

PROBLEME DER HISTOLOGISCHEN MITOCHONDRIENDARSTELLUNG

H. MAYERSBACH

(Eingegangen am 14. Juli, 1960)

Die Angaben in der Literatur über Form, Zahl und Anordnung der Mitochondrien in einer bestimmten Zellart unbehandelter Tiere sind oft uneinheitlich und Widersprechend. Zweifellos sind dafür tagesrythmische Veränderungen der Organe und Gewebe verantwortlich; gerade die streng periodisch fressenden Laboratoriumstiere wie Ratten und Mäuse weisen starke tageszyklische Schwankungen auf. Bekannt ist dies seit längerem vom Glykogengehalt der Leber (HOLMGREEN, 1931). Gelegentliche frühere eigene Beobachtungen und jetzt allerdings noch nicht voll abgeschlossene systematische Untersuchungen am Lausanner Institut haben ergeben, dass der Glykogentagesrythmus überdies jahresszeitliche Unterschiede aufweist. Hand in Hand mit dem verschiedenen Glykogengehalt gehen Mitochondrienveränderungen in der Leber (ROBERTS, 1949). Aber auch die Nierenmitochondrien verändern sich, wie wir beobachten konnten, zum Teil nicht unerheblich im Rahmen des Tageszyklus.

Mehr aber noch spielen die zur Mitochondriendarstellung angewendeten Techniken eine Rolle. Durch die histologische Gewebshandlung können Mitochondrien derart verändert werden, dass von ein und demselben Organ gewonnene Gewebeproben sich nicht mehr vergleichen lassen und keine Ähnlichkeiten mehr untereinander aufweisen.

Wenn man sich das Problem stellt, Mitochondrien zu untersuchen, dann setzt das Thema fast immer voraus, die Mitochondrien möglichst lebenswahr zu Gesicht zu bekommen. Mit einem »Äquivalentbild« ist im Zusammenhang mit der Fragestellung meist wenig gedient, da es nur wenig Aufschlüsse gibt. Das Material soll aber auch nach Möglichkeit noch für andere Untersuchungen verwendbar sein, denn es ist sehr oft wünschenswert, in nebeneinander liegenden Serienschnitten Mitochondrien darzustellen aber auch verschiedene Färbungen und histochemische Reaktionen durchzuführen. Darüber hinaus soll die Technik möglichst einfach sein, so dass es ohne besondere Umstände möglich ist, gleichmässige Serien herzustellen. Methoden, welche nur gelegentliches Gelingen der Mitochondrienfärbung ermöglichen, sind für Vergleiche bei experimentellen Untersuchungen ungeeignet.

Obwohl sich in neuerer Zeit eine grosse Zahl von Fixierungs- und Färbungsmethoden für Mitochondrien anbietet, (HARMANN 1950, CHANG 1956, FUJII 1956, ANDREWS and JOHNSON 1956, BAKER 1957, LADMANN und MITCHELL 1957) kehrt man immer gerne zu den altbewährten Methoden von Regaud und Champy zurück. Die Darstellung der Mitochondrien gelingt dann meist immer. Allerdings haben diese beiden Methoden den Nachteil, dass sie andere Färbungen kaum oder überhaupt nicht erlauben (Abb. 1a), von histochemischen Reaktionen ganz zu schweigen.

Vergleicht man aber die Resultate der Fixierungsmethoden von Champy und Regaud untereinander, wobei die eine dem Typus der Osmiumsäure, die andere dem Typus des Bichromat entspricht, so sind die Ergebnisse fast immer verschieden. Nach der Regaud'schen Fixierung z. B. sind die Mitochondrien in der Niere in überwiegender Zahl stäbchenförmig (Abb. 1b, c), nach Osmiumfixierung erscheinen die Mitochondrien als kleine Körnchen oder grössere Kugeln (Abb. 1e). Nur sehr selten sieht man sie stäbchenförmig. Bei genauerer Untersuchung kann man allerdings feststellen, dass die Form der Mitochondrien abhängig ist von der Lage der Zellen im Gewebestück. Ganz oberflächlich gelegene Zellpartien enthalten stäbchenförmige, während einige tiefer liegende körnchenförmige Mitochondrien enthalten (Abb. 1f). Dies hängt mit der langsamen Eindringtiefe der Osmiumsäure zusammen, wodurch sich postmortale Veränderungen noch abspielen können, bevor das Fixierungsmittel die Zellen erreicht hat. Nach ZOLLINGER (1950) ist Mitochondrien-Zerfall und -Abkuglung ein Ausdruck anoxämischen Geschehens in überlebenden Mitochondrien. Andere osmiumhaltige Fixierungsmittel, wie etwa das von BAKER (1957) angegebene Herrmann'sche Fixierungsgemisch, ebenso gepufferte Osmiumsäure nach Pallade, wie sie für die Elektronenmikroskopie verwendet wird, zeigen gleiche Effekte (Abb. 1g). Auch aus Arbeiten von BAHR (1960) geht hervor, dass trotz osmotische Verhältnisse verbessernder Zusätze zu Osmiumsäuregemischen Mitochondrienveränderungen in tieferen Blockschichten nicht verhindert werden können.

Zur Fixierung der Nierenmitochondrien hat sich uns ganz ausgezeichnet das Helly'sche Gemisch bewährt, welches nicht zu den eigentlichen Mitochondrienfixierungsmitteln zählt. Die in der Abb. 1d dargestellte Helly-fixierte Niere zeigt deutlich gezeichnete, schöne stäbchenförmige Mitochondrien, die teilweise sogar fast bessere Erhaltung aufweisen, als das nach Regaud fixierte Nierenmaterial.

