

## UNTERSUCHUNG DER EMBRYONALEN FASERENT- WICKLUNG MIT HISTOCHEMISCHEN METHODEN

L. KARMAZSIN

(Eingegangen am 29. September 1960)

In einer vorherigen Mitteilung haben wir die genetischen Probleme der Faserbildung behandelt. Im Verlauf unserer Untersuchungen, in welchen wir an der Cornea des Hühnerembryos den Entwicklungsprozeß der Fasern verfolgten, konnten wir feststellen, daß bei der Entwicklung der Fibrillen der formative oder fermentative Aktivität entscheidend ist [24]. Nebst dieser Feststellung möchten wir betonen, daß das Bindegewebe und so auch das Stroma der embryonalen Cornea als komplexes System anzusehen ist, innerhalb dessen die einzelnen Komponenten, also die Zellen, Fasern und die Grundsubstanz eine zusammenhängende funktionelle Einheit bilden. Wir haben auch darauf hingewiesen, daß nach den literarischen Angaben die Komponenten der interfibrillären Hornhautsubstanzen von den Fibroblasten produziert werden. (KLING und CAMERON [26], GROSSFELD, MEYER und GODMAN [18], BERENSON und Mitarbeiter [11].) DOHLMAN [17], der das Schicksal der Cornea-Transplantate mit Hilfe von  $S^{35}$  beobachtete, stellte fest, daß am achten Tag nach der Transplantation auf dem Gebiet des Transplantates Isotop-Akkumulation und gleichzeitig das Erscheinen der Fibroblasten wahrzunehmen ist. WINKELMAN [47, 48] stellte fest, daß das Transparentwerden der Sklera-Transplantate und das Auftreten der metachromatischen Substanz parallele Erscheinungen sind.

AUREL und HOLMGREN [2] fanden, daß bei Menschen, Hasen, Meerschweinchen und Mäusen das Transparentwerden der Cornea und das Erscheinen der metachromatischen Substanz zeitlich koinzidiert.

Im Verlauf unserer Untersuchungen haben wir auch festgestellt, daß bei der Entwicklung des cornealen Fasersystems zuerst Argyrophilie zu beobachten ist, der am 9—12. Entwicklungstag ein Kollagen-Stadium folgt. Diese Umwandlung fällt mit der Erscheinung bzw. Anhäufung der metachromatischen Grundsubstanz zusammen.

ROBB-SMITH [40] stellte in seinem zusammenfassenden Referat fest, daß das Retikulin keine chemische Definition, sondern eine morphologische Bezeichnung ist. Es besteht aus feinen Fibrillen, die sich mit Anilinblau nicht färben und schwarz imprägnieren, durch Pepsin destruiert werden, Trypsin-

Behandlung verändert das Imprägnationsbild nicht bedeutend und auch die PAS-Positivität bleibt aus. Hyaluronidase hat auf die Struktur des Retikulins und dessen Verhalten den Farbstoffen gegenüber keinen Einfluß. Das von der Kollagenase abgebaute, im Elektronenmikroskop eine Streifung von 640 Å aufweisende Retikulin verfügt über eine dem Kollagen gleiche Aminosäurezusammensetzung. Laut ROBB-SMITH gibt es zwei Arten von Retikulin, eine von kollagenem und eine von nicht kollagenem Ursprung. Beide weisen Argyrophilie auf, ein charakteristischer Unterschied zeigt sich jedoch in ihrem enzymatischen Abbau, denn während sich das Retikulin nicht kollagenen Ursprungs mit Trypsin abbauen läßt, ist dies bei dem anderen nicht der Fall. Bei dieser Einteilung treffen wir auch solche Argyrophilie ergebende Kollagene, die zu den Präkollagenen gezählt werden (BANGA, 7).

Wir fanden, daß im Verlauf der Entwicklung des Hornhautstromas das retikuläre Stadium — simultan mit der Anhäufung der Bindesubstanz — von der Kollagenphase abgelöst wird.

Laut THOMAS [44] besteht die feste Substanz der Cornea zu 82,2% aus Kollagen und 17,8% aus Mukoid. Von diesen Stoffen sind uns folgende bekannt:

*Kollagen.* Vereinfacht man die in der Literatur unter vielen Namen erwähnten Kollagenarten, dann sind es auch zumindest drei Arten die auf Grund verschiedener physikochemischer Eigenheiten voneinander differenziert werden müssen:

1. Prokollagen und Tropokollagen, die das sich in dünnen organischen Säuren lösende Kollagen darstellen.
2. Metakollagen und Kollastromin sind die unlöslichen Kollagene.
3. Parakollagen, das mit dem spezifischen Pankreasenzym, der Kollagenmukoproteinase, aus der Haut auslösbar ist (BANGA, 7).

Submikroskopisch ist das Kollagen aus drei Elementen aufgebaut: Fibrillum, Filamentum, Prototrifibrillum. Die Verbindung der das Kollagen bildenden Aminosäuren wurde von ASTHURG [1] beschrieben. Die Einheit der kollagenen Faser ist das Prototrifibrillum. Diese Fibrillen sind durch eine Zementsubstanz verbunden. Ihre charakteristischen Querstreifen widerspiegeln die Veränderungen der chemischen Struktur. BEAR [9] ist der Ansicht, daß die Polypeptidketten in den einzelnen Abschnitten über lange Seitenketten verfügen. Diese bilden die Streifung »band«, zwischen welchen kurze Seitenketten »interband« zu finden sind.

Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre haben erwiesen, daß die interfibrilläre Substanz bei der physiologischen und pathologischen Funktion des Bindegewebes eine wichtige Rolle spielt. Denn an diesem Ort erfolgt einerseits der Austausch des von der Blutbahn kommenden Wasser-, Ion-, Eiweiß- usw. Transportes und der Stoffwechselprodukte der Zellen, andererseits der interzellulären Bindegewebelemente und Fasern, Mukopolysacchariden und gelösten Proteine. ROMHÁNYI [41] wies mittels Polarisationsstechnik

nach, daß die kollagenen und elastischen Fasern aus Proteine und Polysaccharide enthaltenden Fibrillen bestehen. Der metachromatische Index, also der Differentiationsindikator des alternden, oder in einem anderen pathologischen Prozeß begriffenen interzellulären Bindegewebes der jungen elementaren Fibrillen ist hoch. Die Verminderung der Mukoidkomponente führt im interzellulären Bestand zur Sklerose.

Aus den wertvollen Forschungen von BANGA [4] geht hervor, daß sich die interzellulär befindlichen — laut SCHWARZ — auch für die Argyrophilie verantwortlichen — Mukopolysaccharide metachromatisch färben.

Die interfibrilläre Substanz enthält ein Protein, das laut DISCHE, DANILCZENKO und ZELMEINS [16] 12% Kohlenhydrat enthält. WINDRUM, KENT und EASTOE [46] fanden, daß das Retikulin 4,2% Kohlenhydrat enthält, in dem keine Hexuronsäure, jedoch Hexosamin zu finden ist, und das auf Grund der Aminosäurezusammensetzung demnach als neutrales Mukopolysaccharid anzusehen ist. Die weiteren Untersuchungen von BANGA erweisen, daß dieses neutrale Mukopolysaccharid für die Argyrophilie und die PAS-Positivität verantwortlich ist. Es zeigt sich, daß die neutralen Mukopolysacchariden in der Morphogenese, im Metabolismus und in der Funktion der Bindegewebsfasern eine Rolle spielen können. Das die neutralen Mukopolysacchariden lösende Enzym — die Kollagenmukoproteinase — löst jene Polysacchariden, die an der aus den Fibrillen erfolgenden Bildung der kollagenen Fasern beteiligt sind.

