

(Aus der Landesheilanstalt Uchtspringe (Altmark), [Direktor: Med. Rat Dr. *Bernhard*] und der psychiatrischen und Nervenlinik der Universität Frankfurt a. M. [Direktor: Prof. Dr. *Kleist*].)

Eine neue, an Gefrierschnitten anwendbare Markscheidenfärbemethode.

Von

Dr. K. Schroeder,
Oberarzt.

(Eingegangen am 3. Juli 1930.)

Bei der Untersuchung von Gewebsstücken des Zentralnervensystems ergibt sich oft dadurch eine gewisse Schwierigkeit, daß bei der Wahl des Fixierungsmittels von vornherein auf die in Aussicht genommenen Färbemethoden Rücksicht genommen werden muß. Diesem Übelstande ist zum Teil wenigstens durch die weitere Ausbildung der bei Gefrierschnitten anwendbaren Methoden abgeholfen. Insbesondere war es ein großes Verdienst von *Spielmeyer*, eine Markscheidenmethode für Gefrierschnitte angegeben zu haben. Sie gestattet es, von der primären Chromierung der Gewebsstücke Abstand zu nehmen, die zwar eine sehr gute Markfaserfärbung ermöglicht, aber das Gewebe für die meisten andern Färbe- bzw. Imprägnierungsmethoden untauglich macht. Indessen kann die genannte Methode nicht als vollkommen ideal bezeichnet werden. Nicht immer werden auch die feinsten Fasern mit genügender Klarheit und Vollständigkeit dargestellt¹, auch hat man bisweilen den Eindruck, daß sie zwar zunächst gefärbt, aber auch bei vorsichtiger Differenzierung mitunter wieder entfärbt werden, worauf erst kürzlich *Fünfgeld*² hingewiesen hat. Er meint, daß es mitunter schwer sei, zwischen mangelhafter Färbbarkeit der Markscheiden bzw. pathologischer Entfärbbarkeit und echtem Ausfall zu unterscheiden. Es bedarf kaum eines besonderen Hinweises, wie wichtig es ist, eine vollkommen ideale, an Gefrierschnitten anwendbare Markfaserfärbemethode zu besitzen, denn trotz der großen Bedeutung der vielen neueren wertvollen Methoden steht doch die Markscheidenfärbung immer noch mit an erster Stelle. Auch *Bielschowsky*³ hat hierauf kürzlich besonders hingewiesen. Er

¹ *Spielmeyer* sagt daher selbst in seiner „Technik“ 3. Aufl., S. 89, daß eine Darstellung der feinsten markhaltigen Rindenfasern „ziemlich regelmäßig“ erreicht wird.

² *Fünfgeld*: Zur Klinik und Pathologie frühkindlicher, das striäre System bevorzugender Hirnerkrankungen. J. Psychol. u. Neur. 40.

³ *Bielschowsky*: Weitere Bemerkungen zur normalen und pathologischen Histologie des striären Systems. J. Psychol. u. Neur. 27.