Bei vergleichsweiser Anwendung von osmium- und bichromathaltigen Fixierungsmitteln auf die *Leber* kann ähnliches beobachtet werden. Während REGAUD wiederum sehr feinkörnig die Mitochondrien erhält, die sogar oft als kommaförmige Gebilde zur Darstellung kommen (Abb. 2a), verquellen die Mitochondrien in den osmiumfixierten Leberstückchen; sie erscheinen als relativ plumpe Kugeln (Abb. 2e). Nicht selten enthalten diese Kugeln eine

kleine, aber deutlich sichtbare Blase (Abb. 2e B). Bei der Leber allerdings versagt das Helly'sche Gemisch. Die in den Leberzellen besonders reichlich enthaltenen Ribonukleotide bilden Schollen, welche sich überaus stark mit Eisenhaematoxylin (aber auch mit anderen Färbemitteln) anfärben, wodurch die Mitochondrien vollständig überdeckt werden (Abb. 2b). Selbst durch prolongierte Differenzierung lässt sich keine Mitochondriendarstellung erzielen, weil die Mitochondrien immer eher entfärbt sind, als die Schollen. Das zur Mitochondrienfixierung empfohlene Formol verschiedener Konzentration (ROMEIS 1948), sowie Calcium-Formol (BAKER 1944) ergeben Gleiches, insbesondere, wenn die Schnittdicke 2–3 μ übersteigt (Abb. 2d). Durch diese gute Erhaltung und Mitfärbung der Ribonukleotide ist die Verwendung dieser Fixierungsmittel, welche sowohl Darstellung von Mitochondrien, als auch Färbungen und bestimmte histochemische Reaktionen in Schnitten von einem einzigen Gewebsblock erlauben würden, für bestimmte Gewebe ausgeschlossen.

Von dem störenden Einfluss der Ribonukleotide auf die Mitochondriendarstellung ausgehend, hat BHARADWAJ (1959) eine sowohl interessante, wie klug durchdachte Technik entwickelt. Dazu werden die Gewebe mit einem Sublimat-Formol-Gemisch fixiert, was alle Zellanteile, einschliesslich der Mitochondrien gut erhalten soll. Zur Mitochondriendarstellung werden dann die Schnitte vor der Färbung mit Ribonukleinsäure-Extraktionsmitteln behandelt, damit sich diese nicht mehr mitfärben. Bei der Nachuntersuchung dieser Angaben wurde festgestellt, dass die angegebenen Extraktionsmittel — zu denen übrigens einige gehören, welche nach PEARSE (1959) zur RNS-Extraktion nur sehr wenig geeignet sind — nicht den gewünschten Erfolg bringen. Die durch die Sublimat-Formol-Fixierung sehr starken Nukleotidschollen in der Leber lassen sich durch KOH, Trichloressigsäure, Mc Ilvaine-Puffer und Ribonuklease nicht genügend entfernen und färben sich trotzdem mit. Erst nach Anwendung schärferer Extraktionsmittel (HCl, HClO₄, Schneider-Extraktion) wird die Färbung der Nukleotidschollen durch Eisenhaematoxylin nach Regaud verhindert. Die Abb. 2g zeigt deutlich den Effekt prolongierter Perchlorsäure-Extraktion, wodurch nun die Mitochondrien deutlich sichtbar werden. Diese Mitochondrien sind aber teilweise sehr stark verquollen und abgekugelt, wobei das Bild nicht, wie BHARADWAJ angibt, an das der Regaud-Fixierung erinnert, sondern vielmehr an das einer (schlechten) Osmium-Fixierung. Noch viel deutlicher zeigen die Nierenmitochondrien die Abkugelungserscheinungen (Abb. 3c).

Der an sich vorzügliche Gedankengang von BHARADWAJ wurde weiter verfolgt und die Technik in unserem Laboratorium modifiziert. Als Fixierungsmittel verwenden wir das für zahlreiche Färbungen und für viele histochemische Reaktionen geeignete Formol und Formol-Calcium. (Fixierung bei 4° C.). Ribonukleotide werden dadurch aber so gut erhalten, dass eine Mitochondriendarstellung — zumindest in RNS-reichen Organen — unmöglich gemacht wird.

Insbesondere dann, wenn die verschiedenen Formol-Lösungen mit Zucker versetzt werden; Zuckerezsätze verwenden wir für bestimmte histochemische Reaktionen mit Erfolg, weil durch Anpassung an osmotische Verhältnisse Substanzenverschiebungen hintangehalten werden. (Über die Formol-Zucker-Fixierung wird an anderer Stelle eingehend berichtet.)

Extraktionsversuche an Schnitten dieser verschieden fixierten Gewebe haben ergeben, dass die unerwünschte Mitfärbung der Ribonukleotide durch deren Extraktion verhindert werden kann. Allerdings kommt man zu diesem Zweck mit den sonst für histochemische RNS-Untersuchungen (Brachet-Test) üblichen milden und kurzen Extraktionen nicht aus. Dazu müssen vielmehr die kräftigsten Extraktionsmittel angewendet werden, wobei die Einwirkungsdauer sowohl vom nativen RNS-Reichtum des Zellmaterials, als auch von dessen guter Erhaltung durch Fixierungsmittel abhängt. Aber selbst in Formol-Calcium-Zuckergemischen fixierte Lebergewebe können damit ausreichend extrahiert werden (Abb. 2h), wonach sich die Mitochondrien sehr gut darstellen lassen. In der Niere gelingt auf diese Weise die Mitochondrien-darstellung ebenfalls sehr gut. Wenn zwar in diesem Organ die Färbung der Mitochondrien nach Formolfixierung an und für sich keine besondere Schwierigkeit bedeutet, weil die Zellen weniger RNS enthalten, so bietet die Anwendung von Extraktionsmitteln vor der Färbung zweifellos Vorteile. Es erübrigt sich nämlich, ganz dünne (unter 4μ dicke) Schnitte herzustellen und überdies fällt die Mitochondrienfärbung sowohl in ganz dünnen, wie auch in dickeren Schnitten gleichmässiger aus. In üblich behandelten Schnitten sind nämlich immer einzelne Nierentubuli noch zu wenig differenziert, wobei das Gebiet um die Mitochondrien eine einzige schwarze Farbmasse bildet (Abb. 3a, M), während in anderen, danebenliegenden Tubuli die Mitochondrien sehr gut dargestellt oder sogar schon überdifferenziert sind. (Abb. 3a, U). Dieser auf dem ungleichmässig grossen RNS-Gehalt der einzelnen Zellen in den Tubuli beruhende Färbungseffekt zwingt, mehrere verschieden stark differenzierte Schnitte herzustellen, damit die Mitochondrien sämtlicher Nierenabschnitte untersucht werden können. Im verstärkten Masse trifft dies zu, wenn die Nieren etwa für histochemische Untersuchungen mit Formol-Calcium oder Formol-Zuckergemischen fixiert wurden (Abb. 3d-f). Wie diese Abbildungen aber zeigen, erfolgt jedoch die Anfärbung der Mitochondrien nach der Extraktion gleichmässig stark, wodurch eine einheitliche Differenzierung ermöglicht wird. Es darf aber nicht verschwiegen werden, dass durch sehr lange Extraktionsbehandlung die Färbbarkeit der Leber und Nierenmitochondrien leiden kann, d. h., dass es sehr schwer ist, den Moment richtiger Differenzierung (auch mit ganz verdünnten Eisenaunlösungen) zu erfassen. Hier hat sich die Nachchromierung der Schnitte mit 3% Bichromat (12-24 Std.) nach der Nukleinsäure-Extraktion sehr bewährt; die Färbbarkeit der Mitochondrien wird dadurch wieder hergestellt.

