

Aus der Neurochirurgischen Universitätsklinik Freiburg i. Br.  
(Direktor: Prof. Dr. T. RIECHERT)

## **Eine histochemische Reaktion zum Nachweis von Phosphorylase mit besonderer Berücksichtigung des Nervensystems**

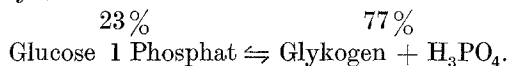
Von

**REINHARD FRIEDE**

Mit 4 Textabbildungen

*(Eingegangen am 4. Oktober 1956)*

Von der Kette von Enzymen, die den direkten Kohlenhydratabbau katalysieren, bestehen bis jetzt erst für zwei Enzyme Methoden zur histochemischen Darstellung im Nervensystem: für die Succino-dehydrase, für die bereits eine Reihe von Methoden angegeben wurde und für die Aldolase die Methoden von ALLEN u. BOURNE. Die Stellung der Phosphatasen im Kohlenhydratstoffwechsel ist noch nicht genügend geklärt, als daß sie hier mit einbezogen werden könnte. In der vorliegenden Untersuchung wird über die histochemische Darstellung eines weiteren Enzyms des Kohlenhydratstoffwechsels berichtet, der Phosphorylase. Phosphorylase katalysiert die Reaktion:



Histochemisch bietet die Reaktion die Vorteile, daß das Glykogen als Reaktionsprodukt direkt histochemisch nachweisbar ist, daß die Reaktion ohne nennenswerte Wärmetönung abläuft und daß das Gleichgewicht auf Seiten der Glykogensynthese liegt. Ein Nachteil besteht in der Labilität des Enzyms bei histologischen Verarbeitungsmethoden.

Die in vitro-Synthese von Glykogen ist 1939 gelungen (KIESSLING). Eingehende Untersuchungen über das System wurden von CORI u. CORI durchgeführt. Eine Pflanzenphosphorylase konnte an Hand des Stärkenachweises von YIN u. SUN histochemisch in der Sojabohne nachgewiesen werden. TAKEUCHI u. KURIAKI konnten Phosphorylase in unfixierten Gefrierschnitten von tierischem Gewebe (Muskel, Knorpel, Oesophagus, Gefäße) nachweisen, doch blieb die Methode in Leber und Hirn ohne Erfolg.

Die hier beschriebene Reaktion unterscheidet sich grundsätzlich von der auf Aneurinpyrophosphatase und den bekannten Reaktionen auf alkalische und saure Phosphatase.

In gewissen Grenzen können schon normale oder pathologische Glykogenvorkommen einen mittelbaren Aufschluß über die Topographie der Phosphorylase geben. Oft aber, und besonders in stoffwechselaktiven

Gewebe, wie im Zentralnervensystem, ist dieser Aufschluß ganz ungenügend und von verschiedensten Faktoren abhängig. So ist in Abschnitten mit lebhafter Glykolyse (z. B. in der Molekularschicht der Kleinhirnrinde) trotz reichlichem Phosphorylasegehalt nur selten Glykogen nachzuweisen.

### Material und Methodik

Diese Reaktion wurde speziell für Untersuchungen am Nervensystem ausgearbeitet, ist jedoch auch für andere Organe zu gebrauchen. Verarbeitet wurde vorwiegend Material von Meerschweinchen und Tauben, gelegentlich auch menschliches Operationsmaterial.

Versuche, Phosphorylase in eingebetteten oder fixierten oder nativen Gefrierschnitten nachzuweisen, blieben in ZNS ohne brauchbaren Erfolg. Es mußte daherein für histochemische Untersuchungen ungewöhnliches Verfahren ausgearbeitet werden, bei welchem dünne, *frische Gewebescheibchen* (in der Art, wie sie für physiologisch-chemische Untersuchungen gebräuchlich sind) *inkubiert und erst anschließend fixiert und histologisch aufgearbeitet werden*. Diese kombinierte Methode scheint auch für andere Untersuchungen erfolgversprechende Möglichkeiten zu eröffnen, wie aus den unten erwähnten vorläufigen Ergebnissen bei weiteren Versuchen hervorgeht.

Die Tötung der Tiere erfolgt durch Genickschlag. Das Hirn oder Organ wird so rasch als möglich präpariert und in Ringer-Lösung abgespült. Dann werden mit einer dünnen Rasierklinge möglichst dünne Schnitte angefertigt: als Vorbild hat das Vorgehen bei der Zubereitung der Schnitte für den Gebrauch der WARBURG-Apparatur zu gelten. Für histochemische Zwecke hat allerdings die Einhaltung der von WARBURG angegebenen Grenzscheidendicke besonders bei locker strukturierten Geweben nicht die gleiche grundsätzliche Bedeutung, so daß etwas dickere Scheibchen noch brauchbar sind. Die frischen Scheibchen werden unmittelbar in die Inkubationslösung gebracht, in der sie bei etwa 36°C 3—5 Std inkubiert werden. Die Größe der Scheibchen kann mit etwa 5×5×0,5 mm angegeben werden.

