Aus dem Georg Speyer-Haus in Frankfurt a. M.
(Direktor: Wirkl. Geh. Rat Ehrlich, Exzellenz.)

Lucidol, ein neues Fixiermittel.

Von St. Szécsi.

Bekanntlich beruht die Fixation in den meisten Fällen auf einer Oxydation des Gewebes; die besten Härtungsmittel, beispielsweise die Chromsäure, sind in erster Linie Oxydatoren. Die meisten Fixatoren sind metallische Salze, die in wäßrigen Lösungen verwandt werden.¹⁾ Bei allen diesen Fixierverfahren werden gewisse wasserlösliche Elemente der Gewebe der oxydativen Wirkung des Fixiermittels entzogen. Exzellenz Ehrlich, auf dessen Anregung und unter dessen Leitung ich die hier mitzuteilenden Versuche angestellt habe, wollte nun prüfen, ob man nicht Oxydatoren finden könnte, die in nicht wäßrigen Lösungen angewandt werden können. Als die besten Oxydatoren sind nun in der Technik schon lange die organischen Superoxyde bekannt, und unter diesen besonders das Benzoylsuperoxyd (Benzoperoxyd).

Das Benzoylsuperoxyd, das unter dem Namen Lucidol in den Handel gebracht wird, wurde uns von den Vereinigten chemischen Werken in Charlottenburg für technische Zwecke zu einem sehr billigen Preise geliefert. Das Lucidol, das in der Technik als sehr energischer Oxydator verwandt wird, ist in Wasser unlöslich; Exzellenz Ehrlich wollte nun prüfen, ob

¹⁾ Auch bei den neulich veröffentlichten Versuchen Unnas, die Härtung der Gewebe durch Einführung von stark oxydativen Fixiermitteln zu verbessern, werden Chlorzink bzw. Kaliumhyperangan in wäßrigen Lösungen verwandt.

diese stark oxydative Eigenschaft und auch die Wasserunlöslichkeit des Lucidols nicht auch für die mikroskopische Technik nutzbar gemacht werden könnte. Wir hätten dann ein Fixiermittel, das als starker Oxydator unter vollkommener Vermeidung der wäßrigen Media sämtliche Gewebs- und Zellbestandteile gleichmäßig schnell und energisch oxydieren bzw. fixieren würde. Die Versuche hatten zu einem positiven Ergebnis geführt, und ich möchte im folgenden über den schon abgeschlossenen Teil derselben kurz berichten.

Lucidol ist ein festes, weißes Pulver, das durch Einwirkung von Benzoylchlorid auf H_2O_2 entsteht und die chemische Formel $C_6H_5 \cdot CO \cdot O \cdot O \cdot CO \cdot C_6H_5$ besitzt. Wie schon erwähnt wurde, ist Lucidol in Wasser vollkommen unlöslich, in Azeton und Pyridin leicht löslich. Zur Fixation kann sowohl die azetonische wie die pyridinische Lösung verwandt werden. Während für allgemein histologische sowie rein hämatologische Zwecke die azetonische Lösung geeigneter ist, verwendet man für parasitologische Zwecke besser die pyridinische Lösung. Bei der Wahl der Lösungsflüssigkeit, besonders für Fixierung von Gewebsstücken, muß auch berücksichtigt werden, ob man eine schnelle oder eine etwas langsamere Fixation wünscht; im ersteren Falle verwendet man besser die azetonische Lösung, im letzteren die pyridinische.