Was die Morphologie der Mitochondrien angeht, so zeigt der Vergleich der Abb. 3b und 3f mit 3c, dass die Stäbchenform der Nierenmitochondrien durch Formol erhalten bleibt, während das von BHARADWAJ (1959) vorgeschlagene Sublimat-Formol-Gemisch eine Abkuglung der Mitochondrien verursacht. Gleiches gilt für die Leber (Vgl. Abb. 2g mit 2a), wozu hier noch eine sichtbare Mitochondrien-Abnahme in den Sublimat-Formol-fixierten Lebern kommt. Die gute Mitochondrienerhaltung durch Formol und deren anschliessende leichte Darstellbarkeit nach Ribonukleinsäure-Extraktion der Schnitte liefert sowohl in beiden Organen Ergebnisse, welche an die der klassischen Mitochondriendarstellung von REGAUD herankommen. (Siehe Abb. 1b, c und 2a).

Dieses Resultat ist an und für sich nicht verwunderlich, da nach ROMEIS (1948) Formol die Mitochondrien gut fixiert. Allerdings ist die Formolfixierung aber nur bei Geweben mit geringem RNS-Gehalt erfolgversprechend. Es ist deshalb zweifellos ein Verdienst von BHARADWAJ, durch seine Idee der RNS-Extraktion die Mitochondrienfärbung in RNS-haltigen Organen zu ermöglichen. Es wird durch diesen Vorgang nichts anderes erreicht, als was sich bei der Fixierung nach Regaud im Gewebe abspielt: Entfernung der Nukleinsäuren, die durch Bichromat nicht fixiert und dann extrahiert werden. Daraus erwächst aber für die Histotechnik ein bedeutender Vorteil. Einerseits werden zeitraubende Prozeduren und parallel laufende Fixierungen überflüssig, andererseits ist es möglich, an Schnitten ein und desselben Blockes auch andere Färbungen und sogar histochemische Untersuchungen durchzuführen, was für sehr viele Fragestellungen von Bedeutung ist.

In der Tafel 4 sind einige Ergebnisse histochemischer Reaktionen an verschiedenen fixierten Nierenstückchen gleicher Herkunft zusammengestellt. Vergleicht man lediglich die Verteilung PAS-positiven Materials in den Tubuli contorti I, dann kann man sehen, dass die übliche Formol und Formol-Calcium-Fixierung, aber auch das Formol-Sublimat nach BHARADWAJ (Abb. 4a, b, c) dieses in Hauptsache nur im Bereich der Bürstenbesätze erhält. Nach Formol-Calcium bzw. Formol-Sublimat kommen noch zusätzlich einzelne PAS-positive Körnchen im Cytoplasma der Tubuluszellen zur Darstellung. Nach Zusatz von Rohrzucker zum Formol hingegen enthalten die Lumina eine homogene Substanz; auch die Bürstenbesätze geben eine wesentlich stärkere PAS-Reaktion (Abb. 4e). Mit starker Vergrößerung ist besonders gut sichtbar (Abb. 4f), dass die Tubuluszellen reichlich PAS-positive Körnchen enthalten und dass das an der Zelloberfläche gelegene PJS-positive Material feine (intra- oder interzelluläre) strichartige Fortsätze gegen die Zellen hin aufweist. Dieser Befund gleicht weitgehend Bildern, wie sie in sehr gut erhaltenen gefroren-getrockneten Nieren mit der PJS-Reaktion erzielt werden (MAYERSBACH 1956). Aber auch die in Tubuluszellen nicht immer gut zu praeservierbaren Ribonukleotide erscheinen nach Rohrzuckerzusätzen zu Formol oder

