(Aus der Provinzialheilanstalt Suttrop-Warstein und der Deutschen Forschungsanstalt für Psychiatrie in München.)

Über eine neue Methode der Gliafaserfärbung¹⁾.

Von

Dr. W. Holzer,

Oberarzt an der Provinzialheilanstalt Suttrop (Direktor: Dr. F. Hegemann).

Mit 12 Textabbildungen.

(Eingegangen am 5. März 1921.)

Wohl jeder, der die Weigertsche Gliafärbung benutzt, hat häufig gute Ergebnisse erzielt und sich an den schönen Bildern erfreut, welche die Methode liefert; jeder hat aber sicherlich auch häufig Mißerfolge gehabt und verschwommene Bilder erhalten, die keinen Einblick in den Umfang und die Art der glösen Strukturen gewährten. Insbesondere gilt dieses für die Färbung der Großhirnrinde, und dieses hat mich veranlaßt, zu versuchen, ob nicht eine Verbesserung der Methode möglich sei.

Der erste Schritt vorwärts schien getan, als eine Verbindung der Weigertschen Methode mit der alten Malloryschen Methode der Faserfärbung versucht wurde. Ein wesentlicher Faktor der Malloryschen Methode ist offenbar die Phosphormolybdänkomponente. Die Schnitte wurden deshalb vor der Behandlung nach Weigert in eine 1proz. Phosphormolybdänlösung gebracht, und in vielen Fällen wurde ein erheblich deutlicheres Hervortreten der Gliafasern gefunden. Gleichzeitig mit den besser zur Darstellung gebrachten Fasern traten aber auch starke Niederschläge auf, die es zu beseitigen galt. Sehr bald zeigte sich, daß bei der Verwendung von Molybdän die Vorbehandlung in Kupfer nicht nötig war. Es konnten ohne weiteres Formolgefrierschnitte benutzt werden, die eben mit dem Gefriermikrotom geschnitten waren. Ebenso zeigte sich, daß die starke Jodlösung vermindert werden konnte; ja es brauchte überhaupt kein freies Jod mehr benutzt zu werden, es genügte eine 10proz. Jodkalium- oder Bromkaliumlösung. Bei der Prüfung der Farbe ergab sich, daß anstatt des sehr variablen Methyl-

¹⁾ Vgl. den Bericht aus den wissenschaftlichen Sitzungen der Deutschen Forschungsanstalt für Psychiatrie in München (Zentralbl. f. d. ges. Neurol. u. Psychiatr. **25**, S. 360).

violetts besser das chemisch fester bestimmte Krystallviolett in Anwendung kam.

Einen wesentlichen Fortschritt bedeutete die Anwendung von Chloroform anstatt Xylol bei der Zusammensetzung der Differenzierungsflüssigkeit. Auch als Lösungsmittel für den Farbstoff erwies sich das Chloroform sehr brauchbar. Nach vielen Versuchen zeigte sich, daß der Zusatz von geringen Mengen Alkalien sowohl zur Bromlösung wie zur Differenzierungsflüssigkeit sehr günstig auf das scharfe Hervortreten der Fasern im Bilde einwirkte.

Alle diese Veränderungen trugen wesentlich dazu bei, das Bild immer klarer zu machen; immerhin blieb bei der Färbung der Hirnrinde noch immer ein sehr störender Gegensatz zwischen der Färbbarkeit der Rinde und des Markes bestehen. Die Rinde hält bei der Differenzierung den Niederschlag viel zäher fest, so daß die Fasern im Mark verblaßt sind, wenn die Rinde durchgearbeitet ist; läßt man die Niederschläge in der Rinde bestehen, so sind die Präparate wenig haltbar, weil sich die Niederschläge bald lösen und die Präparate verderben. Zur Beseitigung dieses Mißstandes erwies sich als außerordentlich förderlich, die Schnitte, die aus der Molybdänlösung kamen, abzutupfen mit Löschpapier, das getränkt ist mit der Flüssigkeit, in der die Farbe aufgelöst wird. Man drückt das angefeuchtete Papier mehrmals fest auf das Präparat, das auf dem Objektträger ausgebreitet ist. Hierdurch wird auch bewirkt, daß die Schnitte fest am Objektträger haften.

Auf diese Weise kam schließlich eine brauchbare Methode zustande, bei der sich am besten etwa folgendes Vorgehen bewährt hat:

Die Formolgefrierschnitte (auf andere Konservierungsmittel komme ich zurück) werden in eine Lösung gebracht, die zur Hälfte aus 1proz. wässriger Phosphormolybdänlösung, zur Hälfte aus absolutem oder auch 96proz. Alkohol besteht. Zu je etwa 20 ccm dieser Flüssigkeitsmischung kommen 2 Tropfen konzentrierte Essigsäure. Die Lösung ist wenig haltbar und verdirbt nach einigen Tagen. In dieser Lösung bleiben die Schnitte 1—2 Minuten. Sie werden nun auf dem Objektträger aufgefangen; die Flüssigkeit wird so weit entfernt, daß die Schnitte flach auf dem Objektträger liegen, aber noch feucht sind. Das Trockenwerden der Schnitte ist dringend zu vermeiden.

