

## Enzymhistochemische Untersuchungen am Nervus opticus nach experimentellen Läsionen

ECKART METZ

Institut für Hirnforschung — Korbinian-Brodmann-Haus —  
der Universität Tübingen (Direktor: Prof. Dr. J. PEIFFER)

Eingegangen am 27. Oktober 1967

Die nach Läsionen des peripheren Nerven ablaufenden morphologischen Veränderungen sind seit ihrer Beschreibung durch WALLER (1850), SPATZ (1921), SPIELMEYER (1922) und CAJAL (1928) vielfach untersucht worden. Diese klassischen Untersuchungen wurden in den letzten Jahren durch elektronenoptische und histochemische Methoden ergänzt.

Nach experimenteller Kontinuitätstrennung laufen am proximalen, noch mit den Perikarya verbundenen und am distalen, von den Perikarya abgetrennten Stumpf unterschiedliche Prozesse ab. Gemeinsam ist zunächst die der Läsion schon nach wenigen Stunden folgende Axonverdickung in läsionsnahen Abschnitten des proximalen und distalen Stumpfes. Die Elektronenmikroskopie zeigt in diesen Axonverdickungen eine starke Vermehrung von Zellorganellen [3, 8, 17, 38, 40]. Damit ergibt sich das feinstrukturelle Äquivalent der hier enzymhistochemisch nachweisbaren Aktivitätssteigerung saurer Phosphatase [4, 11, 13] und verschiedener oxydativer Enzyme [12, 22]. Man wertet diese früh auftretenden, läsionsnahen Axonverdickungen daher nicht mehr als degenerative, sondern als reaktive Vorgänge, weswegen man auch von *Reaktionsendkolben* spricht.

Die nur am proximalen Stumpf zu erwartende Regeneration beginnt mit dem Auswachsen von Axonsprossen aus erst im Laufe von Tagen auftretenden, läsionsferner gelegenen Axonverdickungen, sogenannten *Wachstumsendkolben*. Sie entstehen nach Untergang der von den Reaktionsendkolben eingenommenen, läsionsnahen Axonstrecken [3]. Auch in diesen Wachstumsendkolben und jungen Axonsprossen herrscht ein besonderer Reichtum an Zellorganellen [2, 3, 8, 40], verbunden mit einer starken Aktivität verschiedener oxydativer Enzyme [12, 22].

Im Unterschied hierzu zerfallen die distal lokalisierten Reaktionsendkolben unter Schwund der angehäuften Organellen [17, 38] und Verlust ihrer hohen Enzymaktivität [4, 11—13, 21] schon nach wenigen Tagen, später auch — im Sinne der sekundären Wallerschen Degeneration — die übrigen, nicht reaktiv umgewandelten Axonanteile des distalen Stumpfes.

Unterbrechungen von Nervenfasern des Zentralnervensystems werden von grundsätzlich gleichen Gewebsveränderungen gefolgt. Das haben elektronenmikroskopische [23, 31] und enzymhistochemische [9, 20] Arbeiten am Rückenmark gezeigt. Die enge Nachbarschaft und gegenseitige Verflechtung auf- und absteigender Bahnen macht es hier aber unmöglich, gefundene Veränderungen eindeutig proximalen oder distalen Faserstümpfen zuzuordnen. Die neurosekretorischen Bahnen des Hypophysenhinterlappens [6, 7, 14, 15] und der N. opticus zeigen dagegen mit ihren einheitlich angeordneten Fasern klare Verhältnisse. Ältere, lichtmikroskopische Beobachtungen nach Läsion des N. opticus [5] wurden kürzlich durch elektronenmikroskopische Befunde [26, 32, 33] ergänzt. Enzymhistochemische Untersuchungen fehlen bis jetzt. Unsere Untersuchung gilt der Darstellung der sauren Phosphatase als lysosomalem und der Succinodehydrogenase als mitochondrialem Leitenzym an proximalen und distalen Axonstümpfen nach experimenteller Läsion des N. opticus. Der N. ischiadicus wird als Vergleichsobjekt herangezogen.

### Material und Methode

Als Versuchstiere dienten 4–6 Monate alte weibliche Wistarratten von durchschnittlich 200 g Körpergewicht. Die Operationen erfolgten in Äthernarkose. An 10 Tieren wurde der N. ischiadicus etwa in der Mitte des Oberschenkels von dorsal her total durchschnitten. An 15 Tieren wurde der N. opticus ohne Eröffnung des Schädels von der Augenhöhle aus nach dem operativen Vorgehen von SCHLOTE freigelegt [33] und entweder partiell oder total durchschnitten bzw. leicht gequetscht. Um Nekrosen der entstandenen Stümpfe durch Unterbrechung der Blutversorgung zu vermeiden, war dabei die seitlich unter dem Nerven verlaufende Arteria nervi optici zu schonen. Die partielle Durchschneidung bot den Vorteil, daß im Längsschnitt unterbrochene und nicht unterbrochene Fasern nebeneinander erschienen und leicht verglichen werden konnten.

Die Tiere wurden 6, 12, 48 Std sowie 5 Tage nach der Operation durch Äther getötet. Die Entnahme des N. ischiadicus geschah analog zur Operation. Am N. opticus konnte mit der von SCHLOTE angegebenen Präparationstechnik [33] ein bis zu 5 mm langes Stück für die histologische Untersuchung gewonnen werden. Die Läsionsstelle war als rotbraune Einkerbung bereits makroskopisch deutlich zu sehen. Ihre Entfernung vom Austritt des Nerven aus dem Augapfel schwankte zwischen 0,75 und 2,5 mm, lag bei den meisten Operationen aber bei etwa 1,75 mm.

Sofort nach der Entnahme wurden die Nervenstücke ihrer geringen Größe wegen mittels  $\text{CO}_2$ -Schnellgefrierung auf einem zuvor im Kryostaten plangeschnittenen Muskelblock angefroren. Zur Aufarbeitung in Längsschnitte von 10  $\mu$  Dicke diente der Pearse-Kryostat Typ HS bei einer Temperatur des Kühraums von  $-20^{\circ}\text{C}$ . Der histochemische Nachweis der sauren Phosphatase wurde ohne Fixierung mittels der von GOMORI 1950 angegebenen Methode geführt. Negativkontrollen waren: 1. Inkubation ohne Substrat (Natrium- $\beta$ -Glycerophosphat). 2. spezifische Hemmung der sauren Phosphatase durch Vorbehandlung der Präparate mit einer 0,01 M Natriumfluoridlösung; anschließend normale Inkubation. Kryostatschnitte der Ratteniere liefen bei entsprechender Behandlung als weitere Negativ- bzw. Positivkontrollen mit. Die histochemische Darstellung der Succinodehydrogenase erfolgte nach der von GOEBEL u. PUCHTLER 1955 angegebenen Methode ebenfalls

am unfixierten Gewebe. Als Tetrazoliumsalz diente Nitro-BT. Negativkontrollen waren: 1. Inkubation ohne Substrat (Natriumsuccinat). 2. spezifische Hemmung der Succinodehydrogenase durch einen 0,01 M Zusatz von Jodessigsäure zur Inkubationslösung. Als weitere Negativ- bzw. Positivkontrollen wurden auch hier Kryostatschnitte der Rattenniere verwendet. Zur besseren Orientierung über Lage und Ausdehnung der Läsion kamen stets mehrere Präparate eines Versuches ohne Inkubation zur HE-Färbung.