Die Inkubationslösung enthält:

Glucose 1 Phosphat	6 %	Monojodacetat	0,25%
Glykogen	0,1 %	(Adenylsäure	1 %)

Die Lösung wird vor dem Versuch frisch bereitet. Glucose-1-phosphat (CORI-Ester) wurde als Di-Kaliumsalz verwendet<sup>1</sup>. Der Glykogenzusatz ist erforderlich, da minimale Mengen von Glykogen als Starter der Reaktion nötig sind (CORI u. CORI). Monojodacetat oder Natriumfluorid blockieren den glykolytischen Abbau des CORI-Esters und begünstigen dadurch die Reaktion wesentlich, wobei Unterschiede zwischen verschiedenen Zellelementen bestehen. Monojodacetat ist in der Begünstigung der Reaktion wesentlich wirkungsvoller als Natriumfluorid und besonders für die graue Substanz des Zentralnervensystems unerläßlich. Natriumfluorid kann daher weggelassen werden, da der zusätzliche Effekt nicht sicher ist; Natriumfluorid allein ist unzureichend. Adenylsäure dient als Aktivator der Phosphorylase (CORI u. CORI). Nach TAKEUCHI und KURIKI kann sie durch Adenosintriphosphat ersetzt werden.

Es empfiehlt sich, die Trockensubstanzen in kleinen Wiegeschälchen eingewogen bereit zu halten und das Lösungsmittel unmittelbar vor dem Einlegen der Schnitte zuzufügen. Für die meist sehr klein dimensionierten Gewebescheibchen hat sich folgender Satz bewährt:

CORI-Ester	120 mg	Monojodacetat	5 mg
Glykogen	2 mg	(Adenylsäure	20 mg).

<sup>1</sup> Bezugsquellen: Boehringer, Mannheim, Fluka A. G. Buchs.

In einem Wiegeschälchen wird dieser mit 2 ml Aqua dest. gelöst. Pufferlösung ist nicht erforderlich, da der CORI-Ester als Di-Kaliumsalz als Puffer wirkt und sich das Gemisch auch bei Gebrauch von freier Monojodessigsäure automatisch auf pH 7,00 einstellt. Niedermolare Pufferlösungen reichen in ihrer Kapazität nicht hin, diesen Effekt zu verschieben. Die Differenz zum pH-Optimum von 6,3—6,5 kann erfahrungsgemäß vernachlässigt werden.

Die ganze Weiterbehandlung bis zur Einbettung kann dann in dem gleichen Schälchen durch Abgießen der Flüssigkeiten erfolgen, wodurch eine mechanische Beschädigung der kleinen Proben vermieden wird (die dünnen Scheibchen brechen im fixierten Zustand leicht). Nach Abschluß der Inkubation wird einmal kurz mit Aqua dest. gespült und nicht länger als 30 min in CARNOYS Gemisch fixiert, dann bringt man die Präparate in üblicher Weise in Paraffin. Bei der kleinen Gewebemenge läßt sich diese Behandlung bei halbstündlichem Wechsel der Flüssigkeiten rasch durchführen. Die Schnitte werden mit der *Perjodsäure-Schiff*-Technik nach McMANUS HOTCHKISS gefärbt, wobei die üblichen Regeln einer Glykogenfärbung zu beachten sind. Wir haben bei der PAS-Technik wesentlich bessere Resultate erzielt, wenn statt alkoholischer wäßrige Perjodsäurelösung gebraucht wurde, offenbar auf Grund besserer Löslichkeit der Perjodsäure; wie bekannt, ist Glykogen aus celloidinierten Schnitten unlöslich. Selbstverständlich ist auch die Färbung mit BESTS Carmin, die Reaktion nach BAUER-FEULGEN oder die Jodreaktion (NIELSEN, OKKELS, STOCKHOLM) möglich und erfolgreich.

#### Kontrollversuche

Die Kontrolle, ob es sich bei den nachgewiesenen Substanzen um Glykogen handelt, erfolgt in üblicher Weise durch Speichelprobe, der wir die Behandlung mit hochgereinigter Diastase (Merck) unbedingt vorziehen. Gegenüber Wässern ohne Diastase war das nachgewiesene Glykogen ziemlich resistent. Ebenso hatten Proben mit Lysozymlösung (Spaltung von Mucopolysacchariden) keinerlei Effekt, was die ausgesprochene Fermentwirkung der Diastaseprobe unterstreicht. Eine gleichlaufende Inkubation in 0,1% Glykogenlösung ohne CORI-Ester dient zur Kontrolle ob a) das zugesetzte Glykogen selbst eine nennenswerte Reaktion gibt und b) ob präexistentes Glykogen vorhanden ist. Es findet sich dabei, daß in den Randzonen der Präparate zuweilen oberflächlich liegende Glykogengranula zu finden sind, die jedoch für die Beurteilung der Reaktion quantitativ unwesentlich sind. Präexistentes Glykogen scheidet im Hirngewebe bei dieser Verarbeitungsart erfahrungsgemäß aus, muß aber in anderen Organen sorgfältig beachtet werden. Über Kontrollen zur biochemischen Abgrenzung siehe unten.