Als Testobjekt für die Fixation wählten wir Knochenmarksausstriche von Meerschweinchen, weil dieses Objekt schon wegen der Vielartigkeit der darin enthaltenen Granula für unsere Zwecke sehr geeignet erschien. Es zeigte sich bei den Versuchen, daß die Fixierung eine außerordentlich rasche ist, daß die nachfolgende Giemsa- bzw. May-Giemsafärbung eine außerordentlich distinkte Färbung sämtlicher Bestandteile gibt: die Kerne erscheinen leuchtend violett-rot, die pseudoeosinophilen Granula heben sich sehr scharf und deutlich vom Grund ab und sind sehr leicht von den hell eosin-rot gefärbten echten eosinophilen Granula zu unterscheiden; die Metachromasie der Mastzellengranula leidet unter der Fixation garnicht (auch hier ist die Vermeidung von Wasser von Vorteil), die Granula werden dunkelviolet, die nigrosinophilen Granula färben sich dunkel blaviolett. Das Protoplasma färbt sich überall schön hellblau bzw. dunkelblau oder orangefarbig. Die Triazidfärbung gelingt auch gut, man bekommt dasselbe Bild wie nach der Hitzefixation. Am auffallendsten zeigen sich die Vorteile der Methode bei der Romanowskyfärbung. Was Farbenpracht anbelangt, übertreffen hier die mit Lucidol fixierten Präparate alle anderen. Dies liegt zum Teil wohl in der Natur der Romanowskyfärbung, die in bezug auf Panopsis alle anderen Färbungsverfahren wohl hinter sich läßt, doch bietet sie heute noch gewisse Schwierigkeiten. Die Romanowskyfärbung gelingt nicht oder wenigstens gibt sie kein schönes Bild, wenn das Material in Alkohol oder Formalin fixiert worden ist; auch schadet die Osmiumfixation den Präparaten, während diese besonders in der Parasitologie solche Dienste leistet, auf die man nicht gerne verzichten möchte.

Wie nun unsere Versuche gezeigt haben, eignet sich die Lucidolfixation — einerlei ob das Lucidol in Azeton oder in Pyridin gelöst ist — ganz besonders für die nachfolgende Romanowskyfärbung. Durch Lucidol wird die Aufnahmefähigkeit des Materials für den polychromatischen Farbstoff in keiner Weise beeinflusst, es scheint sogar, als ob die durch Lucidol bewirkte Oxydation der Präparate in dieser Richtung hin besondere Dienste leistete, denn die azurophile und die Chromatinsubstanz werden so schön dargestellt, wie sie mit anderen Fixierverfahren nicht dargestellt werden können. Diese Eigentümlichkeit des neuen Verfahrens zeigte sich am meisten bei den Fixierungsversuchen mit menschlichem Blut. In den mit Lucidol fixierten und nachher mit May-Giemsa (Pappenheim) gefärbten menschlichen Blutaussstrichen zeigen die einzelnen Blutbestandteile folgende Eigentümlichkeiten:

Die roten Blutkörperchen sind in Form gut erhalten, die Farbe ist ganz besonders schön, leuchtend eosin-rot. Die Blutplättchen sind sehr gut fixiert, die Zentralsubstanz und die diese umgebende blaßblau gefärbte, leicht granulierte Substanz sind sehr deutlich zu erkennen. Die neutrophilen Granula sind außerordentlich deutlich zu erkennen und sind in einem bräunlich-roten Ton gefärbt. Die Größe der einzelnen Granula ist verschieden, doch sind sie alle so deutlich, wie das sonst nur bei mit Triazid gefärbten Präparaten zu sehen ist. Dasselbe gilt von den eosinophilen und den basophilen Granula: erstere sind hellrot, letztere blaviolett gefärbt. Die Kerne aller weißen Blutkörperchen zeigen eine Farbenpracht, wie sie mit keiner bisher bekannten Fixation zu erreichen ist. Das Protoplasma der Granulozyten ist hellrosa, das der lymphoiden Zellen hellblau bzw. dunkelblau gefärbt. Eine besondere Beachtung verdient aber das Verhalten der lymphoiden Zellen, und zwar sowohl der Lymphozyten wie der Monozyten (große mononukleäre Leukozyten und Uebergangsformen). Mit nur sehr wenigen Ausnahmen sieht man nämlich in den lymphoiden Zellen sehr deutliche bräunlich rot gefärbte Granula, die manchmal — und das ist am meisten der Fall — so zahlreich vorhanden