Die Rolle dieser Grundsubstanz ist bei den sogenannten bradytrophen Geweben besonders wichtig, da ihr Stoffwechsel gerade durch diese Substanzen ermöglicht wird.

Über die Eigenschaften der interfibrillären Hornhautsubstanz sind im Schrifttum zahlreiche Angaben zu finden. Laut den Beobachtungen, die KUHLMAN [28] an der Cornea von Ratten machte, wird der Gewebestoffwechsel von folgenden Enzymen beeinflusst: Aldolase, Milchsäuredehydrogenase, Glucose 6-Phosphatdehydrogenase, Glutaminsäure-Dehydrogenase, Glutathiondehydrogenase. Das Hornhautepithel weist die intensivste und das Stroma die geringste Enzymaktivität auf. PAU [37] vertritt die Ansicht, daß die Fermentsysteme des Epithels und des Endothels eine besonders wichtige Rolle spielen. BECKER und FRIEDENWALD [10] untersuchten den Glukuronidasegehalt des Hornhautstromas — DAVSON [14] fand, daß die auch physiologisch gegenwärtige Hyaluronidase die Hyaluronsäure durch Hydrolyse depolymerisiert.

Mit den chemischen Eigenschaften der interfibrillären Stromasubstanzen befaßten sich MEYER und Mitarbeiter [33, 34, 35], die folgende Stoffe isolierten: Chondroitinsulfat, Hyaluronsäure, Keratosulfat. Laut WOODIN [50] bestehen die löslichen Mukoide der Cornea aus Protein-Mukopolysacchariden. WALLBECK und NEUMANN [45] fanden, daß die cornealen Mukoide mit Säuren präzipitiert und mit Basen extrahiert werden können. TALLMAN, HARRIS und

GRUBER [43] stellten auf Grund von papierelektrophoretischen Untersuchungen fest, daß bei Anwendung eines Barbituratpuffers von pH 8,6 die Hyaluronsäure etwa doppelt so schnell wandert, als das Heparin. MEYER und ODIER [33], MEYER und FELLIG [34], JORPES und WERNER [23] untersuchten die Zusammensetzung der Grundsubstanz mittels chemischer Analyse von Extrakten. SZECHY [42] untersuchte die isolierte Hornhaut von Rindern in verschiedenen Lösungen und beobachtete deren Flüssigkeitsabsorptionsvermögen, mit Hilfe der auf die Mukopolysacchariden der Grundsubstanz wirkenden Protamin- und Lysozym-Behandlung stellte er fest, daß die Mukopolysacchariden an Eiweiß gebunden sind und sich mit Toluidinblau metachromatisch färben.

Nachdem wir uns zur Aufgabe gestellt hatten, die Entwicklung des Fasersystems des Stromas und das Verhalten der mit diesem zusammen zu findenden Grundsubstanz zu beobachten, wandten wir hierfür zwei Verfahren an. Die Entwicklung der Fibrillen wurde mit der Fasernachweismethode und dem Elektronenmikroskop, und die Rolle der Grundsubstanz mit geeigneten histochemischen Verfahren untersucht.

#### Methodik

1. Im Anfangsstadium der Entwicklung wurde der Bulbus des Hühnerembryos in toto, sodann später dessen vorderer Teil in Methylbenzoat-Paraffin eingebettet. Dann stellten wir Serienschritte her und behandelten die Präparate mit Tetrazonium und Methylenblau laut HALE [19] und RITTER—OLESON [39]. Wenn die Gewebe mit auf verschiedene pH-Werte gepuffertem Methylenblau gefärbt werden, erlischt gegen das saure pH fortschreitend die Färbung der einzelnen Strukturen. Die sauren Mukopolysacchariden färben sich noch mit Methylenblau von pH 2 — während die Färbung der neutralen Mukopolysacchariden in den meisten Fällen unter pH 4 aufhört. In einigen Stadien wurde auch Fett nachgewiesen.

2. *Hyaluronidase*. Vom 4—bis zum 21tägigen Entwicklungsstadium wurde die Hornhaut freipräpariert, sodann fixiert, ausgewaschen und mit Hyaluronidase (Hyason, Organon) behandelt. Die Lösung hatte eine Konzentration von 250 E/ml. Die Verdauung erfolgte bei 37° C, 72 Stunden. Anschließend wurde in Methylbenzoat-Paraffin eingebettet, Serienschritte verfertigt und die Perdrausche Silberimpregnation, Toluidinblaufärbung, Hale-Reaktion, Methylenblau-Extinktionsverfahren, und Ritter—Oleson Methode angewandt.

3. *Trypsinverdauung*. Vom 4—bis zum 18tägigen Entwicklungsstadium wurde die Hornhaut freipräpariert, in Carnoy fixiert und Blockverdauung nach ROMEIS (1477) vorgenommen. Anschließend wurde das Material in Methylbenzoat-Paraffin eingebettet und nach Herstellung von Serienschritten wurden die Präparate den vorher beschriebenen Methoden gemäß behandelt.

4. *Pankreasmukaseverdauung*. Die Hornhaut wurde vom 4tägigen Entwicklungsstadium an freipräpariert, in Formalin fixiert und nach reichlichem Auswaschen mit dem nach BANGA und BALÓ [5] hergestellten — in M/40 Veronal-Azetat (7,4 pH) Puffer gelösten — Kollagenmukoproteinase + Elastomukoproteinase-Komplex behandelt. Anschließend wurde Silberimpregnation, Toluidinblau-Färbung und Methylenblau-Extinktion, laut Ritter—Oleson vorgenommen.

5. Nebst der Verwendung obiger Methoden, erschien die Benützung solcher Verfahren für zweckmäßig, die die weitere Beobachtung der sich in den einzelnen Entwicklungsperioden anhäufenden bzw. entstehenden Bindesubstanz ermöglichten. Hierzu wurde die BRADENSche [13] Extraktionstechnik angewendet. Das bei diesem Verfahren benützte Material wurde aus der Cornea des im 6—8—10—12—14—16—18—20tägigen Entwicklungsstadium befindlichen Hühnerembryo hergestellt. 2,0 g Cornea wurde in Azeton gelegt, an der Luft getrocknet, gereinigt gemahlen, in 200 ml dest. Wasser suspendiert, mit 8 n HCl auf 1,5 pH eingestellt, mit 0,5 g Pepsin versetzt und bei 37° C, 72 Stunden hindurch inkubiert. Während dieser Zeit

erfolgte die Kolliquation der Mischung. Nach Neutralisierung gaben wir 0,6 g kristallisiertes Trypsin hinzu und inkubierten 24 Stunden bei 37° C. Von da an hielten wir uns an das erwähnte Verfahren. Das im Verlauf der Extraktion gewonnene — der Originalbeschreibung nach saure und neutrale Mukopolysacchariden enthaltende — Extrakt wurde auf Objektträger übertragen, an der Luft getrocknet, in Eisessig-Alkohol fixiert und mit Toluidinblau, und laut Hale und Ritter—Oleson gefärbt.

### Ergebnisse

*ad 1. 4tägiges Entwicklungsstadium:* Der in toto eingebettete, aufgeschnittene und laut Ritter—Oleson gefärbte Bulbus weist homogene Hale-Positivität auf.