Die noch feuchten Schnitte werden abgetupft mit Löschpapier, das getränkt ist mit einer Mischung von 2 Teilen absolutem Alkohol plus 8 Teilen Chloroform. Es empfiehlt sich, das Abtupfen mehrmals zu wiederholen, um die Schnitte mit der Flüssigkeit gut zu durchfeuchten; dringend ist auch hier wieder zu vermeiden, daß die Schnitte eintrocknen, was bei der Verwendung von Chloroform als Lösungsmittel leicht geschieht. Rasches Arbeiten ist hier unbedingt nötig.

Auf den noch feuchten Schnitt kommen nun einige Tropfen der Farbflüssigkeit, bestehend aus 2 ccm absolutem Alkohol, 8 ccm Chloroform und 0,5 g Krystallviolett. Auf die noch feuchte Farbe (auch hier ist ein Eintrocknen dringend zu vermeiden) wird die Bromlösung gegossen. Sie besteht aus 10proz. Bromkalium; zu je etwa 30 ccm Bromlösung werden 5 Tropfen einer 1 promilligen Natronlaugelösung hinzugefügt. Beim Aufgießen dieser Lösung bildet sich auf dem Präparat ein grünliches, metallisch schimmerndes Häutchen, das durch beständiges tropfenweises Zugießen von Brom vollständig zum Schwinden gebracht werden muß. Gelingt dieses nicht, so ist der Erfolg fraglich. Nach Verschwinden des grünlichen Spiegels sieht das Präparat dunkel blauschwarz, samtähnlich aus. Man reinigt den Objektträger von überschüssigem Farbstoff und übergießt hinterher das Präparat nochmals mit etwas Bromlösung, weil beim Reinigen leicht kleine Schlieren zurückbleiben, die das Gelingen der Färbung beeinträchtigen.

Nunmehr wird der Schnitt mit Löschpapier gut abgetrocknet und mit der Differenzierungsflüssigkeit aufgehell. Diese besteht aus 4 ccm Anilin plus 6 ccm Chloroform plus 4 Tropfen einer 5proz. Natronlaugelösung. Diese Mischung wird in einem kleinen Zylinder gut umgeschüttelt, wird dann filtriert, wodurch man eine völlig klare Flüssigkeit erhält. Sie hält sich schlecht und kann höchstens einen Tag lang benutzt werden. Das Präparat wird nunmehr mit Xylol abgespült und in Xylolcanadabalsam eingebettet.

Die Färbung muß sehr rasch vonstatten gehen. Von dem Einlegen des Schnittes in die Molybdänlösung bis zum Einbetten in Balsam dürfen höchstens etwa 5 Minuten vergehen; braucht man längere Zeit, so ist irgendein Fehler gemacht. Beim Celloidinschnitt dauert die Differenzierung länger.

Im einzelnen ist folgendes zu bemerken:

Die Zusammensetzung von 2proz. absolutem Alkohol und 8proz. Chloroform der Lösungsflüssigkeit für die Farbe erwies sich als die praktisch brauchbarste. Es scheint, daß ein weiteres Steigen von Chloroform die Fasern noch ausgesprochener zutage treten läßt. Die Schwierigkeit in der Färbung steigt aber mit der Zunahme des Chloroforms bedeutend; der Schnitt schwimmt leicht weg, es treten starke Niederschläge auf. Die obengenannte Mischung erscheint deshalb als die am meisten empfehlenswerte.

Die Beseitigung des grünlichen Häutchens mit der Bromlösung bereitet gelegentlich einige Schwierigkeiten. Meistens liegt die Ursache darin, daß die Farblösung eingedickt ist, was bei der Art der Lösungsmittel leicht vorkommt. Man tut gut, in den Fällen, in denen eine einwandfreie Blauschwarzfärbung des Präparates schwer erzielbar ist, die Farbe zu verdünnen, evtl. frisch herzustellen.

Als Alkalizusatz zu der Bromlösung empfehlen sich meistens ganz geringe Mengen, wie oben angegeben. In manchen Fällen erweist sich indessen auch ein stärkerer Zusatz als empfehlenswert. Besonders scheint dies der Fall, wenn Gewebspartien, die ausschließlich aus Marksubstanz bestehen, behandelt werden sollen. Man erhält da manchmal die besten Resultate, wenn man statt einer 1 promilligen Natronlaugelösung eine weit stärkere, bis zu einer 5 proz. verwendet.