sind, daß sie das ganze Protoplasma und eventuell auch den Kern bedecken. Neben diesen Granula sieht man in einzelnen Zellen die leuchtend azurrot gefärbten gewöhnlichen azurophilen Granula, die aber morphologisch und auch färberisch ein ganz anderes Aussehen und Verhalten zeigen als die eben erwähnten Granula. Meine Untersuchungen über diese Granula sind noch nicht ganz abgeschlossen, und aus diesem Grunde will ich mich auch über deren Art noch nicht äußern und teile diesen Befund lediglich aus dem Grunde mit, weil diese Granula, die in allen menschlichen Blutaussstrichen, die mit Lucidol behandelt worden sind, zur Darstellung gebracht werden, am besten die starke Fixationskraft des Lucidols beweisen. Daß durch Lucidol sämtliche Granulaarten besonders gut zur Darstellung gebracht werden können, beweist außer den eben erwähnten Tatsachen auch der Umstand, daß im Mäuseblut in den Spezialzellen, den ϵ -Leukozyten, die für ungranuliert gehalten worden sind, mit dieser Methode ebenfalls Granulationen zu erkennen sind. Ueber diese Einzelheiten werde ich in meiner ausführlichen Mitteilung noch weiteres berichten, hier will ich nur die Eigenheiten der Methode schildern.¹⁾

Bei parasitologischem Material liefert die Methode auch ganz vorzügliche Resultate. Auch hier tritt die Eigenschaft der Methode vor, daß die Granula (so z. B. in den Trypanosomen) ganz besonders deutlich gefärbt werden; man erreicht mit dieser Fixierungsmethode Bilder, wie man sie sonst nur bei feuchter Fixation bekommt. Besondere Vorteile bietet aber die Lucidolfixation für parasitologische Zwecke dadurch, daß das Lucidol die durch Osmium geschwärzten Präparate durch seine oxydative Eigenschaft wieder weiß und so für die nachfolgende Romanowskyfärbung geeignet macht. Dasselbe geschieht mit den Präparaten, die mit osmiumhaltigen Flüssigkeiten (Hermann, Flemming) fixiert waren, und in dieser Kombination eignet sich die Lucidolfixation auch sehr gut für feuchte Fixation: man fixiert in diesem Falle die noch feuchten Ausstriche in Hermannscher oder Flemmingscher Flüssigkeit und behandelt sie feucht weiter mit Lucidol. Durch dieses Verfahren vereinigt man die Vorteile der Fixierung mit Hermannscher bzw. Flemmingscher Lösung (rasche Abtötung der Parasiten, gute Kernfixation) mit denen des Lucidols (oxydative Härtung, Abbleichen der Osmiumschwärze etc.), und man bekommt Einzelheiten zu sehen, die man bisher nur mit verschiedenen Methoden und in mehreren Präparaten erzielen konnte. Man kann aber auch direkt in Lucidol feucht fixieren ohne Vorfiktion mit anderen Substanzen.

Die Fixierung von Gewebsstücken gelingt mit der Methode sehr gut. Die so fixierten Stücke zeigen bei der nachfolgenden Färbung viel schönere Farbenkontraste als die mit anderen Methoden fixierten Stücke und — was ich besonders betonen möchte — es gelingt die Romanowskyfärbung in den Schnitten ohne Schwierigkeiten, was bekanntlich bei den bisherigen Fixierungsverfahren nicht immer der Fall ist. Bei der Fixierung von Gewebsstücken tritt noch ein Vorteil der Methode hervor, nämlich der, daß die Fixierung außerordentlich rasch vor sich geht. Die Einbettung der durch Lucidol fixierten Stücke wird außer der an und für sich schnellen Härtung der Stücke auch noch dadurch beschleunigt, daß bei der Ueberführung der Stücke aus der Fixierungsflüssigkeit in Paraffin die ganze Alkoholreihe und auch das Auswaschen wegfällt. Besonders vorteilhaft ist hier meines Erachtens auch das vollkommene Wegbleiben von wäßrigen Medien.

Ich werde in meiner ausführlichen Mitteilung noch näher auf die hier nur kurz erwähnten Vorteile der Methode eingehen und das hier Gesagte auch mit Bildern belegen. Ich gehe nun zur Beschreibung der Methodik über.