*5tägiges Entwicklungsstadium:* Es ist keine wesentliche Veränderung zu beobachten.

*7tägiges Entwicklungsstadium:* In der Cornea sind ganz blasse, rosa Färbungsspuren zu sehen, die Linsenkapsel zeigt schwache PAS Färbung.

*8tägiges Entwicklungsstadium:* In der verdichteten Sklera beginnende PAS-Positivität, die sich auf dem corneoskleralen Gebiet fortsetzt. Die hintere Membran der Cornea weist eine sich ständig verstärkende PAS-Positivität auf, die vordere Membran ist PAS-negativ. Abb. 7 zeigt die Färbung des corneoskleralen Gebietes.

*9tägiges Entwicklungsstadium:* In der Sklera sind bereits differenzierte Knorpelzellen zu finden, deren perizelluläre Membran Hale-positiv ist. Zwischen den in der Nähe des Perichondriums befindlichen Zellen schwache PAS-Reaktion. Die Tunica propria ist überwiegend Hale-positiv, auf der Zelloberfläche ist bereits perizelluläre PAS Färbung zu beobachten. Die corneosklere Grenze weist stärkere PAS Färbung auf.

*10—11tägiges Entwicklungsstadium:* Keine bedeutendere Veränderung zu verzeichnen.

*12tägiges Entwicklungsstadium:* Unter dem Epithel ist eine intensiv PAS-positive Grenzmembran zu finden. Die Tunica propria der Cornea ist noch größtenteils Hale-positiv, aber um die Zellen — hauptsächlich im vorderen Drittel — kann eine sich ständig verstärkende PAS Färbung beobachtet werden.

*13—14tägiges Entwicklungsstadium:* Die Tunica propria ist homogen PAS positiv. Die Zellkerne färben sich kaum, während die Faseroberfläche des Stromas eine intensive Färbung aufweist (Abb. 8). Beide Grundmembranen sind PAS-positiv. An der corneosklere Grenze ist die knorpelige Sklera, das Perichondrium PAS positiv, während die bereits vollständig differenzierte Sklera gemischte Färbung aufweist. Die Knorpelmembran ist an der corneosklere Grenze gefasert und setzt sich ohne Übergang in der Cornea fort, wo sie ihre Dichte und starke Färbung verliert.

*18—20tägiges Entwicklungsstadium:* Unter dem Epithel ist die Membran intensiv PAS-positiv. Eine ähnliche Färbung ist auch bei der hinteren

Membran zu beobachten. Die Tunica propria weist eine homogene, intensive PAS Färbung auf (Abb. 9). Die Färbung des Stromas wird — gegen die corneosklerale Grenze fortschreitend — allmählich weniger homogen. Dies setzt sich auch auf der Sklera fort, wo sich der interfibrilläre Bestand mit PAS färbt (Abb. 10).

ad 2. *Hyaluronidaseverdauung*:

a) *Silberimpregnation*: Mit den Kontrollschnitten verglichen das Impregnationsbild zeigt keine wesentliche Veränderung. Im 12—14tägigen Stadium erscheint unverändert die braune Impregnation (Abb. 1—2).

b) Mit *Toluidinblaufärbung* ist keine Metachromasie zu beobachten.

c) Mit der *Ritter—Olesonschen Färbung* ist die PAS-Positivität des Stroma dieselbe, wie im Verlauf der normalen Entwicklung, d. h. vom 10. Tag an erhöht sich die Färbungsintensität ständig und erscheint im 16—18tägigen Stadium in ihrer äußersten Stärke. Ein ähnliches Bild ist auch an der corneoskleralen Grenze zu beobachten.

ad 3. *Trypsinverdauung*:

a) *Silberimpregnation*: Das Bild hat sich im Vergleich zu den Kontrollschnitten einigermaßen verändert. Das Zustandekommen des für das Kollagen charakteristischen Impregnationsbildes beginnt am 13. Entwicklungstag (Abb. 3). In den letzten Entwicklungstagen (vom 18tägigen Stadium an) ist auch die auf dem Gebiet des Stromas fleckig in Erscheinung tretende Argyrophilie zu beobachten (Abb. 4).

b) Die mit *Toluidinblau* gefärbten Schnitten zeigten in keinem einzigen Fall Metachromasie (Abb. 11).

c) Mit *Ritter—Olesonscher Färbung* beginnt die PAS-Positivität des Stromas am 8—10. Entwicklungstag und erreicht im 16—18tägigen Stadium die äußerste Intensität. Die Färbung erwies sich jedoch im Vergleich zu den Kontrollschnitten als wesentlich schwächer (Abb. 12).

ad 4. *Pankreasmukoseverdauung*:

a) *Silberimprägnation*: Im Vergleich zu den vorherigen ist eine bedeutende Veränderung zu beobachten. Im 8—10tägigen Entwicklungsstadium kam eine solche lytische Wirkung zustande, daß das Bild der Strukturen fast vollkommen verschwommen war. Auf der Oberfläche einiger intakt gebliebener Fibrillen ist die Ausfällung sehr feiner, schwarzer Körnchen zu beobachten. Vom 13tägigen Stadium an ist die Verdauung schwächer, die Fasern weisen eine regelmäßige, in Bündeln angeordnete Struktur auf. Nach der Verdauung blieb das Erscheinen des sonst am 10. Tag auftretenden braunen Impregnationsbildes aus und die Tunica propria der Cornea blieb durchwegs argyrophil (Abb. 5—6). Die corneosklerale Grenze wies ein ähnliches Bild auf.

b) Auf den mit *Toluidinblau* gefärbten Präparaten ist keine Metachromasie zu beobachten (Abb. 13).