### Befunde

#### 1. *Nervus ischiadicus*

a) Im Gegensatz zu früheren Befunden [1, 24, 42], die mit der von GOMORI 1941 angegebenen, inzwischen aber als wenig spezifisch betrachteten Methode erhoben wurden, konnte im normalen N. ischiadicus mit der modifizierten Gomori-Methode von 1950 keine Aktivität saurer Phosphatase nachgewiesen werden; auch fehlte die heute als unspezifisch erkannte Anfärbung von Kernen Schwannscher Zellen. Desgleichen kam es beim Succinodehydrogenasenachweis nicht zu der von anderen Autoren [29, 35] beobachteten Darstellung von Axonen, Ranzierschen Schnürringen und kernnahen Plasmaanteilen Schwannscher Zellen. Vielmehr zeigte sich eine diffuse, blaßblaue Anfärbung des ganzen Nerven. Sie war wahrscheinlich auf Diffusion des Enzyms unter der Inkubation zurückzuführen und blieb in entsprechenden Negativkontrollen aus.

Im Gegensatz dazu war die nach Durchschneidung einsetzende Aktivitätssteigerung der beiden Enzyme gut zu erfassen. Sie beschränkte sich in allen untersuchten Stadien auf einen Bereich von 1–1,5 mm beidseits der Läsion (proximal = zentraler Stumpf, distal = peripherer Stumpf).

b) 6 Std nach Durchschneidung fanden sich eine Aktivität saurer Phosphatase zeigende, schwarz gefärbte, endständige Axonverdickungen (Endkolben) in beiden Stümpfen gleich zahlreich und an fast allen durchtrennten Fasern. Ihre unmittelbar läsionsbenachbarte Lage war besonders proximal deutlich. Vereinzelt wiesen sie auch eine milde Succinodehydrogenaseaktivität auf.

c) Nach 12 Std war die Aktivität beider Enzyme beträchtlich angewachsen. Ihre Darstellung lieferte nun gleichartige Bilder: Proximal und distal gleich häufige, an allen durchtrennten Fasern auftretende, gegenüber dem 6 Std-Stadium längere Axonstrecken erfassende, läsionsnahe Endkolben.

d) Nach 48 Std war proximal für beide Enzyme nur noch ein geringer weiterer Aktivitätszuwachs zu beobachten, vor allem in Form einer weiteren Verlängerung der Aktivität tragenden Axonverdickungen. In läsionsnahen Abschnitten dieser Endkolben zeigten sich als Ausdruck beginnender, regressiver Veränderungen unregelmäßig geformte Aufreibungen, während sich ihre läsionsfernen Abschnitte als unverändert

erwiesen. Im distalen Stumpf verloren dagegen beide Enzyme stark an Aktivität. Sie erschien nicht mehr in langgestreckten Axonverdickungen, sondern in kleinen, rundlichen Gebilden, den durch die einsetzende sekundäre Degeneration entstandenen Axonbruchstücken.

e) Nach 5 Tagen war proximal die Succinodehydrogenaseaktivität voll erhalten und fast ausschließlich in läsionsfernen Endkolben lokalisiert. Die Aktivität der sauren Phosphatase war dagegen proximal stark vermindert und fast nur noch in den Bruchstücken ehemaliger läsionsnaher Axonverdickungen vorhanden. Ab und zu war hier auch noch eine milde Succinodehydrogenaseaktivität zu beobachten. Distal zeigten beide Enzyme keine Aktivität mehr.

Sowohl im 48 Std- als auch im 5 Tage-Stadium sah man — allerdings nur selten — von läsionsfernen Endkolben ausgehende, dünne, läsionswärts gerichtete Fortsätze, vermutlich junge Axonsprosse.

Auf HE-Präparaten entsprach die Proliferation des endoneuralen Bindegewebes bzw. der Schwannschen Zellen dem bekannten Bild der Narbenbildung.

## 2. *Nervus opticus*

Alle Sehnerven zeigten unmittelbar nach dem Austritt aus dem Auge eine zwiebelförmige Verbreiterung um etwa ein Drittel des normalen Durchmessers. Sie ist durch eine Vermehrung der interfasciculären Glia und den besonderen Gefäßreichtum in diesem Abschnitt bedingt. Polarisationsoptisch ließ sich hier der Beginn der Bemerkung gut erkennen.

a) Der normale N. opticus bot wie schon der normale N. ischiadicus keine erkennbare Aktivität saurer Phosphatase und beim Succinodehydrogenasenachweis nur eine diffuse, blaßblaue Anfärbung des ganzen Nerven, die in Negativkontrollen fehlte. Die nach Läsionen auftretende Vernarbung, die in den HE-Schnitten verfolgt wurde, entsprach den Vorgängen am N. ischiadicus, nur daß hier die Glia an der Narbenbildung beteiligt war. Sie verlor hierbei im peritraumatischen Bereich ihre strangförmige Anordnung.

Bei den folgenden Befunden am operierten N. opticus gilt die Richtungsangabe: proximal = orbitaler, mit den Perikarya in der Netzhaut in Verbindung stehender Stumpf; distal = cerebraler, von den Perikarya abgetrennter Stumpf. Die Aktivitätssteigerung der sauren Phosphatase und Succinodehydrogenase erfolgte stets nur in einem der Läsion unmittelbar anschließenden, maximal 1 mm langen Bereich. Sie war unabhängig von der Art der Läsion (partielle oder totale Durchschneidung bzw. Quetschung). Im Gegensatz zu den Befunden am N. ischiadicus beschränkte sie sich in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle auf den distalen Stumpf.

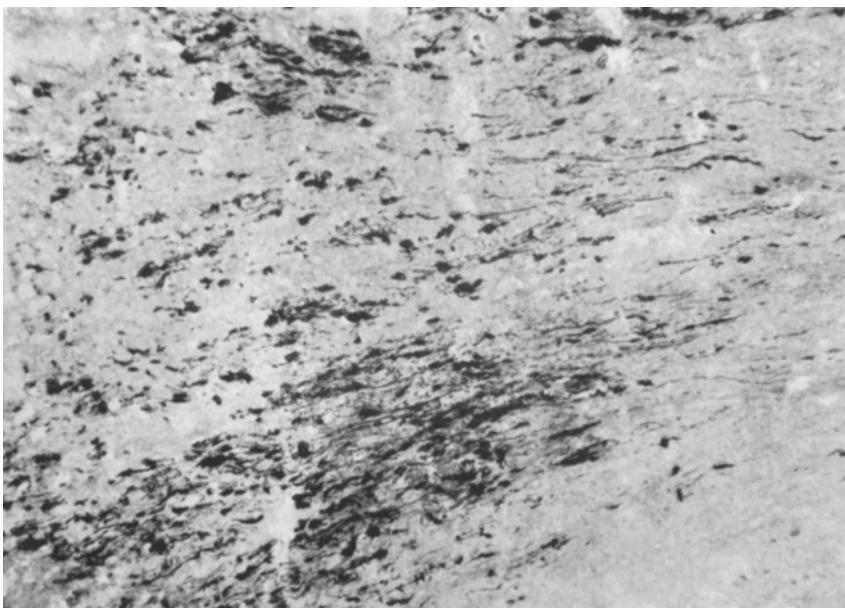


Abb.1. N. opticus, 12 Std nach part. Durchschneidung, Ausschnitt aus dist. Stumpf, saure Phosphatase und HE, Aktivität nur distal in Endkolben und anschließenden Axonstrecken, M. 200:1