Es empfiehlt sich, keinen größeren Vorrat der Lucidollösung sich zu halten, da, namentlich ist das bei der azetonischen Lösung der Fall, das Lucidol sehr schnell auf der Luft kristallisiert und so die Konzentration der Lösung sich ändert. Wie schon anfangs erwähnt wurde, löst sich Lucidol in Azeton sehr leicht, in Pyridin noch leichter. Ich löse gewöhnlich 50 g Lucidol in 500 ccm Azeton oder 30 g Lucidol in 250 ccm Pyridin. Diese Menge des Lucidols löst sich leicht, schnell und ohne Schwierigkeiten. Mehr Lucidol als die eben erwähnten Mengen zu nehmen, empfiehlt sich nicht, da dann die Lösung übersättigt wird. Neben diesen beiden Fixierungsflüssigkeiten empfiehlt es sich, noch eine fertige Lösung von Azeton-Xylol im Verhältnis von 3 : 2 bereit zu halten;

diese Lösung dient zur Auflösung der im Präparat eventuell vorhandenen Lucidolkristalle und gleichzeitig auch zur Aufhellung des Präparates.

I. Fixierung von Blut- und Knochenmarksausstrichen.

1. Fixierung der lufttrockenen Ausstriche in Azeton-Lucidol 15 Minuten (gut verschlossene Gefäße, absolut trocken!)
2. Schnell überführen in Azeton-Xylol 10 Minuten.
3. Kurz eintauchen bzw. übergießen mit Methylalkohol $\frac{1}{2}$ bis 1 Minute.
4. Färben.

Ich möchte hier noch erwähnen, daß nach Lucidolfixation die May-Giemsafärbung von Pappenheim etwas zu modifizieren ist. Es gestaltet sich die Färbung nämlich folgendermaßen:

a) Vorfärben mit May-Grünwaldlösung + Aqua destillata aa eine Minute.

b) Färben mit GiemsaLösung, 18 Tropfen auf 10 ccm Aqua destillata 15 Minuten (maximum!).

II. Fixierung von parasitologischem Material.

A. Trockenfixation:

1. Fixierung der lufttrockenen Ausstriche in Pyridin-Lucidol 20 Minuten.

2. Schnell überführen in Azeton-Xylol oder Pyridin-Xylol (im letzteren Falle müssen die Ausstriche nachher etwas länger mit Methylalkohol ausgewaschen werden) 10 Minuten oder auch länger.

3. Kurz eintauchen bzw. übergießen (nach Pyridin-Xylolbehandlung längeres Verweilen) mit Methylalkohol $\frac{1}{2}$ —1 Minute.

4. Färben wie gewöhnlich.

B. Feuchte Fixation:

1. Fixierung der feuchten Ausstriche in Sublimat-Alkohol, Hermannscher oder Flemmingscher Lösung wie gewöhnlich oder mit heißen Osmiumdämpfen.

2. Nachfixierung mit Azeton-Lucidol 15—20 Minuten (bei osmierten Präparaten so lange, bis die Ausstriche weiß werden).

3. Schnell überführen in Azeton-Xylol 10 Minuten.

4. Methylalkohol $\frac{1}{2}$ —1 Minute.

5. Färben wie gewöhnlich.

III. Fixierung von Gewebsstücken.

1. Fixierung der möglichst kleinen Stücke in

a) Azeton-Lucidol 4—6 Stunden, oder in

b) Pyridin-Lucidol 10—12 Stunden in gut verschlossenen Gefäßen, bei Zimmertemperatur.

2. Azeton-Xylol 8—10 Stunden (ein längeres Verweilen schadet, da die Stücke zu hart werden).

3. Xylol, Xylol-Paraffin etc. wie bei der gewöhnlichen Paraffineinbettung.

Ich hoffe, daß ich mit dieser Methode ein recht brauchbares Verfahren in die mikroskopische Technik eingeführt habe, das außer den praktischen Vorteilen auch theoretisch interessante Resultate zu liefern verspricht; ich erinnere hier nur kurz an die Untersuchungen Unnas über die Reduktionssorte und Sauerstoffsorte des tierischen Organismus, auf Grund deren er zu dem Schluß kam, daß sich alle Fixationsmethoden auf eine künstlich hervorgerufene Oxydation des Gewebes zurückführen lassen. Die Fixation mit Lucidol ist nichts anderes als eine sehr energische und außerordentlich rasche Oxydation des Gewebes.

¹⁾ Ausgezeichnete Resultate bekommt man mit Lucidolfixation bei der zytologischen Untersuchung des Liquor cerebrospinalis sowie anderer Ex- und Transsudate.