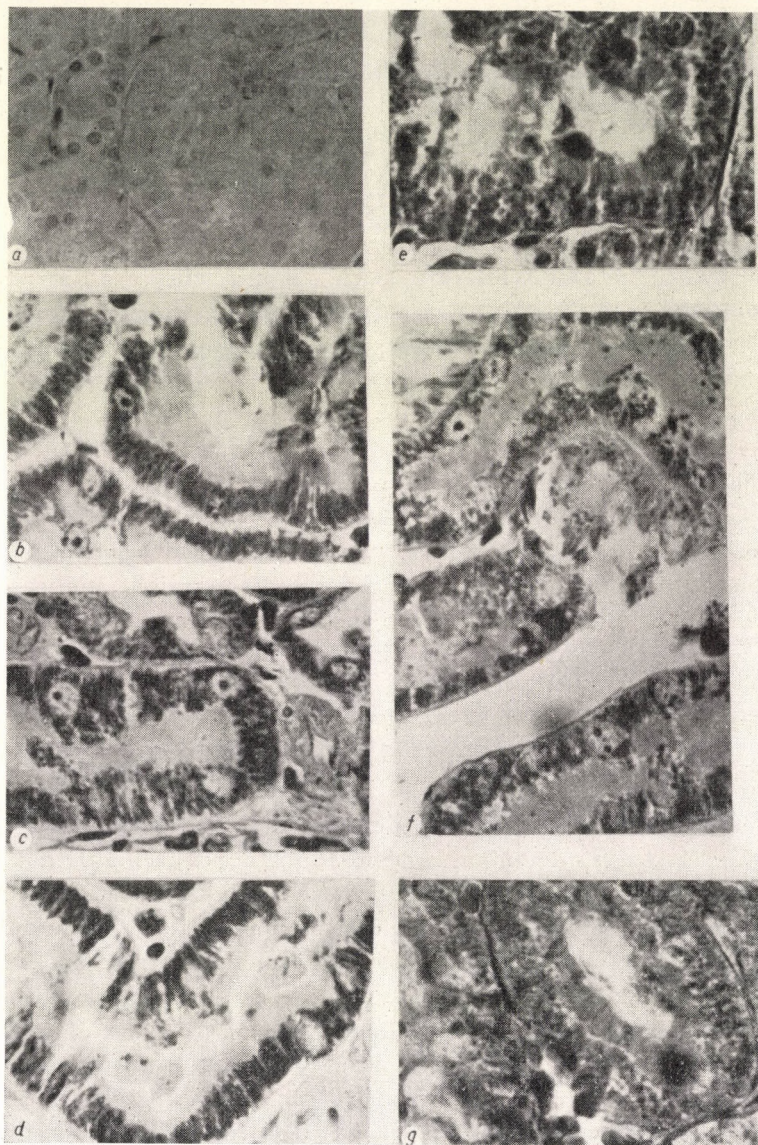


Abb. 1. Niere einer Ratte bei verschiedener Fixierung. *a*: Regaud, Färbung: Haematoxylin-Eosin. Die Abbildung zeigt deutlich, dass die Färbbarkeit der Gewebe durch die Regaud'sche Fixierung vermindert ist. Mikrofotografien lassen sich deshalb fast nicht herstellen und liefern »flaue« Bilder. *b, c*: Mitochondrienfärbung mit Eisenhaematoxylin. Die Mitochondrien erscheinen nach Regaud-Fixierung entweder als feine Stäbchen oder Körnchenreihen (*c*) in den Tubuli contorti I. *d*: Gleiche Niere nach Helly-Fixierung und Färbung mit Eisenhaematoxylin. Die Mitochondrien erscheinen als deutliche Stäbchen. *e*: Osmiumsäure-Fixation nach CHAMPY. Die Mitochondrien der Tubuli contorti I sind in der überwiegenden Zahl abgekugelt. *f*: Champy-Fixierung. Oberflächlich im Gewebblock liegende Zellanteile (untere Bildhälfte) enthalten stäbchenförmige, tiefer gelegene kugelige Mitochondrien (obere Bildhälfte). *g*: Mitochondrien-Fixierung nach BAKER (1957). (Herrmann'sches Gemisch und Nachosmierung). Mitochondrien kleinkörnig zerfallen

