

Histochemische Beobachtungen über die hyaline Grundsubstanz des Trachealknorpels.

Von

Carl Th. Mörner (in Upsala).

(Der Redaction zugegangen am 20. März 1888.)

Bezüglich der chemischen Natur der Knorpelgrundsubstanz haben verschiedene Ansichten einander ziemlich rasch abgelöst. Der älteren Auffassung gemäss sollte die Grundsubstanz aus einer in chemischer Hinsicht selbstständigen Substanz bestehen, die man wegen ihrer Fähigkeit, bei Erhitzung mit Wasser in eine lösliche Modification — Chondrin — überzugehen, Chondrogen nannte. Den hierbei stattfindenden Process betrachtete man als ein Analogon der Umwandlung des Collagens in Glutin bei einer ähnlichen Behandlung. Aus mehreren neueren Untersuchungen geht es indessen hervor, dass die Grundsubstanz des Knorpels keine einheitliche Verbindung darstellt, sondern vielmehr aus einem Gemenge zweier verschiedenen Stoffe gebildet wird. **Morochowetz**¹⁾, **Krukenberg**²⁾ und **Landwehr**³⁾ haben übereinstimmend das Collagen als die eine dieser zwei Componenten aufgeführt und überzeugende Beweise hierfür geliefert. Hinsichtlich der zweiten Substanz sind dagegen die Arbeiten dieser Forscher weniger eingehend gewesen und die Versuchsergebnisse gehen auch ziemlich aus einander. In der besonderen Absicht, diesen zweiten, bis jetzt wenig stu-

1) Verhandlungen des Naturhist.-Med. Vereins zu Heidelberg. I. Bd., 5. Heft.

2) Sitzungsberichte der Würzburger physik.-med. Gesellschaft. 1884.

3) Archiv f. d. ges. Phys., Bd. XXXIX.

dirten Bestandtheil der Knorpelgrundsubstanz kennen zu lernen, habe ich auf Initiative von Professor Hammarsten den Trachealknorpel zum Gegenstand einer Untersuchung gemacht. Obgleich diese letztere noch nicht abgeschlossen ist, möchte es mir doch gestattet sein, schon jetzt einen kleineren Theil davon zu veröffentlichen, da dieser Theil, welcher eben so viel das histologische wie das chemische Gebiet berührt, eine mehr selbstständige Stellung einnimmt.

Ich habe nicht nur bestätigen können, dass der fragliche Knorpel aus mindestens zwei verschiedenen Substanzen besteht, sondern ich habe auch gefunden, dass diese Stoffe kein gleichmässiges Gemenge darstellen, sondern morphologisch verschiedene Theile der Grundsubstanz einnehmen. Zu dieser Beobachtung wurde ich auf folgende Weise geführt.

Von der wohlbekannten Thatsache ausgehend, dass Substanzen verschiedener chemischer Natur ein differentes Verhalten Farbstoffen gegenüber darzubieten pflegen, habe ich es vorgenommen, das Verhalten microscopischer Knorpelschnitte gegen mehrere Farbstoffe zu prüfen. Von den geprüften Farbstoffen giebt es nun einige wenige, welche ein ganz besonders interessantes Verhalten dem Trachealknorpel gegenüber gezeigt haben, und diese Farbstoffe sind: Indigoblau, Tropäolin, Methylviolett und Anilinroth; ferner Eisenchlorid mit gelbem Blutlaugensalz. Werden dünne Knorpelschnitte in passend zubereitete Lösungen dieser Stoffe eingetragen und dann weiter (siehe unten) behandelt, so bietet die Grundsubstanz bei microscopischer Betrachtung nicht eine gleichmässige Färbung dar. Bald sind nämlich diejenigen Partien, welche die Zellengruppen einschliessen, gefärbt und die übrige Substanz farblos (Methylviolett, Anilinroth, Eisenchlorid mit gelbem Blutlaugensalz), bald wiederum sind die Umgebungen der Zellengruppen farblos, die übrige Grundsubstanz dagegen gefärbt (Indigoblau, Tropäolin). Combinirt man die Wirkung zweier Farbstoffe, so können die beiden Partien der Knorpelsubstanz, eine jede mit ihrer besonderen Farbe, sichtlich gemacht werden. Es treten an solchen Präparaten nicht nur die verschieden gefärbten Partien im Ganzen