Die Differenzierung des Schnittes ist Sache der Erfahrung. Es gibt Präparate, die man einheitlich nicht differenzieren kann. Man muß dann zwei Präparate machen, in denen einmal mehr auf die Stellen mit reichlicher Gliafaserbildung, einmal mehr auf die faserarmen Stellen eingestellt wird. Die Marksubstanz entfärbt sich regelmäßig weit rascher.

Die Färbung ist keine rein elektive. Regelmäßig färbt sich auch das Bindegewebe mit, was aber meist leicht von den gliösen Strukturen zu unterscheiden ist. Mißlicher ist, daß mitunter auch Achsenzyylinder, namentlich stärkere, mitgefärbt werden. Immerhin lassen sich auch diese durch den etwas matten, pastellartigen Ton der Färbung meist unschwer unterscheiden.

Das geeignetste Konservierungsmittel für die Methode ist Formol. Ein großer Vorteil aber ist, daß die Methode auch aus Alkoholmaterial, insbesondere aus Celloidinschnitten durchaus befriedigende Resultate ergibt. Die nicht eingebetteten Alkoholschnitte werden behandelt wie die Formolschnitte. Die Celloidinschnitte drückt man auf einen Objektträger fest auf, entfernt das Celloidin durch mehrfaches Abspülen mit Methylalkohol, drückt abermals den Schnitt fest auf, legt dann den ganzen Objektträger in die Molybdänlösung und färbt dann weiter, wie oben angegeben. Bei dem Alkoholmaterial färbt sich in weit stärkerem Maße als bei Formol das Grundgewebe mit, insbesondere auch die Achsenzyylinder. Auch an Kupfermaterial gelingt die Methode leicht und gibt oft sehr schöne Resultate.

In folgendem wird eine Reihe Abbildungen wiedergegeben, die die Brauchbarkeit der Methode an einzelnen Beispielen erläutern sollen.

Abb. 1. Subcorticales Mark aus dem Stirnhirn. Fall von schwerster Sepsis (3 Tage Dauer) nach Halsfurunkel bei einem 35-jährigen Manne. Formolmaterial. Photographie. Leitz Immers. $\frac{1}{22}$

Abb. 2. Subcorticales Mark aus dem Stirnhirn. Fall von Diabetes mellitus bei einer 67-jährigen Frau. Formolmaterial. Zeichnung. Leitz Immers. $\frac{1}{12}$.

Abb. 3. Zwei Zellen aus dem subcorticalen Mark der Stirnrinde. Fall von Tumor der Schädelbasis. Gehirn stark komprimiert. Formolmaterial. Zeichnung. Leitz Immers. $\frac{1}{12}$.

Abb. 4. Zwei Zellen aus dem subcorticalen Mark der Stirnrinde; die kleinere von einem Fall von Magencarcinom bei einer 41 jährigen Frau, die größere aus einem Fall von Magencarcinom bei einer 69 jährigen Frau. Formolmaterial. Zeichnung. Leitz Immers. $\frac{1}{12}$.

Abb. 5. Erweichung der mittleren Rindenschichten aus dem Parietalhirn. Der helle mittlere Streifen: Zone der Erweichung; nach beiden Seiten Abgrenzung durch starke Gliawucherung. Celloidinmaterial. Übersichtsbild.

Abb. 6. Detailbild aus vorigem. Gliöse Wucherung gegen die Seite der Hirnoberfläche zu Celloidinmaterial. Photographie. Leitz Immers. $\frac{1}{12}$.

Abb. 7. Kleinhirnrinde aus einem Falle von angeborener Kleinhirnatrophie. Starke Gliawucherung, namentlich in den äußeren Partien der grauen Schicht. An zwei Stellen Wucherungen der Faserbündel in die Pia und Verschmelzung der Wucherungen. Celloidinmaterial. Photographie. Leitz Immers. $\frac{1}{12}$.

Abb. 8. Stelle aus dem inneren Teile des Linsenkerns bei Wilsonscher Krankheit; starke Gliawucherungen. Celloidinmaterial. Photographie. Leitz Immers. $\frac{1}{12}$.

Abb. 9. Partie aus der tieferen Rinde des Stirnhirns von einem 13-jährigen Mädchen. Erkrankte im 13. Lebensjahre plötzlich an epileptischen Krämpfen und erlag 14 Tage später einem Status epilepticus. Formolmaterial.

Abb. 10. Detailbild aus vorigem. Große Spinnzelle. Photographie. Leitz Immers. $\frac{1}{12}$.

Abb. 11. Gliawucherung aus dem Subcorticalmark eines schlafkranken Hundes. Zwölf Jahre altes (!) Formolmaterial. Photographie. Leitz Immers. $\frac{1}{12}$.

Abb. 12. Subcorticales Mark aus der Stirnrinde eines Affen. Das Tier war strumektomiert und zwei Tage später getötet worden. Photographie. Leitz Immers. $\frac{1}{12}$.