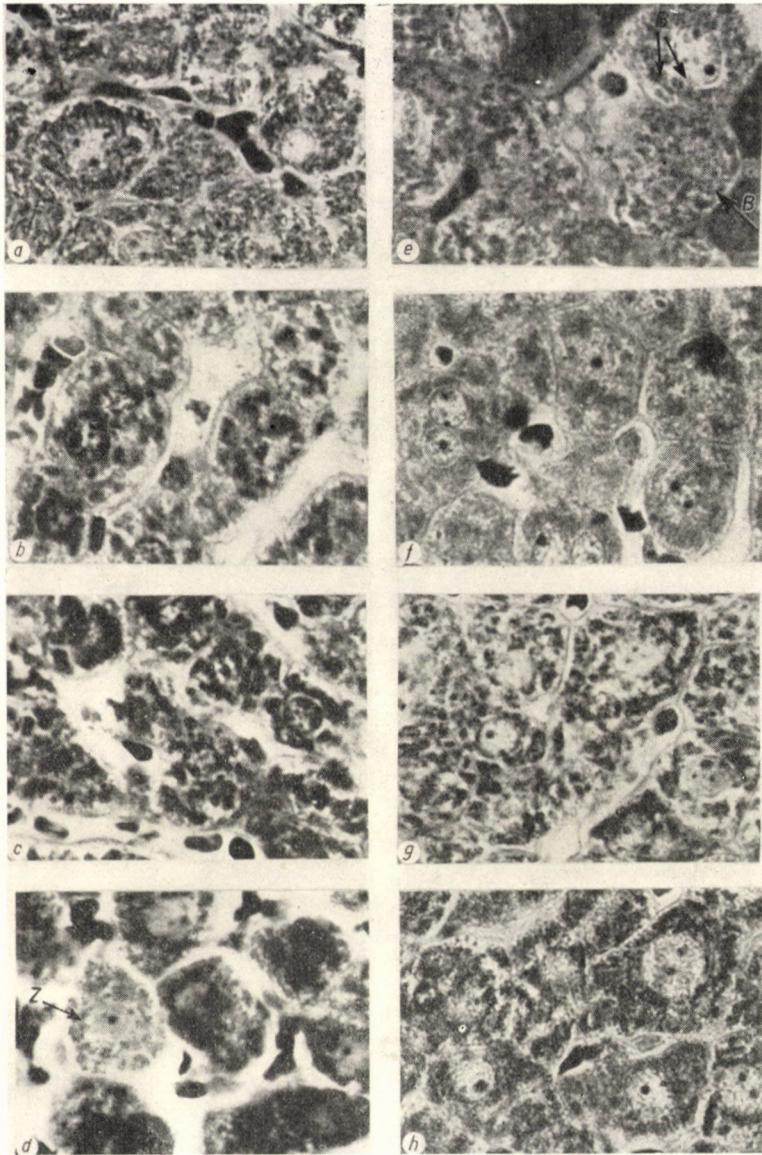


Abb. 2. Leber einer Ratte bei verschiedener Fixierung. *a*: Regaud-Fixierung. Die Mitochondrien sind feinkörnig oder fein-stäbchenförmig. *b*: Helly-Fixierung. Ribonukleotidschollen werden durch Eisenhaematoxylin stark gefärbt, so dass keine Mitochondrienfärbung mehr möglich ist. *f*: Trotz Extraktion der RNS mit HCl bleiben Ribonukleotide im Helly-fixierten Gewebe noch färbbar. Ihre verminderte Färbbarkeit erlaubt jedoch schon annähernd Mitochondrien darzustellen. *c*: Formol-Sublimat-Fixierung nach BHARADWAJ. Starke Anfärbung von Ribonukleotidschollen durch Eisenhaematoxylin. Mitochondrien können nicht dargestellt werden. *g*: Formol-Sublimat, Extraktion der Schnitte 12 Std N-HCl. Durch Entfernung der RNS werden Mitochondrien darstellbar, welche der Fixierung entsprechend als größere Kugeln erscheinen. *d, h*: Fixierung mit Formol-Calcium-Zuckergemisch. *d*: Ohne Extraktion. Durch die gute Ribonukleotiderhaltung und deren starke Mitfärbung können Mitochondrien nur in RNS-freien Zellen (Z) dargestellt werden. *h*: Nach Extraktion der Ribonukleotide mit N-HCl. Mitochondrien in allen Zellen darstellbar. Ihre Form ist kleinkörnig oder fein-stäbchenförmig. *e*: Champy-Fixierung. Mitochondrien durchwegs grosskugelig, einige enthalten Bläschen (B)

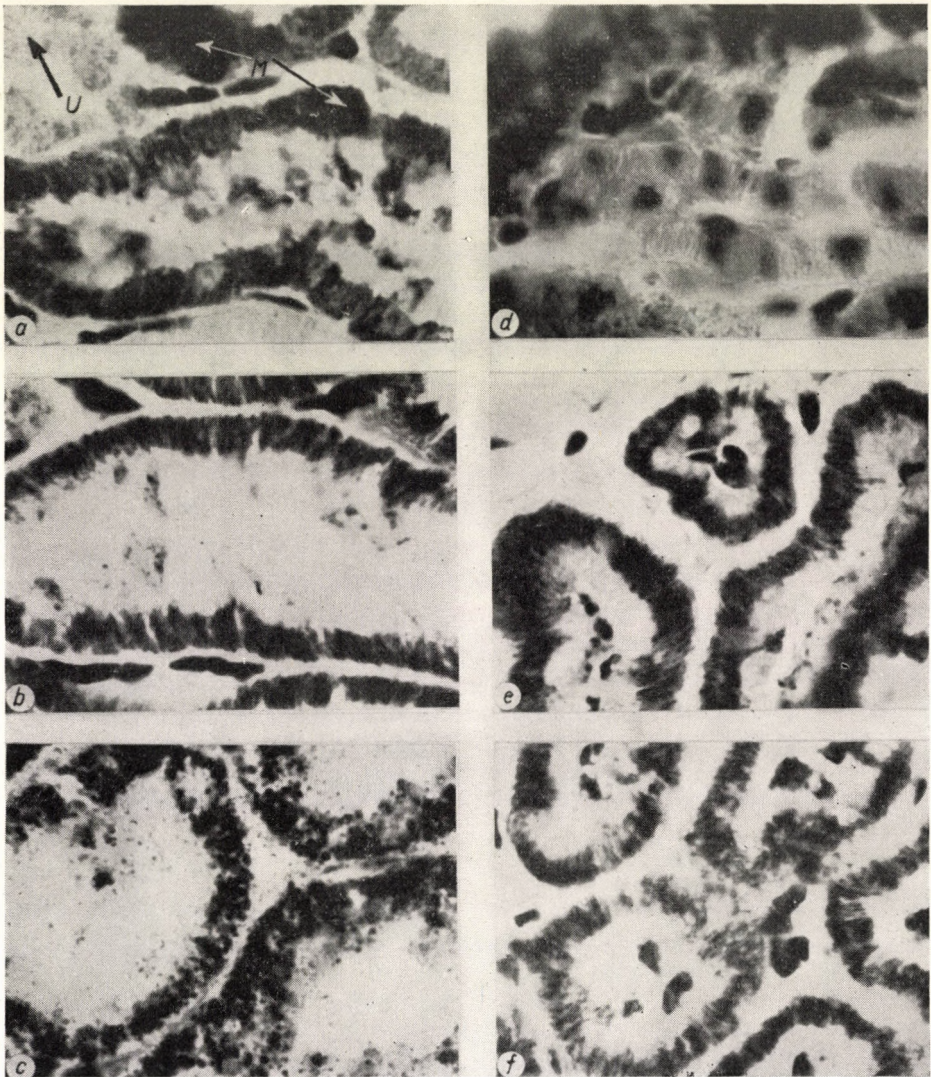


Abb. 3. Niere einer Ratte bei verschiedener Fixierung. *a*: Formol-Fixierung. Durch den verschieden starken RNS-Gehalt erfolgt die Differenzierung der Ribonucleotide ungleichmässig. Einzelne Zellen bzw. Zellgruppen enthalten noch Farbmassen (M), andere sind zur Mitochondriendarstellung richtig differenziert und schliesslich gibt es noch überdifferenzierte (U) Tubuli, in denen die Mitochondrien schon fast wieder entfärbt sind. *b*: Wie *a*, jedoch Schnitt extrahiert mit N-HCl. Gleichmässige Anfärbung der Mitochondrien, die stäbchenförmig sind. *c*: Gleiche Niere nach Sublimat-Formol-Fixierung (BHARADWAJ) und Extraktion mit N-HCl. Die Differenzierung des Eisenhaematoxylin erfolgt in allen Tubuli gleichmässig. Die Mitochondrienform ist jedoch durch die Fixierung grobkugelig. *d*, *e*, *f*: Fixierung mit Formol-Calcium-Zucker. *d*: Ohne Extraktion. Durch die gute RNS-Erhaltung dieses Gemisches sind die Differenzierungsunterschiede stärker als bei reiner Formol-Calcium-Fixierung. *e*: Unvollständige. *f*: Vollständige Extraktion der RNS mit N-HCl