deutlich hervor, sondern es sind auch die Grenzlinien zwischen ihnen scharf markirt. Um ein besseres Verständniss von der Vertheilung dieser zwei, morphologisch wie chemisch zu unterscheidenden Hauptbestandtheile der Grundsubstanz, wie auch von ihrer Form und Natur zu ermöglichen, will ich hier zuerst dasjenige, was man an einem, mit Tropäolin und Methylviolett doppelgefärbten, in Canadabalsam aufbewahrten Schnitte eines Trachealknorpels beobachten kann, mittheilen.

Mit unbewaffnetem Auge wird man Folgendes gewahr. Das Perichondrium, wenn es im Schnitte mit vorkommt, erscheint als ein stark gelbgefärbter Saum; dieselbe Farbe besitzt auch eine schmale, innerhalb des Perichondrium befindliche Zone, welche von der äussersten Schicht des Knorpelgewebes gebildet wird und vom Perichondrium einstrahlende Bindegewebefibrillen oft enthält. Endlich bemerkt man auch gewöhnlich im centralen Theile des Schnittes einen oder mehrere gelbgefärbte Flecke, Querschnitte hohler, gefässähnlicher Bindegewebestränge, die im Knorpelgewebe spärlich vorkommen und sämmtliche an der convexen (äusseren) Fläche des Trachealringes ausmünden. Sonst scheint die Grundsubstanz eine gleichmässig roth-violette Farbe zu besitzen. Hält man das Präparat gegen das Licht, so wird man doch ein eigenthümliches Schillern gewahr, welches schon die erst bei microscopischer Untersuchung deutlich hervortretende, heterogene Färbung ahnen lässt.

Bei Untersuchung mit dem Microscope — und dabei ist keine stärkere Vergrösserung nöthig, Objectiv No. 2 oder No. 3 Hartnack's sind hinreichend — sieht man die Grundsubstanz aus einem gelbgefärbten Balkennetze, in welchem mehrere, die Maschen desselben ausfüllende, blaugefärbte Felder zu sehen sind, bestehen.

Das gelbgefärbte Balkennetz steht mit den drei oben genannten Partien gelber Farbe, nämlich dem Perichondrium, der peripheren Zone des Knorpelringes und den Querschnitten der gefässähnlichen Bindegewebestränge in continirlicher Verbindung. Das Balkennetz berührt nirgends die

Knorpelzellen und in seinen Balken ist keine einzige Zelle wahrzunehmen. Die letzteren sind ausschliesslich zu den, die Maschen ausfüllenden Feldern verweist. Schon aus dem Umstande, dass das Balkennetz der Grundsubstanz mit jenen Bildungen, welche aus Collagen factisch bestehen, dieselbe Farbe gemeinsam hat und in sie continuirlich übergeht, muss man geneigt sein, das Balkennetz auch für eine collagene Bildung zu halten. Diese nahe zur Hand liegende Vermuthung wird auch durch die chemische Analyse bestätigt. Vermittelst einer unten zu beschreibenden Methode ist es mir nämlich gelungen, das Balkennetz isolirt darzustellen: und die durch Erhitzen eines solchen Präparates im Papin'schen Topfe erhaltene Lösung giebt alle Reactionen des Glutins, während sie von keinem der eine gewöhnliche Knorpelleimlösung (s. g. Chondrinlösung) fällenden Reagentien die geringste Fällung oder Trübung erfährt. Das Balkennetz besteht also aus demjenigen Collagen, dessen Anwesenheit im Knorpel M. Schultze¹⁾, Morochowetz, Krukenberg und Landwehr gezeigt haben.

Die blaugefärbten, die Maschen des Balkennetzes ausfüllenden Felder stellen die optischen Querschnitte rundlicher Bildungen dar, welche in ihrer einfachsten Gestalt kugelig oder eiförmig sind²⁾. Wenn aber, was oft der Fall ist, eine grössere oder kleinere Anzahl dieser Bildungen mit einander zusammenhängen, entstehen hieraus complicirtere, sehr unregelmässige Formen, in deren Contouren sichte Einschnürungen die Grenzen der einzelnen Chondrinballen andeuten. Die einfachste Form der Chondrinballen

1) Annal. d. Chem. u. Pharm., Bd. 71, S. 275.