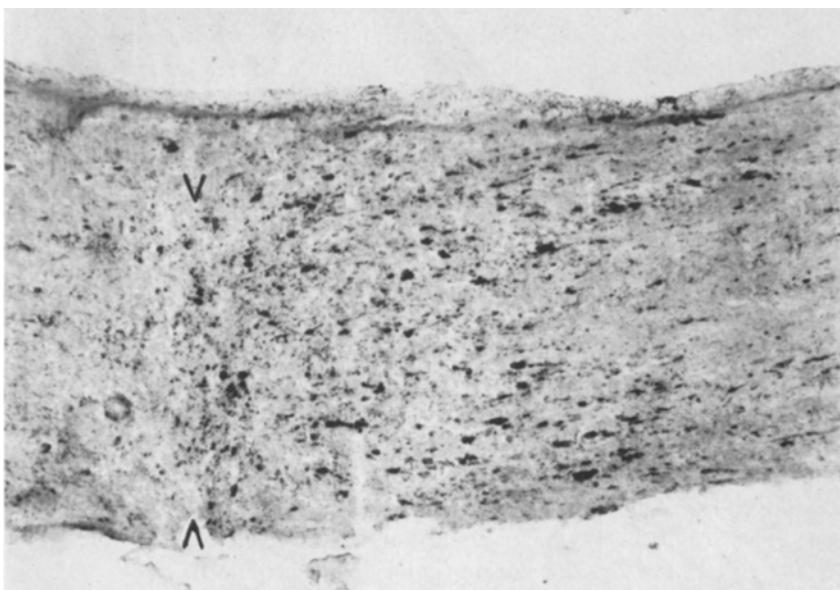


Abb.2. N. opticus, 12 Std nach part. Durchschneidung, dist. Stumpf, > < zeigt Lage der Läsion, Succinodehydrogenase, Aktivität nur distal in Endkolben und angedeutet auch in anschließenden Axonstrecken, M. 160:1

b) 6 Std nach der Läsion zeigten fast alle durchtrennten Fasern des distalen Stumpfes eine Aktivitätszunahme der sauren Phosphatase in Form von schwarz gefärbten, kugel- bis keulenförmigen Axonverdickungen in wechselndem Abstand von der Läsion. Im unmittelbar daran anschließenden, läsionsabgewandten Verlauf entsprechender Axone kamen auf kurze Strecken vereinzelt ebenfalls positiv reagierende Axonabschnitte normalen Kalibers vor. Die Succinodehydrogenase zeigte noch keine Aktivitätszunahme. Der proximale Stumpf war unverändert.

c) Nach 12 Std war ebenfalls nur im distalen Stumpf eine starke, nun alle geschädigten Fasern erfassende Zunahme der Aktivität der sauren Phosphatase und der Succinodehydrogenase festzustellen. Bei Darstellung der sauren Phosphatase waren die Endkolben größer und zahlreicher, die anschließenden, normal dicken, mitreagierenden Axonstrecken länger als nach 6 Std (Abb.1). Die Aktivitätssteigerung der Succinodehydrogenase beschränkte sich im wesentlichen auf die Endkolben, während die anschließenden, normalkalibrigen Axonabschnitte nur angedeutete Aktivität aufwiesen (Abb.2).

d) Nach 48 Std nahm die Aktivität beider Enzyme ab. Am distalen Stumpf waren die Aktivität zeigenden Axonverdickungen gegenüber dem 12 Std-Stadium kleiner und seltener. Die Mitreaktion anschließender, normal dicker Axonstrecken war bei Succinodehydrogenasedarstellung nicht mehr, bei Darstellung der sauren Phosphatase noch in geringem Umfang zu sehen (Abb.3). Wie in den vorhergehenden Zeitabschnitten war der proximale Stumpf frei von Aktivität.

e) Nach 5 Tagen war eine Aktivität beider Enzyme wiederum nur distal vorhanden. Saure Phosphatase war fast vollständig geschwunden, während Succinodehydrogenase noch gering aktiv war.

Eine *Quetschung* des N. opticus (Abb.4), nach 18 Std untersucht, ergab bei maximaler Aktivität beider Enzyme in den Endkolben — saure Phosphatase auch in anschließenden, nicht verdickten Axonabschnitten — ein ähnliches Bild wie es schon Durchschneidungen nach 12 Std geboten hatten. Auch hier reagierte nur der distale Stumpf. Durch sehr geringfügige Vernarbungsvorgänge waren die Präparate übersichtlicher als bei Durchschneidungen. Die einzelnen Fasern waren zwar unterbrochen, die Stümpfe aber nicht voneinander getrennt, was ein Auffasern im Bereich der Läsion verhinderte.

Den bisherigen Befunden am N. opticus war die Verschonung des proximalen Stumpfes gemeinsam. Aktivitätssteigerungen beschränkten sich auf den distalen Stumpf. Abgesehen von der Schädigung im unmittelbaren Läsionsbereich waren — wie die polarisationsoptische Betrachtung zeigte — doppelbrechende Markscheiden proximal und distal stets erhalten. Die Blutversorgung im proximalen, zirkulatorisch besonders