#### Ergebnisse

Als Ergebnis der Reaktion läßt sich histochemisch *Glykogen* im Schnitt nachweisen; es findet sich in der gleichen Form, in der man es auch sonst unter normalen und pathologischen Bedingungen im Gewebe finden kann: als stark PAS-positive, diastaseempfindliche Granula, seltener in diffuser Verteilung bei sehr starker Reaktion.

Über die Topographie der Phosphorylase im zentralen Nervensystem soll hier nur eine kurze Übersicht geboten werden. Überraschend war, daß die *weiße Substanz* einen sehr hohen Phosphorylasegehalt aufwies und darin in der Regel die graue Substanz weit übertraf. Dies ist auffallend, weil sich sonst normale oder pathologische Glykogenvorkommen fast ausschließlich in der grauen Substanz finden. In der Alba kommt es

meist zu einer scharfen Darstellung von Achsenzylindern durch Glykogen; besonders bei allgemein schwächerer Reaktion heben sich einzelne Achsenzylinder gut hervor. Daneben findet sich Glykogen auch krümelig, diffus im Gewebe verteilt, besonders bei starker Reaktion; dann ist eine genauere cytologische Lokalisation nicht mehr möglich, obwohl sich auch unter diesen Umständen die Zugehörigkeit zu (z. B. quergetroffenen) Achsenzylindern oft sicherstellen läßt. Gliazellen zeigen verstreut eine ganz intensive, meist die Form von Kurzstrahlern der Astroglia imitierende Reaktion. Nicht selten sind Granula perinucleär angereichert.

In der Großhirnrinde fällt die Reaktion meist in Form einer granulären Bestäubung der Zwischensubstanz aus. In dieser lassen sich jedoch oft Achsenzylinder, Gliazellen (wie oben beschrieben) und Bruchstücke von Zellfortsätzen, die offenbar mit Dendriten zu identifizieren sind, ausmachen. Eigenartig ist das Verhalten der Ganglienzellkörper. Oft sind sie negativ und deutlich als helle Lücken ausgespart. Praktisch in jedem Präparat finden sich aber auch Nervenzellen, bei denen Zellkörper und Dendriten durch eine ganz intensive Granulierung oder massive Reaktion dargestellt sind, mit einer Schärfe, die fast an Versilberungen erinnert. Solche positiven Zellen treten in wechselnder Häufigkeit regellos auf; nicht selten überwiegen sie. Praktisch immer erscheinen diese positiven Zellen leicht geschrumpft, mit weitem pericellulärem Raum. Auch die „Lücken“, die negative Zellen kennzeichnen, erscheinen gebläht.

Die Kleinhirnrinde zeigt, abgesehen vom stark positiven Marklager, die intensivste Reaktion in der Molekularschicht. Bei starker Reaktion erkennt man hier nur eine dichte, diffuse Bestäubung. Nicht selten, besonders bei schwächerer Reaktion, ist aber das Dendritensystem der PURKINJE-Zellen bis in seine feinsten Verästelungen dargestellt, in einer Art, wie man es sonst etwa bei GOLGI-Imprägnationen zu sehen bekommt. Offenbar wird dieses Strauchwerk der Dendriten oft von Granula in der Zwischensubstanz verwischt. Eigenartigerweise beschränkt sich diese positive Reaktion in der Regel auf die Dendriten, wo man sie wenig vor dem Eintritt in den PURKINJE-Zellkörper enden sehen kann. Der Körper der PURKINJE-Zellen ist noch öfter als der der Pyramidenzellen der Großhirnrinde negativ und erscheint ausgespart. Aber auch hier finden sich — von Präparat zu Präparat wechselnd — intensiv positive Zellkörper, bei denen man den Übergang in die Dendriten verfolgen kann. Einzelne Gliazellen (offenbar Oligodendroglia) heben sich in der Molekularschicht oft durch stark positive Reaktionen hervor.