c) Mit *Ritter—Olesonscher Färbung* ist ebenfalls eine bedeutende Ver-

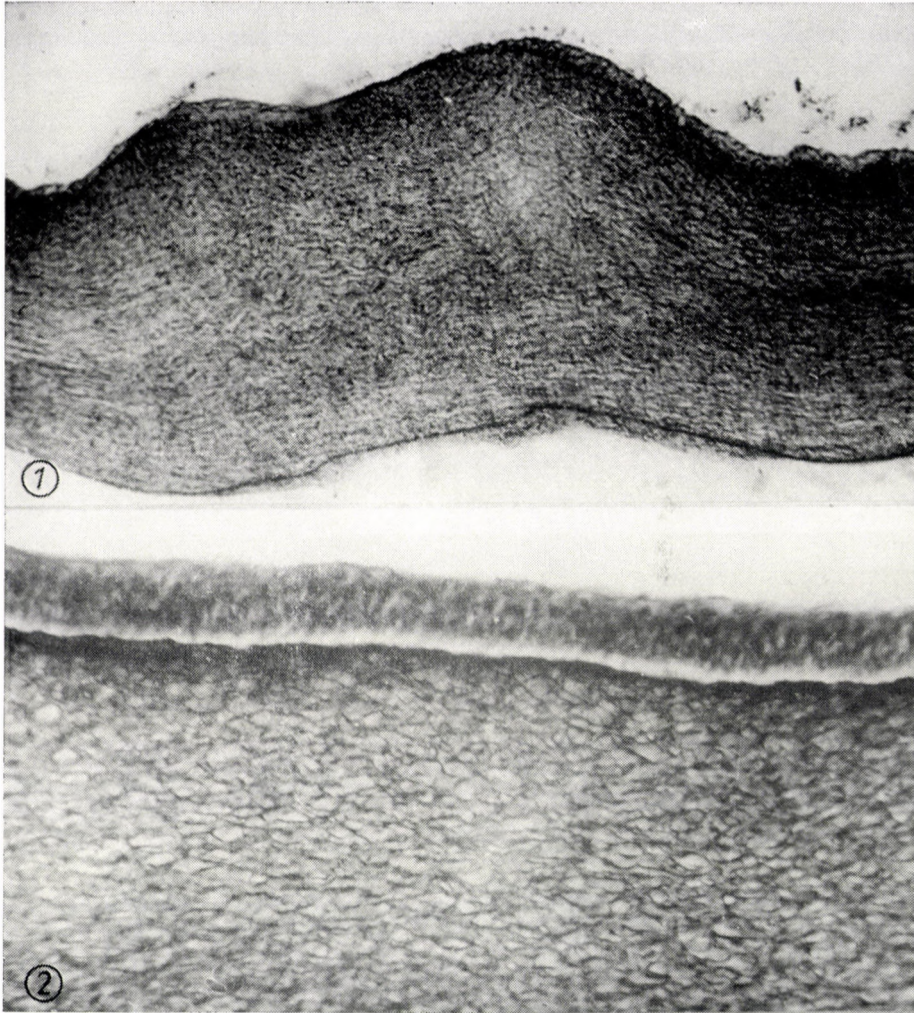
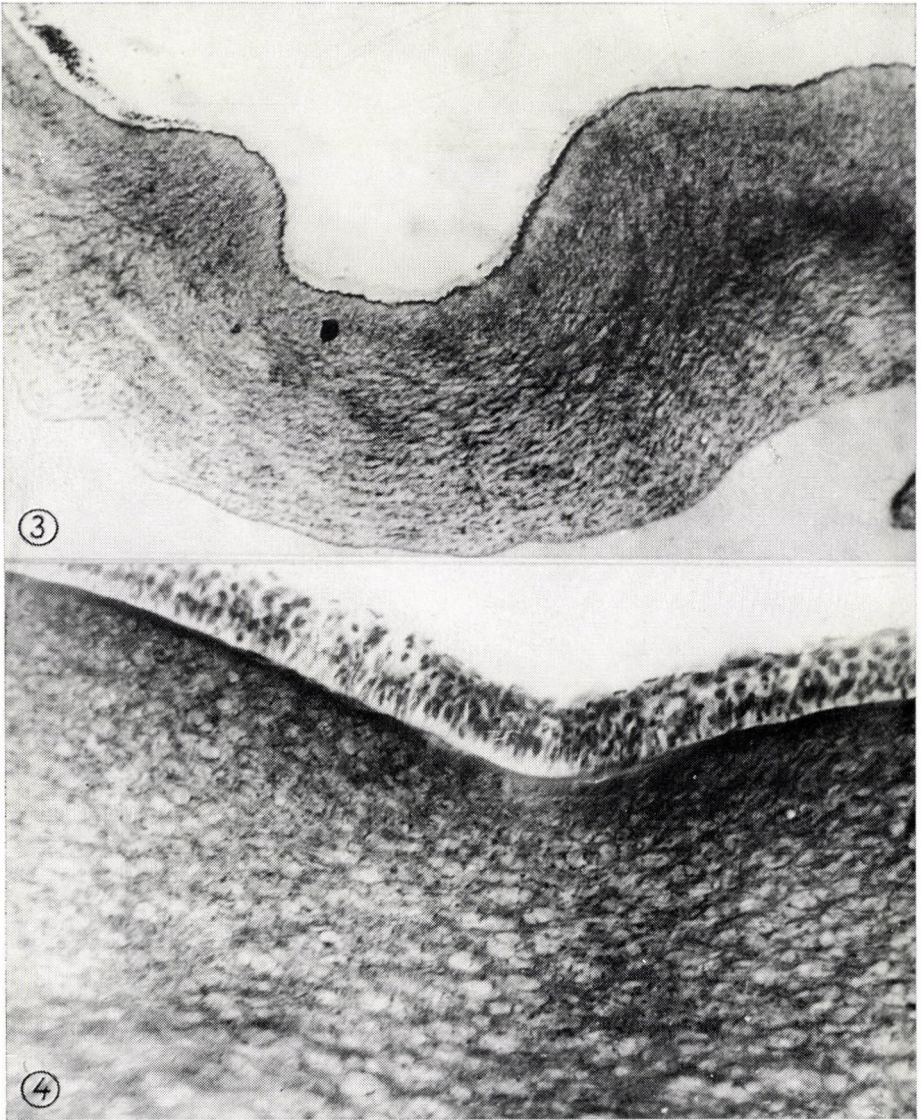


Abb. 1. 13tägiges Entwicklungsstadium, 120 $\times$ . Hyaluronidaseverdauung, Versilberung. Die Verdauung verursachte in der Fibrillenstruktur des Stromas keine wesentliche Veränderung  
 Abb. 2. 18tägiges Entwicklungsstadium, 240 $\times$ . Hyaluronidaseverdauung, Versilberung. Die Faserstruktur wurde von der Verdauung nicht beeinflusst, braune Impregnation des Stromas



*Abb. 3.* 13tägiges Entwicklungsstadium, 120 $\times$ . Trypsinverdauung, Versilberung. Das Trypsin verursachte keine wesentliche Veränderung der Faserstruktur

*Abb. 4.* 18tägiges Entwicklungsstadium, 240 $\times$ . Trypsinverdauung, Versilberung. Das Fasersystem des Stromas weist auch nach der Verdauung braune Imprägnation auf