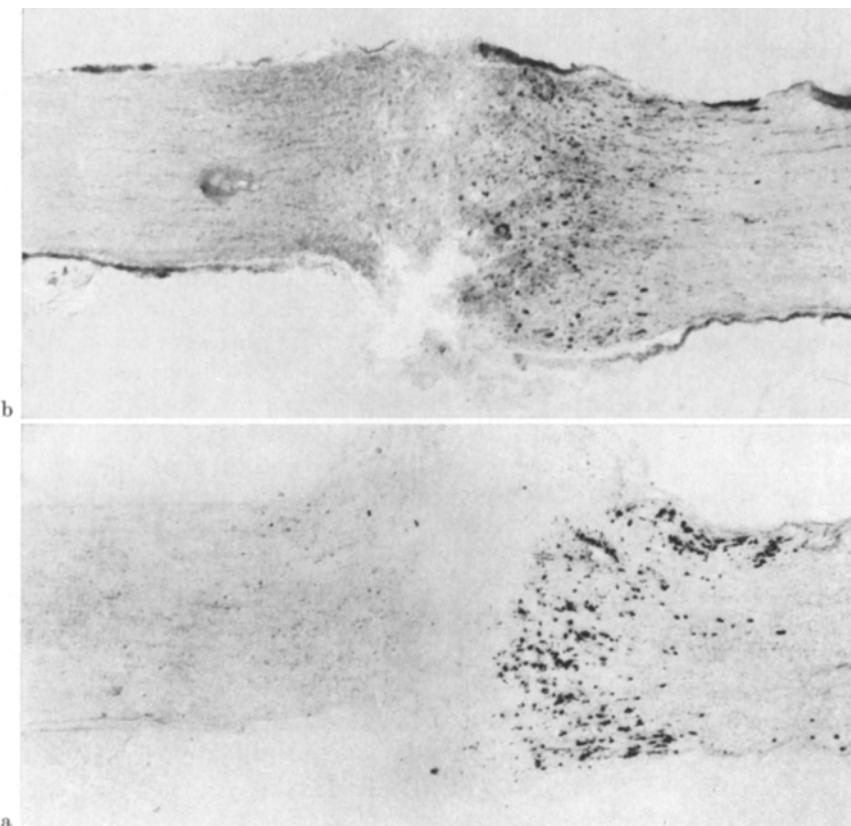


Abb. 3 a und b. N. opticus, 48 Std nach part. Durchschneidung, prox. und dist. Stumpf, Aktivität beider Enzyme nur distal, Verminderung der Zahl der Endkolben und Verkürzung bzw. Schwund der anschließenden, mitreagierenden Axonabschnitte. a saure Phosphatase, M. 52:1; b Succinodehydrogenase, M. 52:1

gefährdeten Stumpf war also nicht beeinträchtigt, so daß ausgeschlossen werden konnte, daß das Ausbleiben der proximalen Aktivitätssteigerung Folge einer ischämischen Nekrose war.

In zwei Sehnerven trat jedoch auch proximal eine Enzymaktivität auf. Der Grad der Aktivität war allerdings auch hier distal höher. Es handelte sich dabei um zwei relativ bulbusfern gesetzte Läsionen (1,75 bzw. 2,5 mm hinter dem Austritt aus dem Auge). Nach 12 bzw. 24 Std untersucht, fanden sich distal dem oben beschriebenen 12 Std-Stadium entsprechende Enzymaktivitäten. Proximal erschienen bei Nachweis saurer Phosphatase gegenüber distal weniger und kleinere Endkolben, die zudem nur eine kurze, mitreagierende, normal dicke Axonstrecke aufwiesen. Succinodehydrogenase war dagegen proximal nicht gesteigert.

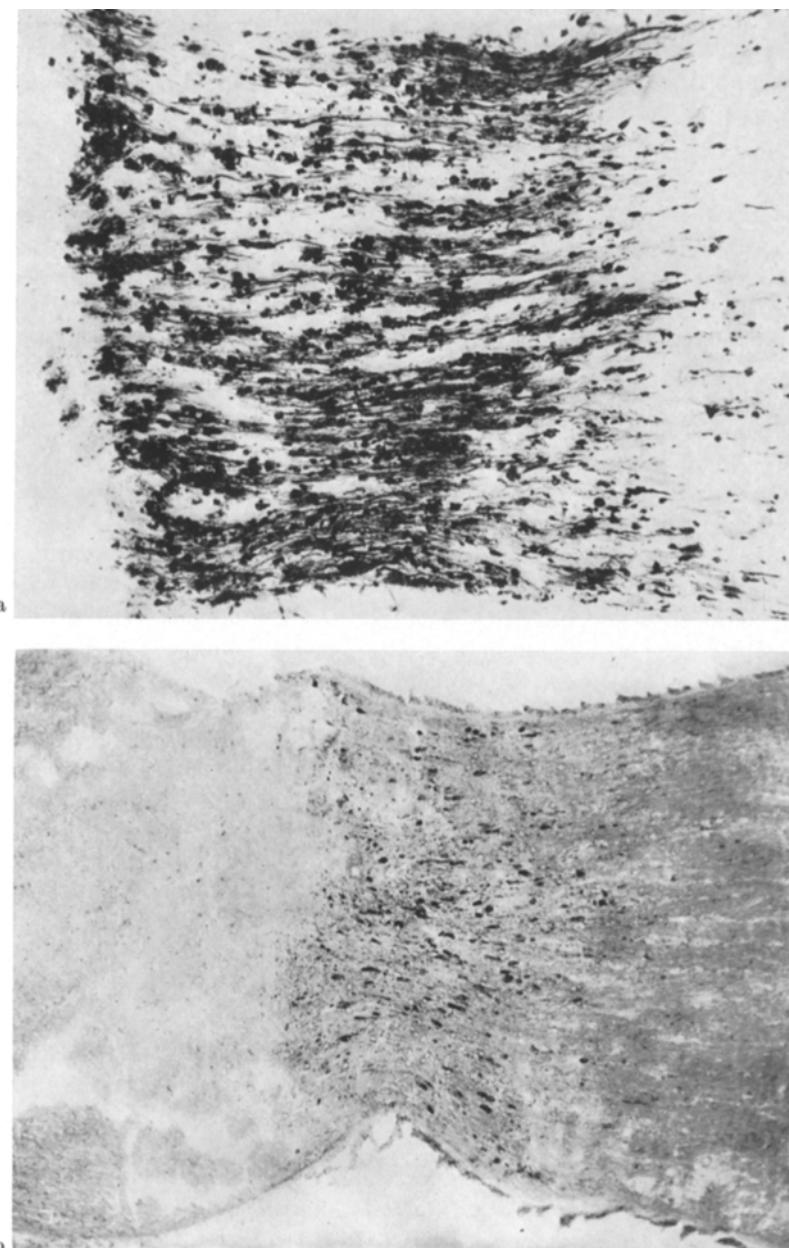


Abb. 4 a und b. N. opticus, 18 Std nach Quetschung, prox. und dist. Stumpf, Enzymaktivität nur distal der Läsion. a saure Phosphatase, M. 150:1; b Succinodehydrogenase, M. 105:1