Dieses eigenartige Verhalten der Zellkörper ist unklar. Zwei Erklärungsmöglichkeiten bieten sich hierfür an: 1. Es könnte sich um autolytische Erscheinungen mit Zerstörung der Fermentsysteme in den „negativen“ Ganglienzellen handeln. Gegen diese Annahme spricht, daß das Verhalten von positiven und negativen Zellen unabhängig von der

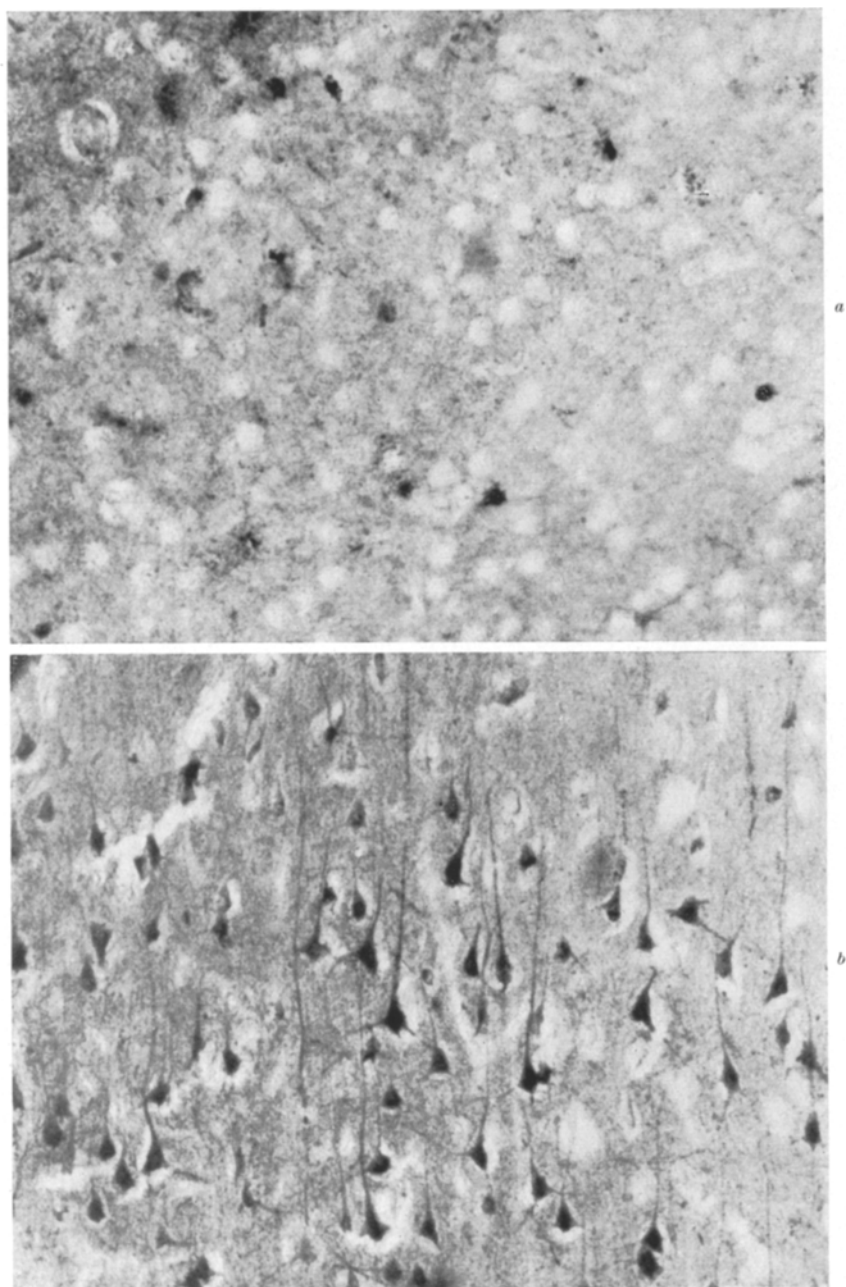


Abb. 1. Großhirnrinde desselben Schnittes mit verschiedener Phosphorylasereaktion. *a* Gebiet mit vorwiegend negativen Ganglienzellen und Reaktion in der Zwischensubstanz; *b* Überwiegend positive Ganglienzellen mit Phosphorylase-Reaktion bis weit in die Dendriten

Inkubationszeit war, da beide Formen nach 1½-, 3- und 6ständiger Inkubation erschienen. 2. Die Zellen könnten normalerweise für CORI-Ester oder das Glykogen als Starter impermeabel sein und die positive Reaktion erst auf dem Wege über eine *Membranschädigung* zustande kommen. Diese Annahme scheint uns naheliegender, da z. B. bei Inkubation in Fruktose 6-Phosphat in *allen* Zellkörpern eine PAS-positive



Abb. 2. *Phosphorylasereaktion in der Kleinhirnrinde* (Meerschweinchen), Übersicht: Starke Reaktion in der Molekularschicht und im Marklager; einzelne positive PURKINJE-Zellkörper

Substanz nachweisbar (nicht identisch mit Glykogen) ist (siehe unten). Auch fällt auf, daß nicht selten ausgesprochen laminäre Effekte entstehen, da die Zellen der Lamina III besonders oft positiv reagieren.