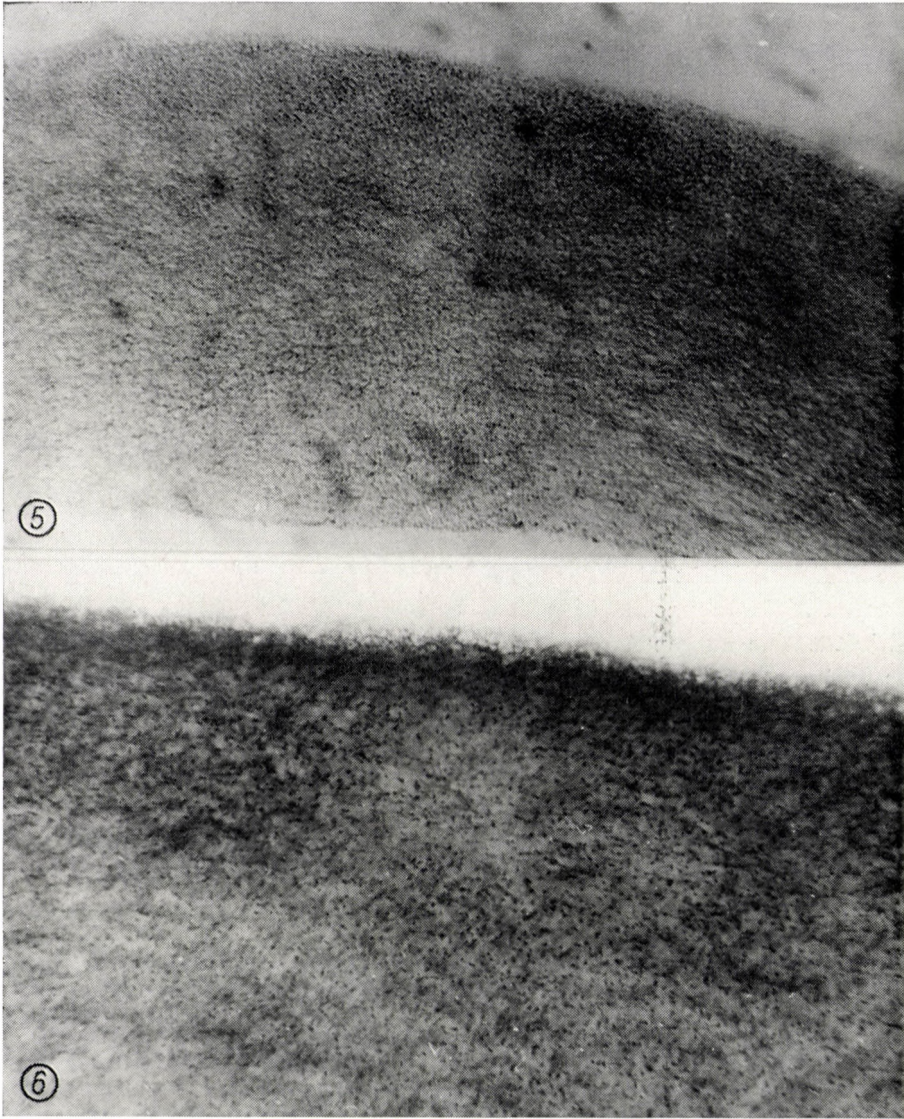


Abb. 5. 10tägiges Entwicklungsstadium, 240 $\times$ . Pankreasmukaseverdauung, Versilberung. Starke lytische Wirkung, auf der Faseroberfläche feine schwarze Granulation

Abb. 6. 18tägiges Entwicklungsstadium, 240 $\times$ . Pankreasmukaseverdauung, Versilberung. Infolge der Enzymbehandlung blieb das Erscheinen des braunen Imprägnationsbildes aus

änderung zu beobachten. Die Tunica propria weist von Anfang an kräftige Hale-Positivität auf. Es ist keine PAS-Positivität zu beobachten (Abb. 14), auch an der corneoskleralen Grenze nicht.

ad 5. *Gewebeextraktion* :

Im 4—8tägigen Stadium konnte kein brauchbares Material extrahiert werden. Die Veränderung beginnt am 10., 12., 14. Tag. Von da an gelang es uns immer besser verwendbares Material zu isolieren, bei welchem die verschiedenen Reaktionen bereits ausgeführt werden könnten. Die auf diese Weise hergestellten Präparate wiesen eine Metachromasie auf, deren Intensität sich mit der Zahl der Entwicklungstage parallel erhöhte. Die Ritter—Olesonsche Technik erbrachte kein einheitliches Bild. In jener Fraktion, in welcher nach der Originalbeschreibung die neutralen Mukopolysacchariden hätten zugegen sein müssen, erhielten wir gemischte Färbung, mit überwiegender Hale-Positivität. Nur in den äußersten Zonen der Präparate war rosa Färbung zu beobachten, deren Intensität jedoch stark hinter der bei der Gewebefärbung erzielten zurückblieb.

Von den 18—20tägigen Stadien an war die PAS-Positivität bereits stärker. In der die sauren Mukopolysacchariden darstellenden Fraktion war keine PAS-Positivität zu beobachten, hingegen konnte in dem die sogenannten neutralen Mukopolysacchariden enthaltenden Extrakt nebst schwacher PAS-Positivität eine ausgeprägte Hale-Positivität wahrgenommen werden. Sämtliche Präparate wiesen intensive Metachromasie auf.

*Methylenblau-Extinktion* : Wir erhielten auch bei unter pH 4 vorgenommener Hyaluronidase-, Trypsin-, und Pankreamukase Verdauung positive Reaktionen, was darauf hinweist, daß bei den Komponenten des Bindematerials auch die sauren Mukopolysacchariden eine bedeutende Rolle spielen. Für diese Auffassung spricht auch die nach Hyaluronidaseverdauung ausbleibende Metachromasie.

### Besprechung

Um die Eigenschaften des interfibrillär lokalisierten Bindematerials genauer erkennen zu können, wandten wir die Ritter—Olesonsche Doppelfärbung an, die eine simultane Darstellung der sauren und neutralen Mukopolysacchariden ermöglicht. In unserem Untersuchungsmaterial ergab die Tunica propria der Cornea vom 7. Tag der embryonalen Entwicklung PAS-Positivität. Die mit der PAS-Methode nachweisbare quantitative Vermehrung des Bindematerials wurde vom Stadium des 13. Entwicklungstages an intensiver. Im Stroma der vollständig entwickelten Cornea konnte fast ausschließlich PAS-positives Material nachgewiesen werden.

Die Erscheinung bzw. die Anhäufung des PAS-positiven Materials fällt zeitlich (7—14 Tag) mit dem Verschwinden der Argyrophilie des Stromas und



Abb. 7. 8tägiges Entwicklungsstadium, 120 $\times$ . Corneosklerale Grenze, Ritter-Olesonsche Färbung. Beginnende PAS-Positivität des Stromas

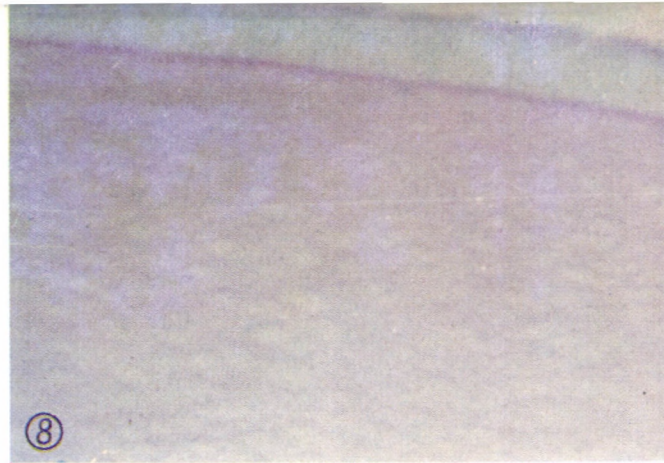


Abb. 8. 15tägiges Entwicklungsstadium, 240 $\times$ . Ritter-Olesonsche Färbung. Starke PAS-Positivität des Stromas

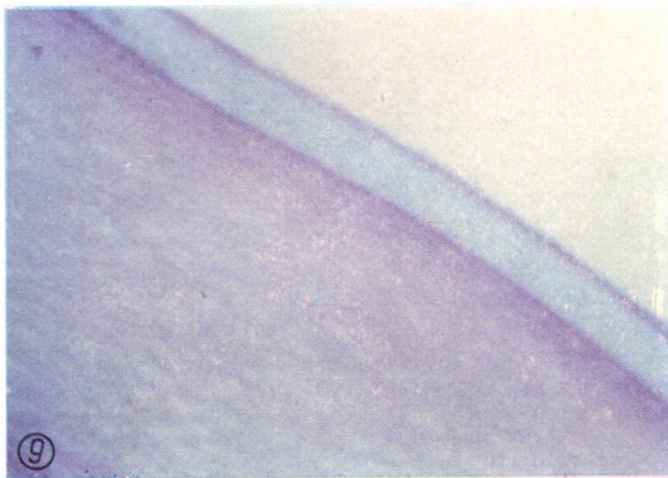


Abb. 9. 20tägiges Entwicklungsstadium, 240 $\times$ . Ritter-Olesonsche Färbung. Die Tunica propria weist intensive PAS-Positivität auf