### Diskussion

Der in früh auftretenden, läsionsnahen Axonverdickungen, d. h. in Reaktionsendkolben *proximaler Ischiadicus-Stümpfe* elektronenmikroskopisch nachgewiesene Organellenreichtum umfaßt im einzelnen neben Elementen des endoplasmatischen Reticulums Mitochondrien und sogenannte „dense bodies“ [3, 8, 17, 40]. Während die Mitochondrien unter anderem Träger des Citronensäurecyclus und damit von Succinodehydrogenase sind, konnten die „dense bodies“ als Lysosomen und Träger hydrolytischer Enzyme, unter anderem der sauren Phosphatase, identifiziert werden [17]. Dieser Vermehrung von Zellorganellen in den Reaktionsendkolben entspricht die hier auftretende Aktivitätssteigerung der sauren Phosphatase [13] und Succinodehydrogenase [12, 22], wie sie bei den eigenen Untersuchungen das 6- und 12 Std-Stadium ergeben hat. Vom 2. Tag ab weisen die Reaktionsendkolben regressive Veränderungen auf. Die unregelmäßige Aufreibung der Axone mit anschließendem Zerfall in Axonkugeln, die noch eine Zeit lang eine milde Enzymaktivität erkennen lassen, beschränkt sich jedoch auf die von den Reaktionsendkolben eingenommenen, läsionsnahen Axonabschnitte [3]. Gleichzeitig werden durch fortschreitende reaktive Umwandlung nun auch läsionsfernerer Faseranteile läsionsferne Axonverdickungen, die Wachstumsendkolben, gebildet [3]. Untergang von Reaktionsendkolben und Bildung von Wachstumsendkolben ist bei den eigenen Untersuchungen vor allem im 48 Std-Stadium erfaßt worden. Wachstumsendkolben und die aus ihnen um den 3.—4. Tag vorwachsenden, jungen Axonsprosse sind wiederum durch besonderen Reichtum an Zellorganellen ausgezeichnet [2, 3, 8, 40] und weisen, wie das 5 Tage-Stadium zeigt, eine voll erhaltene Succinodehydrogenaseaktivität auf [12, 22]. Den eigenen Beobachtungen zufolge enthalten sie in diesem Stadium keine saure Phosphatase mehr.

Wie elektronenmikroskopische Untersuchungen *proximaler Opticus-Stümpfe* durch SCHLOTE [33] gezeigt haben, enthalten die auch hier regelmäßig auftretenden Axonverdickungen nur normales, organellenarmes Axoplasma, sofern die Läsion perikaryonnah erfolgt. Diesen elektronenmikroskopischen Erfahrungen entsprechen unsere negativen, enzymhistochemischen Befunde. Nur bei perikaryonfernen Läsionen sind Organellenvermehrung [33] und Zunahme von Enzymaktivität zu beobachten, die aber bisher stets geringer waren als distal. Unter den hier gegebenen Versuchsbedingungen unterscheiden sich der N. ischiadicus und der N. opticus an ihren proximalen Stümpfen also erheblich.

Die Veränderungen an den *distalen Ischiadicus- und Opticus-Stümpfen* entsprechen sich dagegen. An beiden Objekten treten mit einem Maximum nach 12—24 Std schon frühzeitig Reaktionsendkolben auf, die im Gegensatz zu den stets direkt läsionsbenachbarten Reaktionsendkolben proximaler Ischiadicus-Stümpfe in wechselndem Abstand von der

Läsion erscheinen, insgesamt aber auf deren engere Umgebung beschränkt bleiben. Entsprechend der in ihnen elektronenmikroskopisch nachgewiesenen Vermehrung von Mitochondrien und sogenannten „dense bodies“ = Lysosomen [17, 32, 33, 38] nimmt die Aktivität der Succinodehydrogenase und sauren Phosphatase zu. Dies ist am N. ischiadicus bekannt [4, 11–13, 21] und in den eigenen Untersuchungen bestätigt bzw. am N. opticus erstmals nachgewiesen worden. Formal bestehen allerdings zwischen den Reaktionsendkolben distaler Ischiadicus- und Opticus-Stümpfe Unterschiede. Die schon normalerweise dickeren Axone des N. ischiadicus werden relativ weniger als am N. opticus verbreitert, dafür aber im Bereich eines längeren Streckenabschnittes. Die Aktivitätssteigerung der sauren Phosphatase und Succinodehydrogenase beschränkt sich auf diese Axonverdickungen, während die anschließenden, normalkalibrigen Axonabschnitte enzymfrei bleiben. Enzymhistochemisch stellen sich so die Reaktionsendkolben distaler Ischiadicus-Stümpfe als langgestreckte, plumpe Gebilde ohne Fortsätze dar. Auch die proximalen Reaktionsendkolben weisen diese Form auf. Am N. opticus zeigen auch die normalkalibrigen, an die kugelförmigen Axonverdickungen anschließenden Axonstrecken eine Aktivität saurer Phosphatase, deren enzymhistochemische Darstellung somit kleine Kugeln mit jeweils einem langen, dünnen Fortsatz ergibt. Auch der in zwei Fällen proximal aufgetretenen Aktivität lag der gleiche Verteilungstyp zugrunde. Während an „proximalen“ und „distalen“ Stümpfen langer Rückenmarksbahnen zu entsprechenden Zeitpunkten auch für Succinodehydrogenase ähnliche Bilder gefunden wurden [20], war ihre Aktivität am N. opticus mehr auf die Axonverdickungen beschränkt. Als Ausdruck der beginnenden sekundären Degeneration sieht man ab dem 2. Tag an den distalen Reaktionsendkolben sowohl des Ischiadicus [17, 38] als auch des Opticus [32, 33] gleichartige regressive Veränderungen, die mit rascher Abnahme der Enzymaktivität einhergehen. Die Reaktionsendkolben distaler Ischiadicus-Stümpfe zerfallen dabei in sogenannte Axonkugeln, die des N. opticus werden kleiner und die anschließenden, normal dicken, mitreagierenden Axonstrecken verkürzen sich, bis nach 5 Tagen in beiden Nerven und für beide Enzyme distal praktisch keine Aktivität mehr vorhanden ist. Gleichzeitig verfallen auch die übrigen, zuvor nicht reaktiv veränderten Axonanteile der distalen Stümpfe beider Nerven nach und nach der sekundären Degeneration, die am N. ischiadicus wesentlich schneller voranschreitet als am N. opticus [26, 27, 39]. Eine dabei erneut auftretende Aktivität saurer Phosphatase ist nicht mehr axonaler Herkunft, sondern in Schwannschen bzw. Glia-Zellen lokalisiert, die Axon- und Markscheidentrümmer abräumen [13, 16, 27, 30]. Die folgenden Abbildungen 5 und 6 geben einen schematischen Überblick über den Ablauf der von uns bei histochemischen Nachweisen der sauren Phosphatase

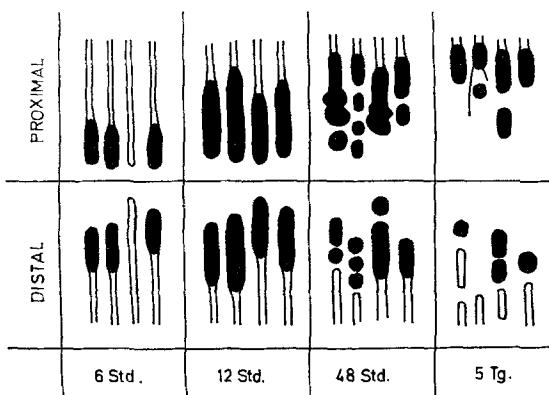


Abb.5. N. ischiadicus, 6-, 12-, 48 Std- und 5 Tage-Stadium: Bildung proximaler und distaler Reaktionsendkolben und deren Zerfall in Axonkugeln. Bildung proximaler Wachstumsendkolben und beginnende Regeneration mit jungen Axonsprossen im proximalen Stumpf. Sekundäre Degeneration des distalen Stumpfes