Die Körnerschicht der Kleinhirnrinde zeigt üblicherweise nur eine sehr schwache Reaktion mit gelegentlicher Darstellung einzelner Zellelemente. Besonders bei längerer Inkubation (5 Std) kann aber die Reaktion sehr stark werden und diffus die ganze Schicht betreffen. Da dann gleichzeitig die Reaktion der Molekularschicht absolut schwächer wird, liegt der Schluß nahe, daß hier bei der langen Inkubation und den zarten Strukturen (Dendriten) bereits autolytische Vorgänge zu einer Abschwächung

der Reaktion in der Molekularschicht führen. Gegen die Annahme, die schwache Reaktion der Körnerschicht bei kurzer Inkubation (bis 3 Std) sei diffusionsbedingt, spricht die scharfe Grenze zur Molekularschicht und die stark positiven Axone im Marklager (siehe Abb. 2).

Im Bereich des Hirnstammes überwiegen die intensiv positiven Markfasermassen. An den Ganglienzellen fällt auf, daß hier eine positive

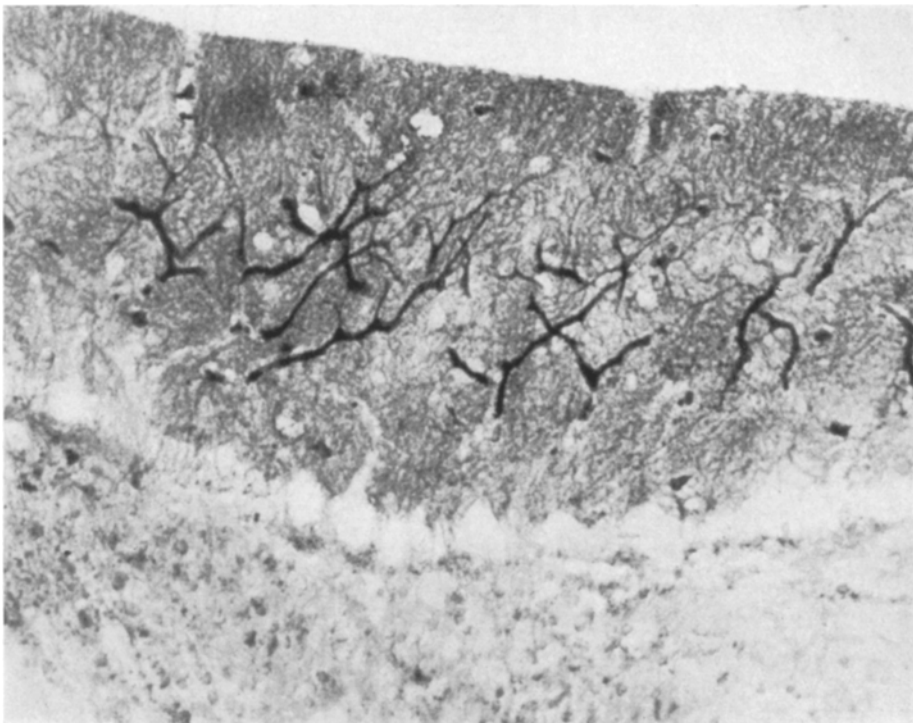


Abb. 3. *Phosphorylase-positive PURKINJE-Dendriten* in der Kleinhirnrinde (Meerschweinchen); *negative PURKINJE-Zellkörper*, schwache Reaktion in der Körnerschicht

Reaktion viel häufiger zu beobachten ist, als in der Großhirnrinde. Dies kann den Angaben von SHIMIZU u. KUMAMOTO entsprechen, die unter normalen Umständen nie im Cortex, wohl aber im Hirnstamm glykogenhaltige Ganglienzellen nachwiesen.

Adventitielle Plasmabrücken und perivaskuläre Strukturen sind meist stark positiv. Vereinzelt untersuchtes Tumorgewebe (Gliom) wies eine ungemein starke, diffus verteilte Reaktion auf.

Bei den Befunden ist gelegentlich, besonders wenn die Gewebescheibe etwas dicker war, eine Abschwächung der Reaktion nach innen, entsprechend der Diffusionsverhältnisse zu erkennen. Bei der Beurteilung der

Intensität muß dies sorgfältig beachtet werden und alle Fehlermöglichkeiten müssen an Hand mehrerer Präparate ausgeschlossen werden. Richtet man sich aber nach den Untersuchungen von WARBURG über die Grenzschichtdicke, so werden alle Einwände gegen die „Blockreaktion“ hinfällig.

Die eben genannte, diffusionsbedingte Abschwächung der Reaktion im Innern von Präparaten ist bei peripheren Organen wesentlich stärker



Abb. 4. Markfaserbündel im Striatum mit Phosphorylasereaktion zwischen negativer grauer Substanz. (Meerschweinchen). Fast elektive Darstellung von Achsenzylindern bei Inkubation ohne Blockierung der Glykolyse mit Monojodacetat

als beim Hirngewebe. Deshalb war bei der Untersuchung von Leber, Niere, Nebenniere, Herz, Skelettmuskulatur und Darm oft nur eine schmale Randzone beurteilbar, während das Innere negativ blieb.