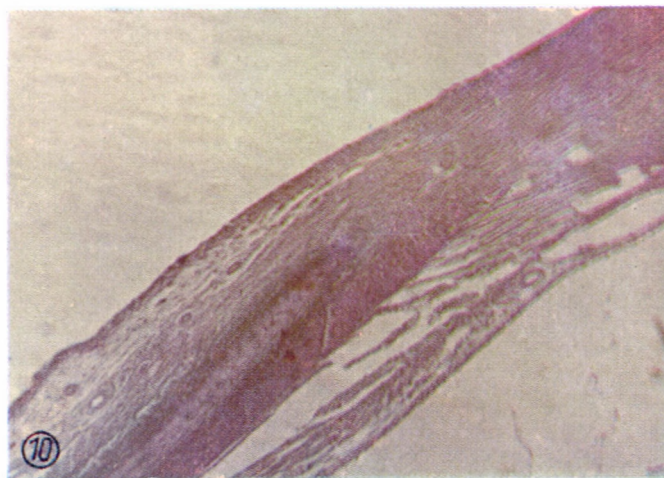


Abb. 10. 20tägiges Entwicklungsstadium, 120 $\times$ . Corneosklerale Grenze, Ritter-Olesonsche Färbung. Die Kapsel der Knorpelzellen weist Hale-Positivität der Zwischenbestand und das Perichondrium PAS-Positivität auf



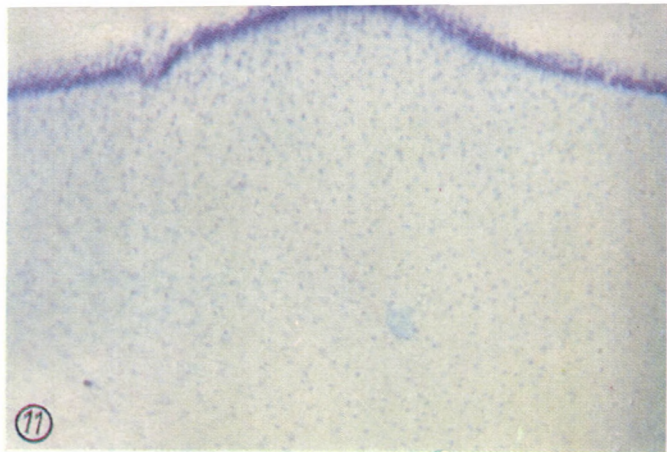


Abb. 11. 20tägiges Entwicklungsstadium, 240 $\times$ . Trypsinverdauung, Toluidinblau-Färbung. Keine Metachromasie

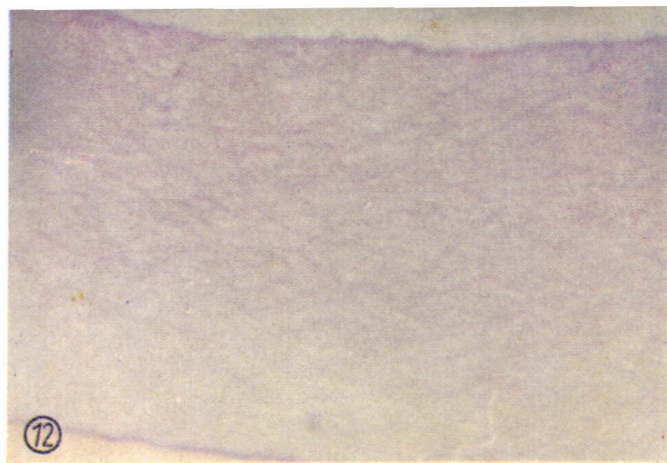


Abb. 12. 20tägiges Entwicklungsstadium, 120 $\times$ . Ritter-Olesonsche Färbung. Das Stroma ist PAS positiv, die Intensität der Färbung ist jedoch im Verhältnis zur Kontrolle schwächer

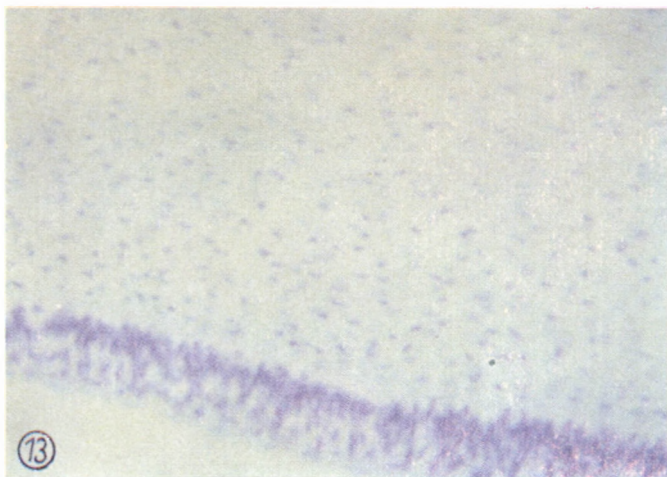


Abb. 13. 20tägiges Entwicklungsstadium, 240 $\times$ . Pankreas-mukaseverdauung, Toluidinblau-Färbung. Die Verdauung verhindert das Zustandekommen der Metachromasie