2) Der Kürze wegen werden sie im Folgenden «Chondrinballen» genannt. Sie stimmen im Allgemeinen mit den s. g. «Knorpelkapseln» überein, haben jedoch sowohl peripherisch als central einen grösseren Umfang, als die entsprechenden Knorpelkapseln. Ein Chondrinball streckt sich nämlich in peripherer Richtung ein wenig weiter, als die entsprechende Knorpelkapsel es angiebt; im centralen Theile schliesst er auch die Brücken oder Bälkchen, welche die einzelnen Zellen der innerhalb einer Knorpelkapsel befindlichen Zellgruppe von einander trennen, in sich ein.

beträgt bis etwa 0,1 mm. im Diameter. In den Chondrinballen haben die Knorpelzellen ausschliesslich ihren Sitz: jeder einfache Chondrinball beherbergt eine Zellengruppe; die complicirteren Formen schliessen stets mehrere Zellengruppen ein. Dass die Substanz dieser Chondrinballen von derjenigen des Balkennetzes (Collagen) chemisch verschieden sein muss, geht einerseits aus ihrem, Farbstoffen gegenüber sehr differenten Verhalten und anderseits noch deutlicher aus mehreren bei der chemischen Untersuchung gefundenen Thatsachen hervor. Da es nicht meine Absicht ist, in dieser kurzen Mittheilung auf chemische Details einzugehen, will ich nur vorläufig erwähnen, dass ich die Chondrinballen aus mindestens zwei, nicht nur vom Collagen verschiedenen, sondern auch unter einander differenten Substanzen bestehend gefunden habe. Nur ein einziges Experiment will ich zum Beweis der verschiedenen chemischen Natur des Balkennetzes und der Chondrinballen hier anführen, während ich die nähere Erklärung desselben erst in einer späteren Mittheilung im Zusammenhange mit dem chemischen Verhalten des Knorpels im Uebrigen besprechen werde. Werden äusserst dünne Schnitte des Trachealknorpels mit 0,1—0,2% Chlorwasserstoffsäure während etwa zwei Wochen bei 40° C. digerirt, so ist weder mit unbewaffnetem Auge, noch bei microscopischer Untersuchung irgend welche Veränderung zu sehen, mit Ausnahme davon, dass die Durchsichtigkeit ein wenig vermindert worden ist. Nach dem Auswaschen der Säure mit Wasser trägt man die Schnitte in schwache Kalilauge (0,1% Kalihydrat) hinein: man bemerkt dann, wie schon nach kurzer Einwirkung der Lauge sämtliche Chondrinballen vollständig aufgelöst worden sind, so dass nur leere Höhlen von der Form der Chondrinballen ihren früheren Platz anzeigen. Die Knorpelschnitte, welche ihre äussere Form anscheinend bewahrt haben, bestehen nunmehr nur aus dem Balkennetz (Collagen), wovon man sich leicht durch microscopische Untersuchung überzeugen kann. In der alkalischen Lösung der Chondrinballen erzeugen Säuren flockige Niederschläge, und die neutralisirte Lösung wird auch von mehreren Metallsalzen flockig gefällt:

diese Niederschläge bestehen aus den durch Digestion mit Chlorwasserstoffsäure veränderten und theilweise zersetzten Substanzen der Chondrinballen. Auch die Knorpelzellen findet man in der alkalischen Flüssigkeit frei herumschwimmend, da sie bei Auflösung der Chondrinballen ihre Lagerstätten verloren haben und so in Freiheit versetzt worden sind. Zu den Chondrinballen ist natürlich die zweite Substanz der Autoren (Mucin nach Morochowetz und v. Mering¹⁾; Hyalogen nach Krukenberg) zu verlegen. Nach dem nun Mitgetheilten will ich die zum Nachweis der histochemischen Struktur der Knorpelgrundsubstanz verwendeten Färbungsmethoden besprechen.