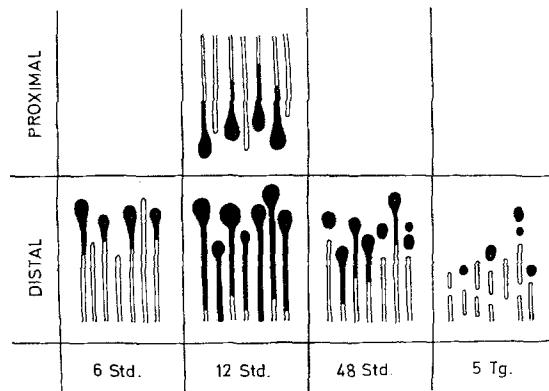


Abb.6. N. opticus, 6-, 12-, 48 Std- und 5 Tage-Stadium: Bildung distaler Reaktionsendkolben mit anschließenden, mitreagierenden Axonstrecken. Es ist außerdem die in zwei Fällen auch proximal beobachtete Enzymaktivität mit Axonveränderungen angegeben. Sekundäre Degeneration des distalen Stumpfes

und Succinodehydrogenase gefundenen Axonveränderungen. Die schwarz ausgefüllten Anteile deuten dabei hier vorhandene Enzymaktivität an.

In der bisherigen Literatur wurde schon mehrfach die Frage behandelt, ob die Zunahme von Zellorganellen und die Aktivitätssteigerung der Enzyme in Reaktionsendkolben proximaler Stümpfe Ausdruck der Stauung des proximo-distalen Axoplasmastromes [41] sein können. Bei einer Geschwindigkeit des Axoplasmastromes von 1–2 mm pro Tag am peripheren Nerven der Vertebraten ließe sich eine so rasche und umfangreiche Zunahme der Zellorganellen nicht ausreichend erklären. Außerdem

wäre dabei für die Reaktionsendkolben distaler Stümpfe eine Umkehr des normalen, proximo-distalen Axoplasmastromes vorauszusetzen. Daneben wurde ein präformierter, bidirekionaler Axoplasmastrom [25] oder eine durch Verletzungsströme induzierte Elektrophorese von Plasmaläsionsbenachbarter Axonabschnitte [10] diskutiert. Gegenüber dem passiven Aufstau von präexistenten Organellen am Ort der Läsion wird heute von den meisten Autoren eine Neubildung der Organellen an Ort und Stelle angenommen. Die hierfür erforderliche, enorme, lokale Eiweißsynthese war in Anbetracht des ribosomenfreien, endoplasmatischen Reticulums lange schwer vorstellbar. In jüngster Zeit werden jedoch synthetische Leistungen des Axoplasmas mit Aufbau von Polypeptiden auf einem nicht durch Ribonucleinsäuren gesteuerten Weg diskutiert [43]. Außerdem wird über das Vorkommen löslicher Ribonucleinsäuren des ribosomalen Typs im Axoplasma berichtet [18, 19]. Ferner steht heute fest, daß Mitochondrien aufgrund der in ihnen enthaltenen Desoxyribonucleinsäuren die Fähigkeit zur Autoreduplikation besitzen [28, 36]. Die rasche, lokale, vom Perikaryon unabhängige Neubildung von Zellorganellen wird unter Berücksichtigung dieser Befunde verständlich. Die Bildung der proximal und distal gleichartig auftretenden Reaktionsendkolben ist somit als selbständige Leistung der Axonstümpfe und als lokale, reaktive Antwort auf die Läsion anzusehen. Die mit der Organellenvermehrung in den Reaktionsendkolben einhergehende Stoffwechselsteigerung erhält in der Succinodehydrogenaseaktivität ein Maß für die oxydativ energiegewinnenden Prozesse des Citronensäurecyclus. Das hier außerdem beobachtete Auftreten axonaler saurer Phosphatase darf nicht als Zeichen regressiver, Markscheiden abbauender Vorgänge angesehen werden. Ihre Aktivitätszunahme muß vielmehr wahrscheinlich als Ausdruck der zur Erhaltung des gesteigerten Stoffwechsels benötigten, hydrolytischen Spaltung lokal vorhandener Makromoleküle in weiter verwertbare Stoffe betrachtet werden [17]. Dafür spricht das örtlich begrenzt bleibende Erscheinen saurer Phosphatase in den Reaktionsendkolben distaler Stümpfe, deren Fasern später ausnahmslos und in ihrer gesamten Länge der sekundären Degeneration anheimfallen, ohne dabei axonale, wohl aber in Schwannschen bzw. Glia-Zellen lokalisierte Aktivität zu zeigen.

Zum Untergang der Reaktionsendkolben kommt es nach Erschöpfung der lokal vorhandenen Energiereserven. Er erfolgt distal früher und rascher als die sekundäre Degeneration der übrigen Axonanteile des distalen Stumpfes, da durch den gesteigerten Stoffwechsel der Reaktionsendkolben bei unterbrochener Versorgung vom Perikaryon her die lokal vorhandenen Energiereserven hier vermutlich schneller aufgebraucht sind als in den übrigen Axonanteilen. Die durch die sogenannte primäre Zellreizung gesteigerte Syntheseleistung im Perikaryon und die damit

verbundene ausreichende Bereitstellung von Energiereserven und Eiweißbausteinen über den normalen, proximo-distalen Plasmastrom wirkt sich erst nach einer gewissen Zeit auf die läsionsnahen, besonders stoffwechselaktiven Axonabschnitte aus. Daher gehen auch die proximalen Reaktionsendkolben zugrunde. Hier schreitet aber die begonnene, reaktive Axoplasmaumformung mit Organellenvermehrung fort und erfaßt auch läsionsfernere Axonstrecken des proximalen Stumpfes, bis die inzwischen hier wirksam gewordene gesteigerte Syntheseleistung der zugehörigen Perikarya die Erhaltung der so gebildeten Wachstumsendkolben und das Auswachsen junger Axonsprosse erlaubt. Deren hohe Succinodehydrogenaseaktivität ist wiederum Zeichen ihres gesteigerten Stoffwechsels. Ihr fehlender Gehalt an saurer Phosphatase macht deutlich, daß sie nicht wie die Reaktionsendkolben lokal vorhandene Energie- und Stoffreserven mobilisieren müssen, sondern vom Perikaryon ausreichend versorgt werden.

Unsere Ergebnisse zeigen, daß die Veränderungen am distalen Stumpf des N. ischiadicus und N. opticus grundsätzlich gleich sind und zusammen mit den Veränderungen am proximalen Ischiadicus-Stumpf den entsprechenden, oben beschriebenen, allgemeinen Vorgängen nach Schädigung von Nervenfasern folgen. Das davon abweichende Verhalten des proximalen Opticus-Stumpfes ist auf die geringe Entfernung der Läsionen vom Perikaryon zurückzuführen. Während am N. ischiadicus mit Durchschneidungen in Höhe des Oberschenkels perikaryonferne Läsionen leicht möglich sind, lassen sich am N. opticus wegen operations-technischer Schwierigkeiten mit maximal 2,5 mm hinter dem Auge nur relativ perikaryonnahe Läsionen erreichen. Bei diesen augapfelnahen Läsionen scheint die lokale Neubildung von Zellorganellen und die damit verbundene Enzymaktivitätssteigerung in proximalen Opticus-Stümpfen unter einem hemmenden Einfluß des Perikaryons zu stehen. Die hier auftretenden, organellenarmen Axonverdickungen [33] entstehen offenbar nur durch Stau der Axoplasmaströmung.

