Seite des Präparates sind jetzt die Schleimschläuche und einzelne schleimproduzierende Zellen in den Ausführungsgängen deutlich differenzierbar. Auch die Mastzellgranula zeigen in diesem Bereich besonders bei Gefrier- und Paraffinschnitten deutliche kupferrote Fluoreszenz. Bei Celloidinschnitten allerdings habe ich dies erst in etwas höheren  $p_H$ -Stufen nachgewiesen. Bei steigenden  $p_H$ -Werten verschwindet besonders bei Gefrierschnitten wieder sehr rasch dieses Verhalten des Schleims, und die Schleimdrüsen erscheinen jetzt wieder als leere Schläuche. Um  $p_H$  4—5 tritt dabei eine schöne hellgelbe Färbung der Zellkerne auf, die neben der Eigenfluoreszenz des Gewebes und ebenfalls gelben bis gelbgrünlichen Sekundärfluoreszenz verschiedener anderer Gewebsbestandteile das histologische Bild beherrschen. Im alkalischen Bereich verschwindet schließlich auch hier wiederum die Sekundärfluoreszenz und das Präparat zeigt nur mehr Eigenfluoreszenz.

Ganz different davon verhalten sich Färbungen in dem mit Zitratpufferlösung verdünnten Fluorchrom. Die mukösen Drüsen bleiben in allen  $p_H$ -Graden ungefärbt, daneben aber tritt eine deutliche gelbe bis ocker Fluoreszenz der albuminösen Drüsen auf, die jetzt eine deutliche Unterscheidung von den ungefärbten mukösen Schläuchen ermöglicht. Die Phosphatpuffer dagegen verhalten sich wie die mit HCl bzw. NaOH abgestuften Lösungen.

Vergleichsweise an mukoiden Drüsen (Brunnersche Drüsen) durchgeführte Untersuchungen zeitigten ein negatives Ergebnis. Auch die Becherzellen, die im nasalen Epithel des weichen Gaumens, im Dünndarm, Dickdarm und Wurmfortsatz zur Beobachtung kamen, lieferten keine so zuverlässigen Resultate. Wahrscheinlich spielen hier postmortale Veränderungen und Einflüsse der Fixierung und Lagerung eine derzeit noch nicht näher untersuchte Rolle.

Kontrollfärbungen mit anderen basischen Fluorochromen, wie Brillantphosphinitrat, Euchrysin, Rhodamin B, Neutralrot, ergaben ganz analoge Färbungen, wobei hervorzuheben ist, daß sich für die hier angegebenen Fluorochromierungen besonders Brillantphosphinitrat, Euchrysin und Rhodamin B eignen. Auch HAITINGER weist bei der Besprechung der Fluorochrome auf die sekundäre Fluoreszenz des Schleims und der Mastzellen hin. Die verwendeten Fluorochrome verändern mit Ausnahme von Neutralrot im  $p_H$ -Bereich von 1—10 der abgestuften Lösungen ihre Farbe und Fluoreszenz nicht in wesentlichem Ausmaß. Als großen Mangel empfinde es dabei auch ich, daß wir nicht die technischen Hilfsmittel besitzen, um die gesehenen Farben kolorimetrisch festlegen und ihre Intensität messen zu können.

Das annähernd gleichsinnige Verhalten der hier beschriebenen Zellen und Gewebe deckt sich weitgehendst mit den in der Hellfeldbeobachtung beschriebenen Metachromasieerscheinungen, und auch die von LISON gestellten Forderungen für echte Metachromasie sind dabei weitgehend erfüllt. Es liegt daher nahe, auch ihre Ursachen für unsere Ergebnisse verantwortlich zu machen. Das Optimum dieser Erscheinungen fällt wohl auch mit dem isoelektrischen Punkt der einzelnen Gewebsorte zusammen, der nach verschiedenen Fixierungen zwischen 2,5—5 liegt. Aber auch Zellkerne und Plasma liegen mit ihrem isoelektrischen Punkt im gleichen Gebiet und zeigen dabei kein gleichartiges Verhalten, wenn auch bezüglich der Farbintensität der Zellkerne in diesem Bereich das Optimum liegt. Für eine Erklärung dieser Erscheinungen reicht also auch dieses Argument nicht aus.