Die intensivste Reaktion fand sich in der Leber, wo die Parenchymzellen durch massiven Glykogengehalt dargestellt waren. Auch am Herz- und besonders am Skelettmuskel fiel die regelmäßige und starke Reaktion des Sarkolemmes und Zwischengewebes auf, während die Muskelfasern selbst sehr oft nur an der Oberfläche des Präparates positiv waren, dann allerdings sehr stark. Verhältnismäßig intensiv war auch die Reaktion des Nebennierencortex. In der Niere waren vor allem die Epithelien der Tubuli contorti an ihrer dem Lumen zugewandten Oberfläche positiv, während der Darm keinerlei positive Reaktion zeigte, sondern nur das



präexistente Mucin der Becherzellen erkennen ließ. Systematische Untersuchungen scheinen hier erfolgversprechend, wofür die eigenartige Verteilung im Bereich der Muskulatur einen Hinweis geben mag.

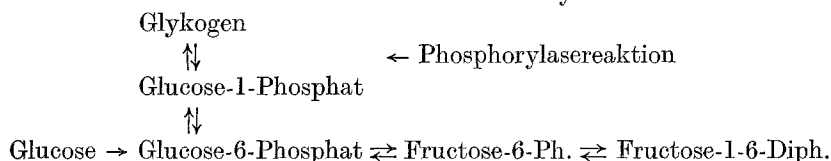
#### *Bedeutung der Monojodessigsäure oder Fluoridblockierung*

Die Blockierung der Glykolyse durch Monojodacetat (weniger durch Fluorid) verstärkt die Reaktion wesentlich. Die Begünstigung der Reaktion durch Glykolyseblockierung ist in der grauen Substanz des ZNS viel stärker als in den Achsenzylindern. Ohne Blockierung erzielt man in der grauen Substanz nur eine sehr schwache oder gar keine Reaktion, während die Achsenzylinder sich noch gut darstellen. Auf diesem Wege lassen sich bei kurzer Inkubationszeit (3 Std) die in den Cortex einstrahlenden Axone elektiv darstellen, wofür ohne Zweifel nicht nur Unterschiede der Intensität der Reaktion, sondern wohl auch Unterschiede der Empfindlichkeit gegenüber der Blockierung verantwortlich gemacht werden können.

#### *Biochemische Abgrenzung der Reaktion*

Zur näheren Abgrenzung der Reaktion im Hirngewebe dienten folgende Inkubationen:

Glucose, Glucose-6-Phosphat, Fructose-6-Phosphat, Fructose-1-6-Diphosphat, wobei die genannten Substanzen jeweils bei gleicher Konzentration und Verarbeitung den CORI-Ester ersetzten. Das untenstehende Schema zeigt die biologische Reaktionsfolge dieser Substanzen und den Ort der hier beschriebenen histochemischen Enzymreaktion.



Von diesen Substanzen blieben Inkubation in Glucose und in Fructose-1-6-Diphosphat ohne jeden histochemisch faßbaren Erfolg. Erwartbar war dies bei der Glucose, deren Phosphorylierung als energiebindende Reaktion Adenosintriphosphat braucht und ohne dieses in vitro nicht möglich sein wird. Auffallend war das Ergebnis bei Inkubation in Glucose-6-Phosphat und besonders Fructose-6-Phosphat. Keine dieser Substanzen ergab das typische Bild der stark PAS-positiven, granulären Reaktion; vielmehr zeigte sich eine PAS-schwach positive, diffus verteilte, nie granulär auftretende Substanz von ganz anderem Verteilungsschema, offenbar nicht identisch mit Glykogen, worauf wir unten noch zurückkommen. Hier ist nur bedeutungsvoll, daß die beschriebene typische Reaktion nur mit CORI-Ester und sonst keinem der genannten Hexosephosphate erreicht werden kann. Dies zeigt, daß wir es mit einer reinen Phosphorylasereaktion ohne wesentliche Mitbeteiligung anderer Fermente zu tun haben.

*Inaktivierung*

Wie eingangs erwähnt, wurde zunächst versucht, Phosphorylase in fixierten oder unfixierten Gewebeschnitten nachzuweisen. Dabei hat sich ergeben, daß bereits nach Herstellung von 0,5 mm dicken Scheibchen in gefrorenem Zustand und Inkubation wie oben beschrieben, bestenfalls eine diffuse, cytologisch nicht verwertbare Reaktion zu erzielen war. *Einfrieren inaktiviert demnach die Phosphorylase oder stört ihre Strukturbindung.* Dementsprechend ergab sich auch bei kurzfristig auf 80° erhitzten, nativ gewonnenen Scheibchen keinerlei Reaktion.