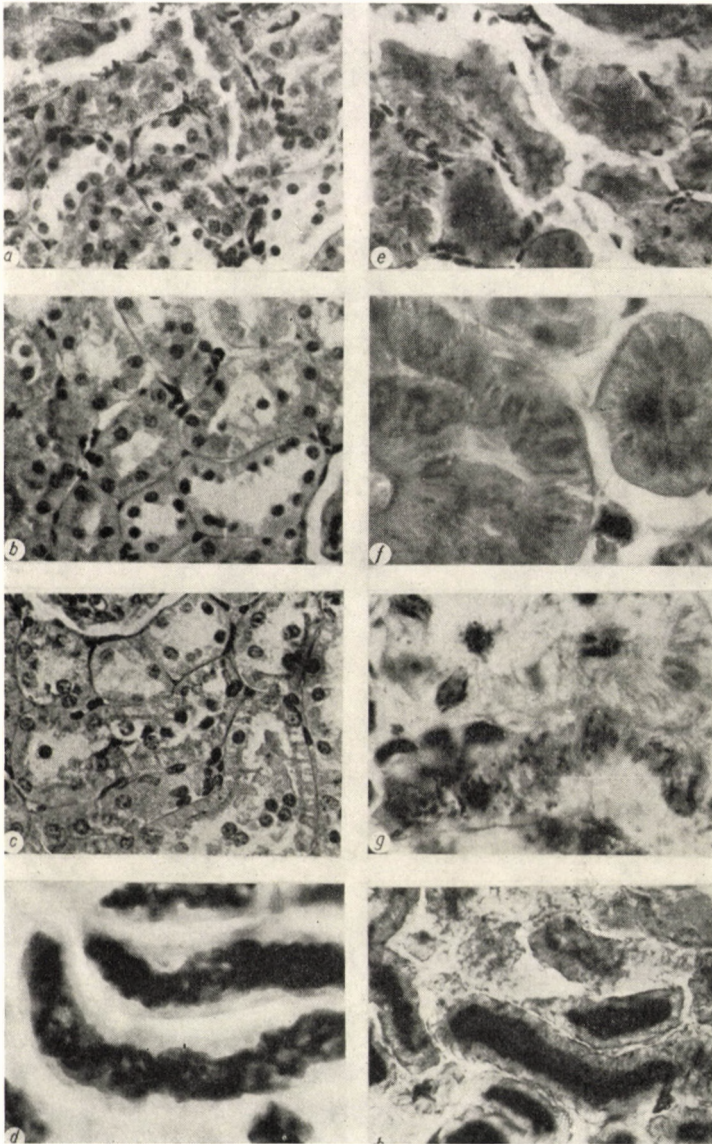


Abb. 4. Niere einer Ratte bei verschiedener Fixierung. Beispiele histochemischer Reaktionen. *a, b, c, e, f*: PJS-Reaktion, Haemalaun. *a*: Formol—Calcium. Nur Bürstenbesätze und feine Körnchen im Cytoplasma erscheinen. Schiff-positiv. *b*: Formol. Nur Bürstenbesätze, aber fast keine Körnchen des Cytoplasmas enthalten PJS-positives Material. *c*: Formol—Sublimat. Bürstenbesätze und gelegentlich in einzelnen Tubuli schwach PJS-positiver Inhalt. *e*: Formol—Calcium—Zucker. Bürstenbesätze und zahlreiche feine Körnchen im Cytoplasma stark PJS-positiv. Auffällig gute Erhaltung einer Schiff-positiven Substanz im Tubulus-Lumen. *f*: Wie *e*, jedoch bei stärkerer Vergrößerung. Man sieht deutlich strichartige Schiff-positive Fortsätze aus dem Bürstenbesatzbereich in die Tiefe der Zellen hineinragen. *g*: Formol—Calcium—Zucker-Fixierung, Darstellung der Ribonukleotide mit gepuffertem Methyleneblau nach Pischinger. *d, h*: Darstellung der alkalischen Phosphatase nach GOMORI (β -Glycerophosphat). *d*: Nativer Gefrierschnitt inkubiert 15 Min. 37 C°. *h*: Formol—Calcium—Zucker-Fixation. Schnitt inkubiert bei Zimmertemperatur 5 Min.

Formol—Calcium als Filamente. Von besonderem Vorteil ist die Substanzerhaltung für histochemische Fermentreaktionen. Aus dem Vergleich der Abb. 4d und 4h geht eindeutig hervor, dass durch den Rohrzuckerzusatz die Reaktion für alkalische Phosphatase nach GOMORI stärker ausfällt, als in nativen Gefrierschnitten. Dies äussert sich in wesentlich kürzeren Inkubationszeiten (der Schnitt der Abb. 4h wurde nur 5 Min bei Zimmertemperatur, der Schnitt der Abb. 4d hingegen 15 Min bei 37° C inkubiert). Auch die Lokalisation ist viel schärfer und die Fermente bleiben selbst an jenen Orten erhalten, die mit üblicher Technik fermentfrei gefunden werden. Dazu gehören die feinen basalen Streifen und Cytoplasmakörnchen; gleiche Lokalisation der Phosphatase konnte durch eine sehr entwickelte, histochemisch-elektronenmikroskopische Technik von MÖLBERT (1960) in Nierenzellen beobachtet werden. Nach Formol—Zucker-Fixation ist sogar in paraffineingebettetem Material die Darstellung von Adenosintriphosphatase (Methode: PADYKULA — HERRMANN, 1956) in ausreichender Menge möglich. Dies muss als besondere Leistung der Substanzerhaltung durch den Zuckerzusatz gewertet werden, da sich dieses Ferment selbst in Gefrierschnitten nicht immer leicht darstellen lässt und nach NOVAKOFF (1960) durch Fixation sehr leicht geschädigt wird. Die Formol—Zucker-Fixation wurde bereits für Untersuchungen über das Verhalten verschiedener Fermente in der Mäuseniere nach Alloxangaben (ERGOČACK und BUCHER, 1960) mit Erfolg angewendet.