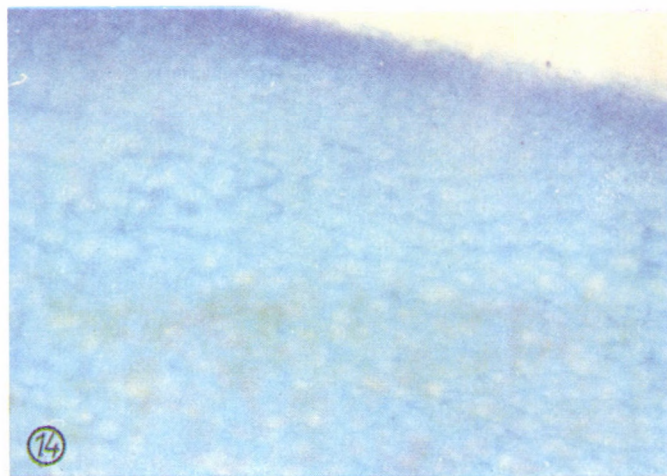
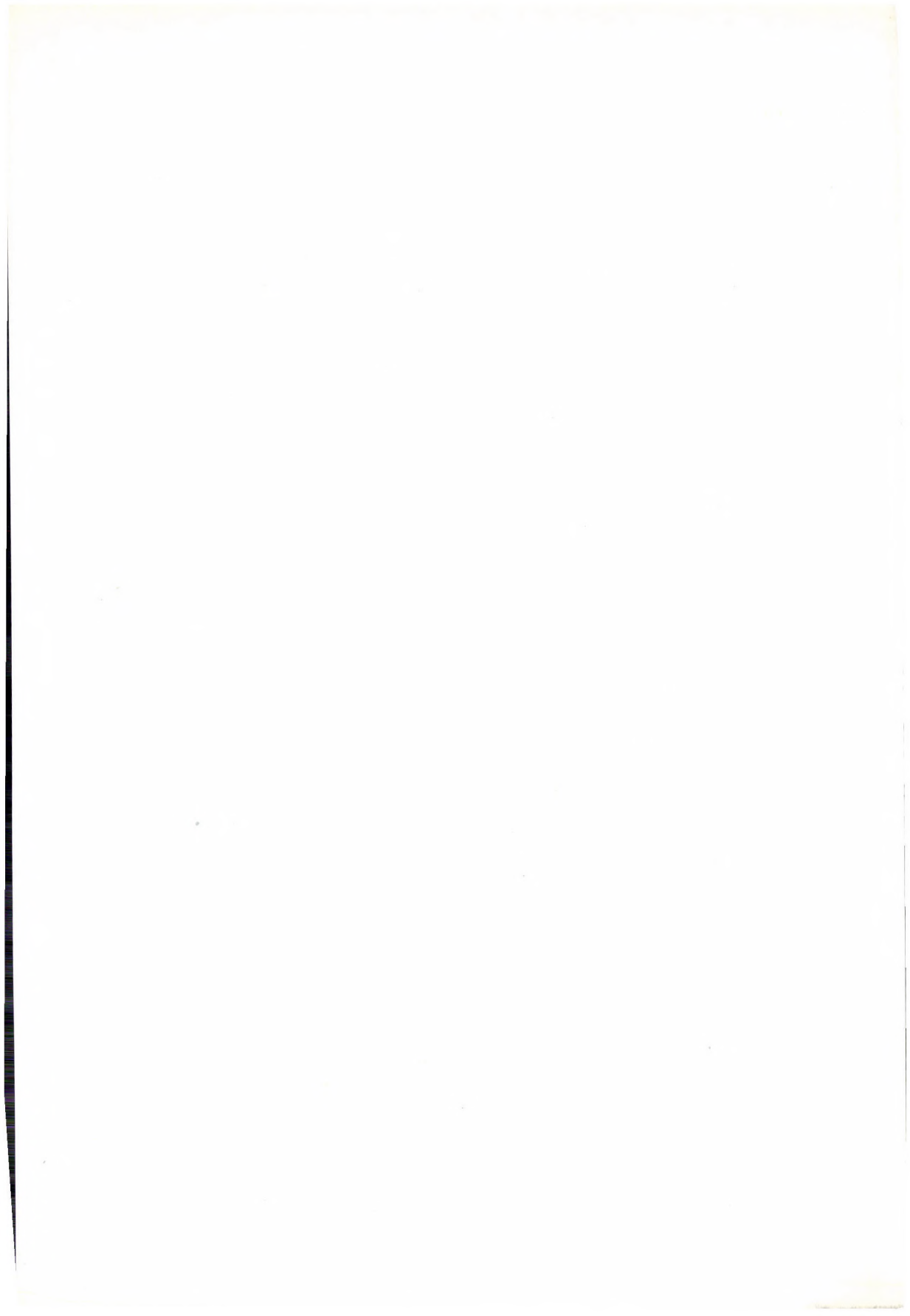


Abb. 14. 20tägiges Entwicklungsstadium, 250 $\times$ . Pankreas-mukaseverdauung, Ritter-Olesonsche Färbung. Nach der Verdauung bleibt die PAS-Positivität aus



dem Auftreten der Metachromasie zusammen. Um die Eigenschaften des Bindematerials genauer zu erforschen, wurde die Bradensche [13] Gewebeextraktion vorgenommen. Der Originalbeschreibung nach können zwei Fraktionen isoliert werden. Als Resultat ergab sich, daß das Erscheinen der PAS-positiven Substanz in der sogenannten neutralen Fraktion und das Auftreten der PAS-Positivität koinzidieren.

Selbstverständlich müssen die mit der Extraktion erzielten Resultate vorsichtig gewertet werden, weil es sich hier letzten Endes um die Herstellung eines kaseinhaltigen Präparates handelt, das den Wert histochemischer Reaktionen in großem Maß beeinflussen kann. Diese Methode läßt sich demnach nicht zu exakten Schlüssen, sondern nur zu Ergänzungszwecken verwenden.

Im Gegensatz zu den Befunden von IRVING und TOMLIN [21] spielen nach unseren Beobachtungen beim Zustandekommen des Versilberungsbildes die mit Hyaluronidase verdaubaren Komponenten des Bindematerials keine Rolle. Tatsache ist, daß nach der Hyaluronidaseverdauung die Nachweisbarkeit der PAS-positiven Stoffe unverändert und keine Metachromasie zu beobachten ist. In Übereinstimmung mit den Erfahrungen von ROBB-SMITH [40] wurde das Zustandekommen des Impregnationsbildes durch Trypsinverdauung nicht wesentlich beeinflußt, nur die Intensität der PAS-Färbung wurde vermindert. Nach Anwendung von Pankreasmukase (Kollagenmukoproteinasen + Elastomukoproteinasen-Komplex) blieb die Umwandlung zum Kollagen demonstrierende Erscheinung des braunen Impregnationsbildes und auch das Auftreten des PAS-positiven Stoffes aus. Diese Resultate weisen darauf hin, daß im Bindematerial der embryonalen Cornea nebst den sauren Mukopolysacchariden auch eine Komponente zugegen ist, die von der Pankreasmukase angegriffen werden kann. Unsere diesbezügliche Beobachtung bestätigt die von BANGA und BALÓ [8] erzielten Resultate, laut welchen der von der Pankreasmukase verdaubare Stoff der Stabilisationsfaktor der kollagenen Fasern ist, ohne dem keine Faserbildung zustandekommt. Im Verlauf unserer Untersuchungen konnte demnach festgestellt werden, daß bei der Umwandlung des Fasersystems des Stromas in Kollagen das Bindematerial eine bedeutende Rolle spielt. Auf Grund unserer Befunde können wir die Ansicht von WOODIN [50] und SZECHY [42] bestätigen, wonach die Mukopolysacchariden der Cornea an Eiweiß gebunden sind. Diese unsere Ansicht wird durch den Umstand bekräftigt, daß nach Trypsinverdauung die Metachromasie des Stromas ausbleibt, was bedeutet, daß im Protein-Mukopolysacchariden-Komplex die Protein-Gruppe bzw. die zwischen den beiden Stoffen bestehende Verbindung bei dem Prozeß eine bedeutende Rolle spielt. Als Erklärung der nach Pankreasmukosaverdauung ausbleibenden Metachromasie führen wir an, daß in diesem Fall entweder der vorher erwähnte Mechanismus eine Rolle spielt, oder die Auslösung eines anderen Stoffes nicht saurer Natur zustandekommt.

## Zusammenfassung

Im Verlauf der Hornhautentwicklung des Hühnerembryos wurde beobachtet, daß die Umwandlung des argyrophilen zum kollagenen Stadium und die Metachromasie sowie die Erscheinung bzw. Anhäufung der PAS-positiven Stoffe koinzidieren. Durch Hyaluronidaseverdauung wurde weder das Impregnationsbild, noch die Nachweisbarkeit der PAS-positiven Stoffe beeinflußt. Das nach Trypsinverdauung erhaltene Bild stimmt im wesentlichen mit dem vorherigen überein, mit dem Unterschied, daß die PAS-Positivität des Stromas etwas schwächer wurde. Nach Verdauung mit BANGA—BALÓscher Pankreasmukase (Kollagenmukoproteina-se + Elastomukoproteina-se) gibt es keine Metachromasie, auch das Ercheinen des PAS-positiven Stoffes ist nicht zu beobachten und das Stroma bleibt durchwegs argyrophil. Es wird gefolgert, daß das Bindematerial — dessen eine Komponente durch obiges Enzym beeinflussbar ist — bei der Umwandlung zum Kollagen eine wichtige Rolle spielt.