Nach CORI u. CORI hat Glucose eine hemmende Wirkung auf die Phosphorylasereaktion, die auf einer kompetitiven Fermentbeeinflussung beruht. Bei Zugabe von gleichen Mengen Glucose sowie CORI-Ester zum Inkubationsmedium fand sich eine eindeutige Abschwächung der Reaktion bei sonst normaler Verteilung.

Desgleichen hemmt Phlorrhizin die Phosphorylasereaktion (CORI u. CORI). Zugabe von 2% Phlorrhizin ergab einer der Glucosewirkung annähernd gleichstarke, eindeutige Abschwächung.

Undeutlich hingegen war die Wirkung geringer Mengen von Cu-Ionen, wobei dahingestellt bleiben mag, inwieweit die antagonisierende Wirkung im Gewebe enthaltenen Glutathions und anderer reduzierbarer Substanzen wirksam war.

Glykogen als Reaktionsprodukt war nur gegen Diastase empfindlich, während Lysozym wirkungslos blieb (s. oben). Desgleichen war Zusatz von Hyaluronidase (Kinetin Schering, 2 Amp.) praktisch ohne Einfluß auf die Reaktion. Änderungen im Ionen-Milieu (Ringer-Lösung statt Aqua dest.) zeigten ebenfalls keinen signifikanten Erfolg. Wurde durch stärkere Pufferlösungen hingegen eine Verschiebung des  $p_H$  über 7,0 ins Alkalische erzwungen (vgl. obige Feststellungen über das  $p_H$ ), so kam es zu einer starken Abschwächung der Reaktion, woran sowohl die Entfernung vom  $p_H$ -Optimum, als auch Zerstörung von CORI-Ester teilhaben mögen.

Nach allen Ergebnissen (morphologisches Bild; Diastase; negatives Ergebnis restlicher Hexosephosphate; Hemmung durch Glucose, Phlorrhizin; Lysozym, Hyaluronidase ohne Einfluß; Inaktivierungsversuche) kann damit als gesichert gelten, daß es sich bei der hier beschriebenen Reaktion um eine spezifische, histochemische Reaktion auf Phosphorylase handelt.

*Andere Polysaccharide*

Im Zuge der Untersuchungen haben sich einige weitere Beobachtungen machen lassen, die über das ursprüngliche Ziel eines Phosphorylase-nachweises hinausgingen.

a) Nach Inkubation in Fructose-6-Phosphat tritt eine diffuse, nie granuläre PAS-Reaktion auf, die wesentlich schwächer (zart rosa) ist, als die intensive PAS-Reaktion des Glykogens (leuchtend rote Granula).

Das Verteilungsschema dieser Reaktion weicht grundsätzlich von dem der Phosphorylase ab: sie ist immer im Ganglienzellkörper am stärksten, etwas schwächer in der Grundsubstanz, während das Marklager nicht oder nur unter bestimmten Bedingungen positiv ist. Diese Reaktion wird am stärksten mit Fructose-6-Phosphat erzielt, wesentlich schwächer mit Glucose-6-Phosphat. Auch dieser Umstand setzt sie deutlich von der Phosphorylasereaktion mit Glucose-1-Phosphat ab.

b) Bei Zusatz von 2% Glycerinaldehyd zur üblichen Inkubationslösung mit CORI-Ester ändert sich das Reaktionsergebnis morphologisch völlig, da dann fast nur eine diffuse, kaum eine granuläre Reaktion erfolgt, wobei das Verteilungsschema dem der Phosphorylase ähnelt. Die Hirnscheibchen werden im Laufe der Reaktion makroskopisch karamelbraun. Die Stärke der Braunfärbung geht der Intensität der PAS-Reaktion parallel. Es bildet sich außerdem eine starke Basophilie der Grundsubstanz, die sich in ihrer Verteilung mit der der positiven PAS-Reaktion deckt. (Färbung mit gepufferter Methylenblaulösung.) Diese Basophilie tritt weder bei der Phosphorylasereaktion, noch bei der Fructose-6-Phosphat-Reaktion auf, auch die braune Färbung der Scheibchen, die noch im ungefärbten Schnitt deutlich ist, nicht. Das Reaktionsprodukt ist nicht oder wenig diastaseempfindlich und entsteht nicht bei Inkubation mit Fructose 1-6 Diphosphat.