Den Befunden bei perikaryonfernen Läsionen des N. opticus folgend ist zu erwarten, daß bei noch perikaryonferneren Läsionen und damit mehr und mehr verminderter Hemmung der proximalen Neubildung von Zellorganellen sich auch proximal Organellenreichtum und Enzymaktivität zeigende Axonverdickungen, echte Reaktionsendkolben, entwickeln und daß perikaryonnahe Läsionen am N. ischiadicus, bei denen es durch Schädigung der Perikarya zu keiner Regeneration kommt, proximale Reaktionsendkolben vermissen lassen. Dies zu prüfen, wäre Aufgabe weiterer Untersuchungen. Je weiter die Läsion einer Nervenfaser vom zugehörigen Perikaryon entfernt ist, um so größer ist offenbar die sich in lokaler Neubildung von Zellorganellen und einer damit verbundenen Enzymaktivitätssteigerung äußernde Autonomie der reaktiven Vorgänge

in läsionsbenachbarten Axonabschnitten proximaler Nervenstümpfe. Am distalen Stumpf ist diese Autonomie infolge der Abtrennung vom Perikaryon bei Läsionen in jeder Entfernung gegeben. So stellen sich abschließend die nach experimenteller Läsion des N. ischiadicus und N. opticus auftretenden, zuerst so unterschiedlich imponierenden Axonveränderungen am proximalen Stumpf nicht als im peripheren und im zentralen Nervensystem unterschiedliche, sondern als grundsätzlich gleichartige Prozesse dar, die lediglich bei größerer Nähe des Perikaryons eine Abwandlung bzw. weitgehende Unterdrückung erfahren.

### Zusammenfassung

Die Aktivität der sauren Phosphatase als lysosomales und der Succinodehydrogenase als mitochondriales Leitenzym wurde enzymhistochemisch an den proximalen und distalen Stümpfen experimentell geschädigter Nn. ischiadicus bzw. Nn. optici der Ratte geprüft. Untersucht wurde jeweils 6, 12, 48 Std und 5 Tage nach der Läsion.

Am Ischiadicus wie am Opticus laufen an den distalen Stümpfen gleichartige Veränderungen ab: Bereits im 6 Std-Stadium tritt in den läsionsnahen Reaktionsendkolben eine Aktivität der sauren Phosphatase und Succinodehydrogenase auf und erreicht nach 12 Std ein Maximum. Nach 48 Std schwindet im Rahmen der einsetzenden regressiven Veränderungen die Aktivität, bis nach 5 Tagen keine axonale Aktivität mehr nachweisbar ist.

Am proximalen Ischiadicus-Stumpf steigt die Aktivität ähnlich an. Hier findet sich nach 48 Std eine Aktivität beider Enzyme außer in den zum Teil schon regressiv veränderten, läsionsnahen Reaktionsendkolben auch in läsionsferneren, nun sich ebenfalls verdickenden Axonabschnitten, den Wachstumsendkolben. Im 5 Tage-Stadium zeigen diese Wachstumsendkolben als Orte der Regeneration nur noch Succinodehydrogenaseaktivität.

Der proximale Opticus-Stumpf zeigt im Gegensatz hierzu keine Aktivität der sauren Phosphatase bzw. Succinodehydrogenase, da die ausgeführten Läsionen insgesamt zu perikaryonnah liegen. Für diese perikaryonnahen Schädigungen muß ein die Reaktion hemmender Einfluß des Perikaryons angenommen werden.

Die Ergebnisse der Enzymhistochemie entsprechen elektronenmikroskopischen Beobachtungen.

### Summary

The enzyme histochemistry of proximal and distal axon stumps of the sciatic and optic nerve of adult rats was investigated 6, 12, 48 hours and 5 days after experimental traumatic lesions (semi-transsection or

contusion). Acid phosphatase was tested as an indicator for lysosomal activity, succinic dehydrogenase as an indicator for mitochondrial activity.

In the distal axonal stumps, sciatic and optic nerve reveal comparable results: after 6 hours the enlarged end-bulbs display striking activity of both enzymes, which increases further in the following hours. Maximal enzyme activity was observed between 12 and 48 hours after the lesion. Thereafter, the activity decreased, disappearing completely within 5 days.

The proximal stumps of transected sciatic nerve behave similarly to their distal stumps. In contrast to this the proximal stumps of optic nerve show no acid phosphatase and succinic dehydrogenase activity during the post-lesions days. Ischemic necrosis of the tissue could be eliminated as a causative factor. It is supposed that in the case of axonal lesions in the vicinity of the pericaryon, an inhibitory influence is effected by the neuron preventing an axonal reaction. This inhibition would not be efficient in axon segments far from the pericaryon.

The enzyme histochemical observations correspond well with the results of electron microscope studies.

### Literatur

1. BARTELMEZ, G. W., and S. H. BENSLEY: "Acid phosphatase" reactions in peripheral nerves. *Science* **106**, 639—641 (1947).
2. BLÜMCKE, S.: Zur Histochemie und Feinstruktur der Wachstumsendkolben peripherer Nervenregenerate. *Verh. dtsch. Ges. Path.*, **48**. Tg., 268—273 (1964).
3. —, u. H. R. NIEDORF: Elektronenoptische Untersuchungen über die Feinstruktur der „Neurofilamente“ in der normalen und regenerierenden peripheren Nervenfaser. *Beitr. path. Anat.* **130**, 133—157 (1964).
4. BUBIS, J. J., and M. WOLMAN: Hydrolytic enzymes in Wallerian degeneration. *Israel J. Med. Sci.* **1**, 410—414 (1965).
5. CAJAL, R. S. y: *Degeneration and regeneration of the nervous system*. London: Univ. Press 1928.
6. CHRIST, J. F.: The early changes in the hypophysial neurosecretory fibers after coagulation. *Mem. Soc. Endocrin.* **12**, 125—147 (1962).
7. —, u. H. NEMETSCHEK-GANSLER: Zur Ultramorphologie der Veränderungen im neurosekretorischen System nach Koagulation des Hypophysenstieles. *Z. Naturforsch.* **20b**, 278 (1965).
8. ESTABLE, C., W. ACOSTA-FERREIRA, and J. R. SOTELO: An electronmicroscope study of the regenerating nerve fibers. *Z. Zellforsch.* **46**, 387—399 (1957).
9. FRIEDE, R. L.: Transport of oxydative enzymes in nerve fibers; a histochemical investigation of the regenerative cycle in neurons. *Exp. Neurol.* **1**, 441—466 (1959).
10. — Electrophoretic production of "reactive" axon swellings in vitro and their histochemical properties. *Acta neuropath. (Berl.)* **3**, 217—228 (1964).
11. GOULD, R. P., and S. J. HOLT: Observations on acid phosphatase and esterases in the rat sciatic nerve undergoing Wallerian degeneration. In: *Symposium on the cytology of nervous tissue*, p. 45. London: Taylor and Francis 1961.