1. Färbung des Balkennetzes.

a) Die Knorpelschnitte werden in eine concentrirte Tropäolinlösung²⁾ von 2—3% (Tropäolin 000 No. 2 von Schuchardt) eingetragen. Nach $\frac{1}{2}$ —2 Stunden werden sie in Wasser ausgewaschen, bis das Balkennetz allein mit orangegelber Farbe hervortritt.

b) Zur Färbung wird eine concentrirte (4—5%) Lösung von einem Indigoextracte (von Gehe & Cie. erhalten, aus indigoschwefelsaurem Kali bestehend) verwendet. Einwirkungsdauer nur einige Minuten, übrigens wie a). Balkennetz blau.

2. Färbung der Chondrinballen.

a) Die Schnitte lässt man während $\frac{1}{2}$ —2 Minuten in einer Methylviolettlösung (0,15%) liegen. Nach Abspülung mit Wasser lässt man sie in Essigsäure (10%) verweilen, bis das zuerst auch gefärbte Balkennetz vollständig entfärbt wird. Die Chondrinballen blau.

b) Farbeflüssigkeit: eine Lösung von Anilinroth (0,15%). Behandlung dieselbe wie bei a). Die Chondrinballen roth.

c) Die Schnitte werden erst in eine schwache Eisenchloridlösung eingetaucht, dann nach sorgfältigem Auswaschen mit Wasser in eine sehr verdünnte Lösung von gelbem Blut-

¹⁾ Academ. Dissertation. Strassburg.

²⁾ Alle Farbstoffe werden als reine Wasserlösungen verwendet.

laugensalz eingetragen, wobei ausschliesslich die Chondrinballen von ausgefalltem Berlinerblau gefärbt werden. Diese Färbung rührt daher, dass die Bestandtheile der Chondrinballen mit dem Eisenchlorid in Wasser unlösliche Verbindungen eingehen und das Eisensalz also zurückhalten. Das Collagen des Balkennetzes verhält sich dagegen diesem Reagens gegenüber ganz indifferent und durch Auswaschen mit Wasser kann es also von dem Eisenchlorid leicht befreit werden.

3. Doppelfärbung.

a) Die Schnitte werden erst nach 1a) behandelt. Nach Auswaschen mit Wasser werden sie einige Secunden in Methylviolettlösung (0,15%) und dann in Essigsäure (10%) einige Minuten eingetaucht. Darauf folgt rasche Entwässerung mit Alkohol und Aufklärung der Schnitte in Nelkenöl. Balkennetz gelb, Chondrinballen blau.

b) Man behandelt die Schnitte erst nach 1b), dann nach 3a), doch mit dem Unterschied, dass statt einer Methylviolettlösung eine solche von Anilinroth (0,15%) angewendet wird. Balkennetz blau, Chondrinballen roth.

Beabsichtigt man die Präparate aufzubewahren, werden sie wie gewöhnlich nach Behandlung mit Alkohol und Nelkenöl in Canadabalsam eingelegt. Doppelgefärbte Schnitte soll man immer einer solchen Behandlung unterwerfen, weil die Bilder dann deutlicher hervortreten.

Ueber die histochemische Natur eines Gewebes pflegt ausser der Färbungsmethode auch die, auf der grösseren oder geringeren Resistenz verschiedener Substanzen gegen chemische Agentien begründete Macerationsmethode Aufschlüsse zu geben. Einige in dieser Richtung am Trachealknorpel angestellte Versuche bestätigen auch in vollem Masse die nach der ersteren Methode gefundenen Thatsachen. Durch abwechselndes kurzes Eintauchen dünner Knorpelschnitte in concentrirte Chromsäurelösung (1 Th. Chromsäure + 3 Th. Wasser) und Abspülen mit Wasser kann man Präparate erhalten, die sich unter dem Microscope als nur aus dem Balkennetze bestehend

erweisen, indem die Chondrinballen, nebst den in ihnen eingeschlossenen Zellen entfernt, d. i. ausgelöst worden sind. Einer zweiten Methode, welche die Darstellung ähnlicher Präparate gestattet, habe ich schon oben Erwähnung gethan.