HÖFLER und STRUGGER machen für die kupferrote Färbung mit Akridinorange die Kationen des dissoziierten Farbstoffes verantwortlich und nehmen eine elektroadsorptive Bindung derselben besonders bei Färbungen der Zellulosemembranen von Pflanzenzellen an. Die chemische Bindung des undissoziierten Farbstoffes dagegen soll nur grünliche Fluoreszenz bewirken. HÖFLER gibt für die Unterscheidung elektroadsorptiver und chemischer Bindung eine Mikroreaktion an, die durch Zusatz von  $\text{CaCl}_2$  eine Verdrängung der färbenden Kationen bewirkt. Eine zweite Unterscheidungsmöglichkeit bietet eine Färbung mit einem in diesem Bereich undissoziierten Farbstoff. Als solchen empfiehlt er Rhodamin B, das nach seinen Angaben zwischen  $\text{pH } 2\text{—}11$  undissoziiert ist und daher auch keine elektroadsorptive Bindung bewirken kann. Diese beiden Vergleichsreaktionen verhalten sich nun in unserem Beispiel direkt konträr zueinander. Durch  $\text{CaCl}_2$  verschwindet jede Schleim- und Mastzellenfärbung, und auch die kupferrote Fluoreszenz der Knorpelzellkapseln bleibt aus. Andererseits treten bei Fluorochromierung mit Rhodamin B ganz analoge Metachromasieerscheinungen auf, wie sie auch bei der Färbung mit Akridinorange beobachtet werden. Nach Behandlung mit  $\text{CaCl}_2$  verschwindet auch hier die spezifische Fluoreszenz der chromotropen Zellorte. Ganz analog zu den mit  $\text{CaCl}_2$  behandelten Schnitten verhalten sich die oben erwähnten mit Zitratpuffer-Farbstofflösung behandelten Präparate. Die Annahme chromotroper Substanzen als eigentliche Ursache dieser Erscheinungen stellt auch hier die einzig brauchbare Lösung dar. Für den Nachweis dieser aber steht damit eine neue, sehr empfindliche, zuverlässige und einfache Methode zur Verfügung.

Die an den Schleimdrüsen auftretenden verschiedenen nuancierten Fluoreszenzerscheinungen erlauben außerdem eine deutliche Unterscheidung des Schleims bezüglich seines Entwicklungszustandes (diese Unterscheidung ist besonders an Celloidinschnitten deutlich zu beobachten). Es liegt durchaus im Bereich der Möglichkeit, daß mit dieser Methode einzelne Abschnitte der Drüsen, die entsprechend der Zusammensetzung des Sekretes verschiedene Sekretionsarbeit verrichten, auch zytologisch differenzierbar sind. Weitere Untersuchungen an pathologisch verändertem Gewebe werden

zeigen, ob auch mesenchymale (konjunktivale) Abscheidungen, wie Hyalin, Amyloid usw., mit dieser Methode dargestellt werden können. Ähnliche Farbeffekte habe ich auch an der inneren Wurzelscheide der Haare im Rahmen des dort beginnenden Verhornungsprozesses beobachtet, und es bleibt deren genaue Beschreibung und Deutung weiteren Arbeiten vorbehalten. Besonders farbprächtige und detailreiche Bilder bieten mit dieser Methode die Verknöcherungszonen der Epiphysen.

Z u s a m m e n f a s s e n d kann also gesagt werden, daß auch fluoreszenzmikroskopisch epitheliales Muzin und andere chromotrope Zellorte mit einfachen Mitteln nachweisbar sind. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß in einem bestimmten  $pH$ -Bereich diese metachromatischen Erscheinungen durch Intensität und Farbfreudigkeit das mikroskopische Bild eindeutig beherrschen und so eine sichere Unterscheidung ermöglichen, weiters in der technisch höchst einfachen Methodik.

An dieser Stelle möchte ich nicht versäumen, dem Institutsvorstand, Herrn Prof. V. PATZELT, für die Überlassung der Arbeit und verschiedene wertvolle Ratschläge zu danken.

Auch der Firma CIBA bin ich für die kostenlose Beistellung diverser Fluorochrome und Reagenzien zu besonderem Dank verpflichtet.

Die Untersuchungen wurden mit der großen Reichert Standard Fluoreszenz-Einrichtung, Brenner S 100, ausgeführt, dessen Intensität für diese Arbeiten vollkommen ausreicht.

### Literatur

Czaja, *Planta* **11** (1930).

Ehrlich, *Arch. Anat. u. Physiol. Abt.* (1879): 166.

Höfler, *Mikroskopie* 1948, Sonderheft Fluoreszenzmikroskopie. *Mitt. Pharmaz. Forschungsinst.* (1948): 4.

Haitinger und Hamperl, *Z. mikrosk. anat. Forsch.* **33** (1933): 2.

Lehner, *Erg. Anat.* **25** (1924): 67.

Lison, *Arch. de Biolog.* **46** (1935): 599.

Möllendorf *W. v. und M. v.*, *Erg. Anat.* **25** (1924): 1.

Zeiger, *Physik. chem. Grundl. histol. Methodik* (1938): 96.

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

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

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

Jahr/Year: 1949

Band/Volume: [4](#)

Autor(en)/Author(s): Stockinger Leopold

Artikel/Article: [Fluoreszenz und Metachromasie. 307-312](#)