## LITERATUR

1. ASTHBURG, zit. LENGYEL, J.: (1960) *Bőrgyógy. vener. Szle* (Budapest) 2, 84. —
2. AUREL, G., HOLMGREN, H.: (1953) *Acta ophthal.* (Kbh.) 31, 1. — 3. BALÓ, J., BANGA, I.: (1961) *Orvosképzés* 3, 161. — 4. BANGA I.: (1955) *Habilitationsschrift*, Budapest. — 5. BANGA, I., BALÓ J.: (1956) *Nature* (London), 178, 310. — 6. BANGA I.: (1960) *Acta morph. hung. Suppl.* 8, 8. — 7. BANGA I.: (1960) *Bőrgyógy. vener. Szle* (Budapest). 2—3, 120. — 8. BANGA I., BALÓ J.: (1960) *Biochem. J.* 74, 388. — 9. BEAR, R. S.: (1951) *J. Amer. Leath. Chem. Ass.* 46, 438. — 10. BECKER, B., FRIEDENWALD, F. S.: (1950) *Amer. J. Ophthal.* 33, 673. — 11. BERENSON, S. G., LUMPKIN, M. W., SHIPP, W. G.: (1958) *Anat. Rec.* 132, 585. — 12. BRADEN, A. W. H.: (1952) *Amer. sci. Res.* 5, 460. — 13. BRADEN, A. W. H.: (1955) *Stain Technol.* 30, 19. — 14. DAVSON, H.: (1940) *The Physiology of the Eye*. Blakiston, Philadelphia. — 15. DAY, R.: (1950) *Amer. J. Ophthal.* 33, 224. — 16. DISCHE, Z., DANILCZENKO, A., ZELMEINS, G.: (1958) *Ciba Foundation Symp. on Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides*. Churchill, London, P. 116. — 17. DOHLMAN, C. H.: (1947) *On the Metabolism of the Corneal Graft*. *Acta ophthal.* (Kbh.) 35, 303. — 18. GROSSFELD, H., MEYER, K., GODMAN, C.: (1955) *Anat. Rec.* 121, 471. — 19. HALE, C. W.: (1946) *Nature*, (Lond.) 157, 802. — 20. HOTCHKISS, R. D.: (1948) *Arch. Biochem.* 16, 131. — 21. IRVING, E., TOMLIN, G.: (1954) *Collagen, Reticulin and their Argyrophilic Properties*. *Proc. Roy. Soc. Biol. Sc.* 142, 113. — 22. JEANLOZ, R., FORSCHIELLI, A.: (1951) *J. biol. Chem.* 190, 537. — 23. JORPES, E., WERNER, B., ABERG, B.: (1948) *J. biol. Chem.* 176, 277. — 24. KARMAZSIN L.: (1961) *Acta morph. hung.* (Acad. Sci. 2—4, 237.) — 25. KINSEY, V. E.: (1951) *Arch. Ophthal.* 46, 441. — 26. KLING, D. H., CAMERON, G.: (1955) *Anat. Rec.* 121, 472. — 27. KRAUSE, A. C.: (1932) *Amer. J. Ophthal.* 15, 422. — 28. KUHLMAN, E. R., RESNIK, R. A.: (1958) *Amer. J. Ophthal.* 45, 296. — 29. LENGYEL J.: (1960) *Bőrgyógy. vener. Szle*, (Budapest) 2—3, 84. — 30. LIPP, W.: (1955) *Histochemische Methoden*, Bd. VII. Oldenburg, München. — 31. MCMANUS, J. A.: (1946) *Nature*, (Lond.) 159, 202. — 32. MCMANUS, J. A., CASON, J. E.: (1951) zit. *Pears, Histochemistry*. Churchill, London 1954. — 33. MEYER, K., ODIER, M. E., SIGFRIST, A. E.: (1948) *Helv. chim. Acta* 31, 1400. — 34. MEYER, K., FELLIG, K.: (1950) *Experientia*, (Basel) 6, 186. — 35. MEYER, K., LINKER, A., DAVIDSON, E. A., WEISMAN, B.: (1953) *J. biol. Chem.* 205, 611. — 36. MEYER, K., RAHILLY, D. R.: (1959) *J. Embryol. exp. Morph.* 7, 303. — 37. PAU, zit. SZEGHY: (1957) *Szemészet*, (Budapest) 2, 64. — 38. PEARSE, A. G. E.: (1954) *Histochemistry*. Churchill, London. — 39. RITTER, H. B., OLESON, J. J.: *Amer. J. Pathol.* 26, 639. — 40. ROBB-SMITH, A. H. T.: (1952) *Trans. Josiah Macy Conf. Connective Tissue.* 3, 92. — 41. ROMHÁNYI GY.: (1959) *Acta morph. hung. Suppl.* 8, 23. — 42. SZEGHY B.: (1957) *Szemészet*, (Budapest) 2, 64. — 43. TALLMAN, E., HARRIS, J. E., GRUBER, L.: (1948) *Amer. J. Ophthal.* 45, 721. — 44. THOMAS, CH. I.: (1955) *The Cornea*. Thomas, Springfield. — 45. WALLBECK, K., NEUMANN, H.: (1951) *Arch. Ophthal.* 46, 482. — 46. WINDRUM, G. M., KENT, P. W. EASTOE, J. E.: (1955) *Brit. J. exp. Path.* 36, 49. — 47. WINKELMANN, J. E.: (1950) *Ophthalmology*, 119, 336. — 48. WINKELMANN, J. E.: (1951) *Ophthalmology*, 54, 3. — 49. WISLOCKI, G. B.: (1952) *Amer. J. Anat.* 91, 233. — 50. WOODIN, A. H.: (1950) *J. Biochem.* 47, 3.



ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА ЭМБРИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ ВОЛОКОН  
ГИСТОХИМИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Л. КАРМАЖИН

В процессе развития роговицы зародышей цыплят превращение аргирофильной стадии в коллагенную — по исследованиям автора — совпадает с началом метахроматического окрашивания и появлением или размножением ПАСК-положительных веществ. Гиалуронидазное переваривание не влияет ни на картину пропитки, ни на выявляемость ПАСК-положительных веществ. Картина, полученная после трипсинового переваривания по существу сходная с предыдущей, с той лишь разницей, что ПАСК-положительность стромы несколько слабее. В случае применения полученного *Банга*—*Бало* комплекса муказного фермента поджелудочной железы (коллагенмукопротеиназа + эластомукопротеиназа) не наблюдается ни метахромазии, ни появления ПАСК-положительных веществ, и строма до конца остается аргирофильной. Автор на основании своих опытов приходит к тому заключению, что в превращении в коллаген важнейшую роль играет склеивающее вещество, один компонент которого поддается воздействию вышеуказанного фермента.

## HISTOCHEMICAL STUDY OF FIBROGENESIS IN CHICKEN EMBRYOS

L. KARMAZSIN

The development of the cornea in the chicken reaches a stage at which the argyrophilic state changes into collagen, and it is claimed that this transformation coincides with the rise of metachromasia and the appearance and accumulation of substances giving positive periodic Schiff reaction. Digestion with hyaluronidase did not affect either impregnation or the demonstrability of the PAS-positive substances. Digestion with trypsin yielded essentially similar results, with the difference that the PAS-positivity of the stroma seemed to have weakened. After the application of mucase there was no metachromasia, and there appeared no PAS-positive matter, and the stroma remained argyrophilic. The binding substance, a component of which can be influenced by mucase, is suggested to play a decisive part in collagenous transformation.

Dr. László KARMAZSIN: Debrecen 12, Orvostudományi Egyetem Anatómiai Szövet- és Fejlődéstani Intézete, Ungarn