12. HANEFELD, F.: Histochemisch nachweisbare Veränderungen im Enzymmuster des Nerven nach experimenteller Durchtrennung. *Dtsch. Z. Nervenheilk.* **188**, 357—383 (1966).
13. HEINZEN, B.: Acid phosphatase activity in transsected sciatic nerve. *Anat. Rec.* **98**, 193—207 (1949).
14. HILD, W.: Experimentell-morphologische Untersuchungen über das Verhalten der „Neurosecretorischen Bahn“ nach Hypophysenstiel durchtrennungen, Eingriffen in den Wasserhaushalt und Belastung der Osmoregulation. *Virchows Arch. path. Anat.* **319**, 526—546 (1951).
15. —, u. G. ZETTLER: Experimenteller Beweis für die Entstehung der sogenannten Hypophysenhinterlappenwirkstoffe im Hypothalamus. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **257**, 169—201 (1953).
16. HOLLINGER, D. M., and H. UPMALIS: Chemical studies of peripheral nerve during Wallerian degeneration; 4. Phosphatases. *Biochem. J.* **52**, 652—659 (1952).
17. HOLTZMAN, E., and A. B. NOVIKOFF: Lysosomes in the rat sciatic nerve following crush. *J. Cell Biol.* **27**, 651—669 (1965).
18. KOENIG, E.: Synthetic mechanisms in the axon. I. Local axonal synthesis of AChE. *J. Neurochem.* **12**, 343—355 (1965).
19. — Synthetic mechanisms in the axon. II. RNA in myelin-free axons of the cat. *J. Neurochem.* **12**, 357—361 (1965).
20. KREUTZBERG, G.: Enzymhistochemische Veränderungen in Axonen des Rückenmarks nach Durchschneidung der langen Bahnen. *Dtsch. Z. Nervenheilk.* **185**, 308—318 (1963).
21. — Das Verhalten oxydatischer Enzyme in peripheren Nerven bei der sekundären Degeneration. *Arch. Psychiat. Nervenkr.* **206**, 281—292 (1964).
22. —, u. W. WECHSLER: Histochemische Untersuchungen oxydatischer Enzyme am regenerierenden Nervus ischiadicus der Ratte. *Acta neuropath. (Berl.)* **2**, 349—361 (1963).
23. LAMPERT, P., and M. CRESSMAN: Axonal regeneration in the dorsal columns of the spinal cord of adult rats. An electronmicroscopic study. *Lab. Invest.* **13**, 825—839 (1964).
24. LASSEK, A. M., and W. L. HARD: Acid phosphatase in growing axons and degenerating nervous tissue. *Science* **102**, 123—124 (1944).
25. LUBINSKA, L.: Axoplasmatic streaming in regenerating and in normal nerve fibers. In: *Mechanisms of neural regeneration*. *Progr. Brain Res.* **13**, 1—71. Amsterdam: Elsevier 1964.
26. LUSE, S. A., and R. E. McCAMAN: Electron microscopy and biochemistry of Wallerian degeneration of the optic and tibial nerves. *Amer. J. Path.* **33**, 536 (1957).
27. McCAMAN, R. E., and E. ROBINS: Quantitative biochemical studies of Wallerian degeneration in the peripheral and central nervous systems. II. Twelve enzymes. *J. Neurochem.* **5**, 32—42 (1959).
28. NASS, M. M. K., and S. NASS: Intramitochondrial fibers with DNA-characteristics. *J. Cell Biol.* **19**, 593—629 (1963).
29. ROMANUL, F. C. A., and R. B. COHEN: A histochemical study of dehydrogenases in the central and peripheral nervous system. *J. Neuropath. exp. Neurol.* **19**, 135—136 (1960).
30. SAMORAJSKI, T.: Changes in phosphatase activity following transsection of the sciatic nerve. *J. Histochem. Cytochem.* **5**, 15—27 (1957).
31. SCHLOTE, W.: Die läsionsbedingten primär retrograden Veränderungen der Axone zentraler Nervenfasern im elektronenmikroskopischen Bild. *Acta neuropath. (Berl.)* **4**, 138—157 (1964).

436 E. METZ: Enzymhistochemische Befunde am lädierten Nervus opticus

32. SCHLOTE, W.: Der Aufbau von Schichtenkörpern im Axoplasma durchtrennter Opticusfasern distal der Läsion. *J. Ultrastruct. Res.* **16**, 548—568 (1966).
33. — Die progressiven und regressiven Strukturveränderungen des Nervus opticus der Ratte nach experimentellen Läsionen. *Habilitationsschrift*, Tübingen 1967.
34. SPIELMEYER, W.: *Histopathologie des Nervensystems*. Berlin: Springer 1922.
35. THOMAS, E.: Histochemie am peripheren Nervensystem. *Proceed. V. Internat. Congr. Neuropath.*, S. 396—404. Zürich 1965.
36. TUPPY, H., u. E. WINTERSBERGER: Mitochondrien als Träger genetischer Information. In: SITTE, P. (Hrsg.): *Probleme der biologischen Reduplikation*, S. 324—339. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1966.
37. WALLER, A.: Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibers. *Phil. Trans. B* **140**, 423—429 (1850).
38. WEBSTER, H. F. DE: Transient, focal accumulation of axonal mitochondria during the early stages of Wallerian degeneration. *J. Cell Biol.* **12**, 361—377 (1962).
39. WECHSLER, W., u. H. HAGER: Elektronenmikroskopische Untersuchung der Wallerschen Degeneration des peripheren Säugetiernerven. *Beitr. path. Anat.* **126**, 352—380 (1962).
40. — — Elektronenmikroskopische Befunde zur Feinstruktur von Axonveränderungen in regenerierenden Nervenfasern des Nervus ischiadicus der weißen Ratte. *Acta neuropath. (Berl.)* **1**, 489—506 (1962).
41. WEISS, P.: The concept of perpetual neuronal growth and proximodistal convection. In: KETY, S. S., and J. ELKES (Ed.): *Regional Neurochemistry*, pp. 220—242. Oxford-London-New York-Paris: Pergamon Press 1961.
42. WOLF, A., E. A. KABAT, and W. NEWMAN: Histochemical studies on tissue enzymes. III. A study of the distribution of acid phosphatases with special reference to the nervous system. *Amer. J. Path.* **19**, 423—439 (1943).
43. ZAMBRANO, D., and E. DE ROBERTIS: The secretory cycle of supraoptic neurons in the rat. *Z. Zellforsch.* **73**, 414—431 (1966).

ECKART METZ  
Institut für Hirnforschung  
der Universität Tübingen  
74 Tübingen, Calwerstraße 3

Sonderdruckanforderungen an:  
Prof. Dr. J. PEIFFER  
Direktor des Institutes für Hirnforschung  
der Universität Tübingen  
74 Tübingen, Calwerstraße 3