Material und angewandte Technik

Material: Leber und Nieren von weissen Ratten; für Vergleichsuntersuchungen dienten nur Organe von jeweils einem einzigen Tier.

Fixierungen: Regaud und Champy (nach ROMEIS 1948); Herrmann'sches Gemisch mit Nachosmierung nach BAKER (1957); gepufferte Osmiumsäure nach PALLADE; Formol—Sublimat nach BHARADWAJ (1959); Neutrales Formol (4%) und Formol—Calcium nach BAKER (1954); Formol und Formol—Calcium mit Rohrzuckerzusatz (0,88 M). Sämtliche Fixierungen wurden bei 4° C durchgeführt.

Übliche Paraffineinbettung, Schnittdicken 5—8 μ .

Nukleinsäure—Extraktion: a) nach BHARADWAJ:

1% KOH, 1 Std bei Zimmertemperatur,
Mc Ilvaine und Phosphatpuffer (pH 7, 0,2 M) 2—8 Std bei 37° C.
5% Trichloressigsäure 12 Std. 37° C und
0,1% Ribonuklease.

b) eigene Modifikation:

Perchlorsäure 10% 2—15 Std., 60° C.
Salzsäure, N—HCl 2—20 Std., 60° C.
Trichloressigsäure 10% 2—10 Std., 90° C. (nicht sehr gut geeignet)

c) eventuell Nachchromierung mit Kaliumbichromat 3% 12—24 Std.

Um Abschwimmen der Schnitte während der Säurebehandlung zu verhindern, wurden die Schnitte nach LIPP celloidinisiert.

Färbung: Regaud'sches Eisenhaematoxylin nach ROMEIS; Farbstoff jedoch künstlich durch Natriumperjodat-Zugabe gereift (0,1 gr pro 0,5 gr Haematoxylin).

Beizen der Schnitte in 5% Eisenalaun-Lösung 24 Std. 37° C.

Färben 12 Std. bei Zimmertemperatur.

Differenzieren in 2,5% Eisenalaun.

Alkoholreihe, Kanada-Balsam.

Zusammenfassung

Es ist für histologische Untersuchungen von Mitochondrien in Leber und Niere dem Regaud'schen Fixierungsmittel der Vorzug zu geben. Durch dessen rasche Penetration erfolgt die Fixierung der Gewebe noch bevor postmortale Veränderungen der Mitochondrien stattfinden können. Die für das Gelingen einer Osmiumfixierung notwendigen papierdünnen Gewebsblöcke können aus verschiedenen Gründen nicht immer hergestellt werden und mit nur oberflächlich gelegenen, gut erhaltenen Schichten ist meist nicht gedient. Selbst in nur 2—3 mm dicken Gewebsblöcken treten infolge der langsamen Eindringgeschwindigkeit der Osmiumsäure starke postmortale Veränderungen durch Zerfall und Abkuglung der stäbchenförmigen Nierenmitochondrien auf, während diese in der Leber mit Verquellung und Blasenbildung der Mitochondrien einhergehen.

Das von BHARADWAJ angegebene Sublimat—Formol-Gemisch eignet sich nicht sehr zur naturnahen Erhaltung der Mitochondrien, da es ebenfalls deren Umwandlung in Kugelform verursacht. Jedoch ist die von BHARADWAJ vorgeschlagene Extraktion der Ribonukleinsäuren, welche die Eisenhaematoxilin-färbung stören, eine hervorragende Methode, um in Formol, Formol—Calcium und in Formol—Zucker fixierten RNS-reichen Zellen die Darstellung der Mitochondrien zu ermöglichen. Allerdings sind nur sehr kräftig wirkende Extraktionsmittel effektiv, wobei die Extraktionszeit — abhängig vom Organ — sehr lang sein muss. Eine eventuelle Färbbarkeitsabschwächung der Mitochondrien durch forcierte RNS-Extraktion kann man durch Nachchromierung der Schnitte wieder rückgängig machen. Hiermit ergibt sich die Möglichkeit, in Schnitten von einem einzigen Gewebestück sowohl Mitochondrien darzustellen, als auch Färbungen und bestimmte histochemische Reaktionen durchzuführen, was zweifellos neben der Zeit- und Arbeitersparnis sehr wünschenswert und für manche Vergleichsstudien fast unerlässlich ist.