Wie es aus der Ueberschrift dieser Abhandlung hervorgeht, ist der Trachealknorpel, und zwar aus erwachsenen Rindern, das nächste Object dieser Untersuchungen gewesen. Darum ist auch das hier besprochene Verhalten in erster Hand auf diese Knorpelart zu beziehen, aber selbst für den Trachealknorpel vom Rind ist es nicht unter allen Umständen gültig. Im Trachealknorpel sehr junger Rinder kann man nämlich mittelst der angegebenen Färbungs- oder Macerationsmethoden von jener histochemischen Struktur nichts entdecken. Die oben besprochene Differenzirung entwickelt sich nämlich erst allmählich während des ErwachSENS der Thiere, was ich an einer Reihe von Schnitten, welche neun Rindern verschiedenen Alters entstammen, gefunden habe. Sämmtliche Schnitte wurden nach 3, 1 (mit Tropäolin und Methylviolett) behandelt; aus der microscopischen Untersuchung ergab sich Folgendes:

Präp. No. 1—2, von zwei Kälbern, welche noch nicht eine Woche alt waren. Eine besondere Gruppierung der Knorpelzellen ist nicht merkbar; die Grundsubstanz ist gleichmässig blaugefärbt.

Präp. No. 3—6, von Kälbern verschiedenen Alters (einige Wochen bis einige Monate). Die Zellen zeigen mit steigendem Alter der Thiere allmählich mehr abgegrenzte Gruppen; an den Stellen, welche solchen Zellengruppen entsprechen, nimmt die blaugefärbte Grundsubstanz eine stärkere blaue Färbung an (Andeutung der Chondrinballen), während die dazwischen liegenden Theile schwächer gefärbt sind, aber noch keine gelbe Farbe zeigen (Andeutung des Balkennetzes).

Präp. No. 7, von einer sogenannten Färse. Eine distincte Differenzirung zwischen blaugefärbten Chondrinballen und einem gelbgefärbten Balkennetze ist deutlich vorhanden, die ersteren haben nur nicht ihre volle Grösse erreicht.

Präp. No. 8—9, von erwachsenen Rindern. Wie Präp. No. 7; die Chondrinballen sind gross und zeigen häufig eine complicirte Form.

Ueber die Ursache dieser Verschiedenheit zwischen dem jungen und dem ausgebildeten Knorpel hoffe ich in einer späteren Mittheilung Auskunft geben zu können.

Was den Knorpel anderer Organe und anderer Thierarten betrifft, so hat es mir an Zeit gefehlt, eingehendere Observationen hierüber anzustellen. Nur ganz beiläufig habe ich einige wenige Knorpelarten anderen Ursprunges geprüft und dabei beobachtet, dass einige, z. B. der Thyroideal-, Cricoideal- und Arythnoidealknorpel erwachsener Rinder ein ähnliches Verhalten wie der Trachealknorpel zeigen, während andere dagegen, wie der Knorpel der Nasenflügel vom Rind, der Gelenknorpel vom Froschschenkel, von einer ähnlichen Struktur nichts erkennen lassen. Mit den obigen Farbstoffen nehmen sie nämlich, auch bei geeigneter Nachbehandlung, nur eine annähernd gleichmässige Färbung an.

Morochowetz, Krukenberg, Landwehr und v. Mering haben schon durch ihre Untersuchungen Beweise dafür geliefert, dass die Grundsubstanz des hyalinen Knorpels in chemischer Hinsicht nicht aus einer einzigen organischen Substanz, sondern aus einem Gemenge verschiedenartiger Substanzen besteht. Dass aber diese von einander räumlich gesondert in der Grundsubstanz liegen und morphologisch verschiedenartige Theile derselben darstellen können, darüber finden sich, meines Wissens, in der Litteratur keine Angaben. Vielmehr scheint es, als hätte man die Grundsubstanz nur als ein inniges Gemenge der in ihr gefundenen Substanzen sich gedacht.

Die Resultate meiner chemischen Untersuchungen über die verschiedenen Bestandtheile der Trachealknorpelgrundsubstanz werde ich hoffentlich binnen Kurzem in einem zweiten Aufsätze mittheilen können.