### Besprechung der Ergebnisse

Die zusammengestellten Tatsachen lassen erkennen, daß es sich bei der beschriebenen Reaktion um einen Fermentnachweis handelt, der die Spezifität einer histochemischen Reaktion hat. Von besonderer Bedeutung bzw. Ausbaufähigkeit scheinen uns zwei der dabei gemachten Beobachtungen:

a) Der überaus hohe Phosphorylasegehalt der Axone bzw. der Marksubstanz überhaupt. Dieser Befund ist nach den pathologisch-anatomischen Erfahrungen überraschend. Es erscheint möglich, daß der hohe Phosphorylasegehalt in der weißen Substanz eine Beziehung zur Glycerinphosphorsäure aufweist, die als wichtige Schlüsselsubstanz für den Phosphatidaufbau bei der Spaltung in die Triosephosphate entsteht. Für diese Hypothese würde sprechen, daß der Einfluß der Monojodessigsäureblockierung am Axon geringer zu sein scheint; denn wenn die Glycerinphosphorsäure zur Phosphatidsynthese verwendet wird, würde der weitere glykolytische (von MJE blockierte) Abbau schon physiologisch nicht die Bedeutung haben wie in der grauen Substanz.

b) Wichtig scheint weiterhin die auffallende *inkonstante* Reaktion in Ganglienzellkörpern. Möglicherweise bietet dies eine Möglichkeit zu entscheiden, in welcher Form der Hauptteil der Kohlenhydrate der Ganglienzelle „angeboten“ wird; ob in Form von Glucose oder Hexosephosphaten oder Triosephosphaten. Succinodehydrase findet sich

überwiegend im Ganglienzellkörper, so daß wir den Citronensäurecyclus wohl hierher lokalisieren dürfen. Auf diesem Gebiet sind noch weitere Untersuchungen erforderlich.

### Zusammenfassung

1. Eine histochemische Reaktion zur Darstellung von Phosphorylase im ZNS (CORI-Ester < Glykogen) wird beschrieben. Der Nachweis gelingt nur bei Inkubation *frischer, nicht gefrorener Gewebescheibchen* in CORI-Ester und nachfolgender Fixierung und histologischer Verarbeitung mit Nachweis des gebildeten Glykogens. (Perjodsäure oder jede andere Reaktion.)

2. Geringe Mengen Glykogen als Starter und Monojodacetat zur Blockierung der Glykolyse müssen zugesetzt werden.

3. Die Reaktion wird durch Zusatz von Glucose oder Phlorrhizin gehemmt. Das gebildete Glykogen ist empfindlich gegen Diastase, unempfindlich gegen Hyaluronidase oder Lysozym.

4. Inkubation in Glucose, Glucose-6-Phosphat, Fructose-6-Phosphat oder Fructose-1-6-Diphosphat zeigt keine vergleichbaren Ergebnisse.

5. Die Verteilung der Phosphorylase im ZNS des Meerschweinchens wird kurz besprochen. Besonders reich daran sind weiße Substanz und speziell Achsenzyylinder; in der grauen Substanz findet sich diffus in der Zwischensubstanz positive Reaktion, im Kleinhirn besonders in der Molekularschicht, wo die PURKINJE-Dendriten besonders starke Reaktion aufweisen. Bei PURKINJE-Zellen, auch bei Pyramidenzellen der Großhirnrinde ist die Reaktion im Zellkörper selbst scheinbar regellos entweder stark positiv oder gänzlich fehlend. Die Verhältnisse in peripheren Organen werden kurz gestreift.

6. Die Reaktion in der grauen Substanz wird durch Monojodacetatblockierung (der Glykolyse) deutlicher begünstigt als die in den Axonen.

7. Zwei weitere PAS-positive Reaktionsprodukte nach Inkubation in Fructose-6-Phosphat und in CORI-Ester mit Glycerinaldehydzusatz wurden als vorläufige Mitteilung beschrieben.

### Literatur

ALLEN, R. J., and G. H. BOURNE: Experiments on the microscopical demonstration of zymohexase in animal tissues. *J. exp. Biol.* **20**, 61 (1943). — CORI, G. T., and C. F. CORI: The kinetics of the enzymatic synthesis of glycogen from glucose-1-phosphate. *J. biol. Chem. (Amer.)* **135**, 733 (1940). — FRIEDE, R.: Über Beziehungen zwischen histochemischen Glykogenbefunden und der Hirnwellenfrequenz an einem Material von menschlichen Biopsien. *Arch. Psychiatr. u. Z. Neur.* **194**, 213 (1956). — SHIMIZU, N., and T. KUMAMOTO: Histochemical studies on the glycogen of the mammalian brain. *Anat. Rec.* **114**, 479 (1952). — TAKEUCHI, T., and H. KURIKAKI: Histochemical detection of Phosphorylase in animal tissues. *J. Histochem.* **3**, 1953 (1955). — WARBURG, O.: Über den Stoffwechsel der Tumoren. Berlin 1926. — YIN, H. G., and C. N. SUN: Histochemical method for detection of phosphorylase in plant tissues. *Science* **105**, 650 (1947).

Dr. R. FRIEDE, Freiburg i. Br., Neurochirurg. Univ.-Klinik, Hugstetter Str. 55