LITERATUR

1. ANDREWS, W.—JOHNSON, H. (1956): Staining Mitochondria in fixed blood smears. *Stain tech.* 31, 21.
2. BARR, G. F.—HUGSTRÖM, L. (1960): Penetration rats of osmium tetroxide with different fixation vehicles. *Histochemie* II. 1—4.
3. BAKER, R. (1944): *Quarterly J. of Microsc. Science* 85, Part 1.
4. BAKER, R. (1957): The effect of acetic acid on cytoplasmic inclusions. *Quarterly J. of Microsc. Science* 98, Part 4.
5. BHARADWAJ, T. B.—LOVE, R. (1959): Staining mitochondria with hematoxylin after formalin-sublimate-fixation; a rapid method.
6. CHANG, J. P. (1956): Staining mitochondria in frozen, dried tissues. *Exper. Cell. Res.* 11, 643.
7. ERGOCAK—BUCHER, O. (1960): Im Druck.
8. FUJII, S. (1956): Methode zur selektiven und sehr distinkten Darstellung der Mitochondrien durch Versilberung. *Arch. Hist. Jap.* 11, 303.
9. HARMANN, J. W. (1950): The selective staining of mitochondria. *Stain tech.* 25, 69.
10. HOLMGREN, H. (1931): Beitrag zur Kenntnis der Leberfunktion. *Z. Mikr. Anat. Forsch.* 24, 632.
11. LADMANN, A. J.—MITCHELL, H. A. (1957): The demonstration of selective staining of mitochondria in the rats retina by means of Bodians Protogol-method as seen with the light- and electron microscope. *Anat. Rec.* 127, Am. As. Anat.
12. LIPP, W. (1954): *Histochemische Methoden*. Oldenburg-Verlag, München.
13. MAYERSBACH, H. (1956): Proteinmetabolismus in Leber und Niere. *Verh. Anat. Ges.* 53, 274—284.
14. MÖLBERT, E.—DUSPIVA, F.—DEIMLING, O. (1960): Die histochemische Lokalisation der Phosphatase in der Tubulus-Epithel-Zelle der Mäuseniere im elektronenmikroskopischen Bild. *Histochemie* II. 5.
15. NOVIKOFF, A. B.—WOO-JUNG, CHIN—DRUCK, J. (1960): Cold acetone fixation for enzyme localisation in frozen sections. *J. Hist. Cytochem.* 8, 37.
16. PEARSE, A. G. E. (1959): *Histochemistry, theoretical and applied*. II. Edition, Churchill, London.
17. ROBERTS, S. H. (1949): Changes in mitochondrial forms. *Anat. Rec.* 104, 163.
18. ROMEIS, B. (1948): *Mikroskopische Technik*. Oldenburg-Verlag, München.
19. ZOLLINGER, H. U. (1950): Über hyalintropfige Veränderung als Ausdruck von Eiweißspeicherung. *Schw. Z. Path. und Bact.* 13, 145.

ПРОБЛЕМЫ ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО ВЫЯВЛЕНИЯ МИТОХОНДРИЙ

Х. МАЙЕРСБАХ

При гистологических исследованиях митохондрий в печени и почках лучше всего оправдывался фиксирующий раствор Рего. Благодаря быстрому прониканию этого раствора фиксация тканей происходит до возникновения посмертных изменений митохондрий.

Необходимых для удачной осмиевой фиксации весьма тонких тканевых кусочков, по разным причинам не всегда удается получить и расположенные только поверхностно, хорошо сохранные слои в большинстве случаев недостаточны. Даже в тканевых кусочках толщиной только 2—3 мм, возникают вследствие медленного проникновения осмиевой кислоты значительные посмертные изменения из-за распада и округления палочковидных митохондрий почки, в то время как в печени эти изменения сопровождаются набуханием и образованием пузырьков митохондрий.

Предложенная *Барадаем* смесь сулемы с формалином не очень пригодна для сохранения естественной формы митохондрий, так как она также обуславливает их превращение в шаровидную форму. Однако, предложенное *Барадаем* экстрагирование рибонуклеиновых кислот, мешающих окрашиванию железным гематоксилином, представляет превосходный метод для выявления митохондрий, в фиксированных формалином, смесью формалина и кальция или смесью формалина и сахара, богатых рибонуклеиновой кислотой клетках. Правда, что только весьма сильные экстрагирующие вещества оказались эффективными, причем время экстрагирования — в зависимости от органа — должно быть очень продолжительным. Возможное уменьшение окрашиваемости митохондрий, вызванное форсированным извлечением рибонуклеиновой кислоты можно восстановить дополнительным хромированием срезов. Благодаря этому представляется возможность выявить не только митохондрии в срезах из одного единственного тканевого кусочка, но и провести окрашивания и определенные гистологические реакции, что несомненно — наряду с экономией времени и труда — является весьма желательным и даже для некоторых сравнительных исследований почти необходимым.

LE PROBLÈME DE LA REPRÉSENTATION HISTOLOGIQUE DES MITOCHONDRIES

H. MAYERSBACH

Pour l'examen histologique des mitochondries dans le foie et le rein le matériel de fixation de Regaud et celui de choix. Par sa pénétration rapide la fixation des tissus survient encore avant que les changements postmortals des mitochondries puissent survenir. Pour la réussite d'une fixation d'osmium les blocs de tissus doivent être mince comme du papier, ce que, pour de différentes raisons ne peut pas toujours être réalisé, et des couches superficielles bien conservées sont le plus souvent insuffisantes. Même dans les blocs de tissu d'une épaisseur de seulement 2—3 mm de forts changements postmortals surviennent, due a la pénétration lente de l'acide osmique, tandis que par ce fait les mitochondries dans le foie montrent un engonflement et une formation vésiculeuse.

Le composé sublimat-formol décrit par BHARADWAJ ne se prête pas trop à la conservation fidèle des mitochondries, puisqu'il cause également une transformation globiforme. BHARADWAJ propose également l'extraction des acides ribonucléaires, qui perturbent la coloration ferro-hématoxyline, ce qui est une méthode excellente pour représenter des mitochondries dans des cellules riches en ARN fixées dans du formol, formol-calcium et formol-sucre. Cependant ce ne sont que des matériels d'extraction d'un effet très vigoureux qui sont efficaces et la durée de l'extraction-dépendant de l'organe doit être bien prolongée. Un affaiblissement éventuel de la coloration des mitochondries due à l'extraction forcée de l'ARN peut être corrigé par la coloration supplémentaire des coupes. Voilà donc une possibilité pour représenter des mitochondries dans les coupes d'un seul bloc de tissu, tout en effectuant aussi des colorations et certaines réactions histochimiques, — ce qui est sans doute très désirable du point de vue d'épargne de temps et de travail. Cet avantage est donc presque indispensable dans des études comparatives.

Dr. H. MAYERSBACH, Institut d'Histologie et d'Embryologie, Université de Lausanne, Suisse