sagt, daß das Markscheidenpräparat uns sicherere Anhaltspunkte für die Beurteilung der Funktion eines Hirnteils liefert als jede andere Methode. Ein weiterer Mißstand ist der, daß die *Spielmeyerschnitte* leicht etwas brüchig werden. Ferner spielt das Alter und der Reifezustand der Hämatoxylinlösung eine wichtige Rolle. Es gelingt daher bei Verwendung einer nicht genügend ausgereiften bzw. nicht schon mehrfach verwendeten Farblösung auch bei längerer Färbung mitunter nicht, befriedigende Bilder zu erzielen. Es war daher mein Bestreben, eine Markscheidengefrierschnittfärbung zu finden, die alle diese Mängel vermeidet. Ich ging hierbei von folgenden Überlegungen aus. Die Markscheidenfärbung ist eine Lecithinfärbung¹. Lecithin löst sich in Alkohol bei Zimmertemperatur. Formalinvorbehandlung verhindert die Alkohollöslichkeit nicht. Dagegen ist chromiertes Lecithin alkoholunlöslich. Es muß daher das Lecithin vor der Einwirkung des Alkohols durch Behandlung mit einem Metallsalz (meist Kalium bichromicum) in eine alkoholunlösliche Verbindung gebracht werden. Es ist also zunächst eine gründliche Chromierung der Gefrierschnitte erforderlich, damit bei der späteren Behandlung mit Alkohol das Lecithin nicht mehr gelöst werden kann. Ich fand als beste Chromierung die Behandlung der Schnitte mit der *Weigertschen* Fluorchrom-Schnellbeize für 2 Tage bei 37°. Hierbei werden die Schnitte nicht, wie man vielleicht erwarten sollte, brüchig. Sie müssen in der Beize möglichst ausgebreitet liegen, keinesfalls dürfen sie zusammengefaltet sein. Hierauf werden sie in 2 Schalen mit destilliertem Wasser abgespült und durch Alkohol 80% in Alkohol 90% gebracht am besten mit Metallspatel und Pinsel. In die Schale mit Alkohol 90% lege man vorher ein Stück weichen Schreibpapiers. Damit die Schnitte bei der weiteren Behandlung genügende Widerstandsfähigkeit erhalten, werden sie kollodiniert. Es hat sich gezeigt, daß die Gefahr des Brüchigwerdens nicht bei der zweitägigen Chromierung besteht, sondern bei der Hämatoxylinfärbung. Die Kollodinierung erfolgt nach der bekannten Dextrin-Zuckerplatten-Methode von *Obregia*. Auf dem Papierstück werden die Schnitte aus der Schale mit Alkohol 90% herausgehoben, wobei man sie mit dem Pinsel zurecht legt und etwaige Unebenheiten ausgleicht. Nach dem Aufdrücken auf die Dextrin-Zuckerplatte und Abheben des Papiers warte man, bis die Schnitte ihren feuchten Glanz verloren haben, und gieße dann erst das Kollodium (oder Photoxylin) so darüber, daß die Schicht nicht zu dünn aber auch gleichmäßig wird, damit die Schnitte später eine gewisse Festigkeit bekommen. Auch schwimmen zu dünn kollodinierte Schnitte leicht nach oben. Man lasse nun die Platte 7 Minuten an der Luft liegen, worauf das überflüssige Kollodium entfernt wird und zwar am besten dadurch, daß man durch Druck mit dem scharfen vorderen Rande eines breiten

¹ Vgl. hierzu *Ambrohn* u. *Held*: Arch. f. Anat. 1896, *Reich*: J. Psychol. u. Neur. 8, sowie meine Untersuchungen hierüber im J. Psychol. u. Neur. 18, 155 f.

Metallspatels unmittelbar neben den Schnitten eine Trennungslinie schafft und dann die Platte in Wasser legt. Nach kurzer Zeit haben sich die Schnitte losgelöst und können unter Zurücklassung des Kollodium (Photoxylin-)Randes herausgehoben werden. Sie werden nun nochmals einen Tag in Schnellbeize bei 37° chromiert, wobei ein Stück Fließpapier daraufzulegen ist, da die kollodinierten Schnitte die Neigung haben, nach oben zu schwimmen. Die Färbung geschieht mit folgender Hämatoxylinlösung:

10 ⁰ / ₀ ige alkoholische Hämatoxylinlösung (ganz frische oder von beliebigem Alter)	3,0 ccm
Aq. dest. ad	100,0 ccm

5 Minuten kochen lassen. Nach dem Abkühlen werden 3,0 ccm Lithion carbonicum solut. conc. zugefügt und die durch das Kochen etwas eingedickte Lösung wieder auf 100 ccm aufgefüllt.

Auf die gekochte Hämatoxylinlösung muß ich noch besonders eingehen. Bisher sind in allen Techniken ungekochte Farblösungen zur Markscheidenfärbung angegeben. Bei ihnen ist der Reifezustand der sog. Stammlösung von ausschlaggebender Bedeutung. Wenn man aber die Hämatoxylinlösung in der angegebenen Weise kocht, spielt das Alter der als Ausgangspunkt dienenden 10⁰/₀igen alkoholischen Hämatoxylinlösung keine Rolle. Man kann sich leicht davon auf folgende Weise überzeugen. Kocht man, wie oben angegeben, 2 Farblösungen nebeneinander, eine von alter, ganz dunkler alkoholischer Hämatoxylinlösung, die andere von soeben frisch aufgelöstem Farbstoff, so ist vor dem Erwärmen der Unterschied sehr auffällig. Die frische Lösung ist zunächst wasserklar, wird aber bis zum Kochen immer dunkler und gleicht nach dem Kochen der aus altem Hämatoxylin hergestellten Lösung fast vollkommen. Setzt man dann nach dem Abkühlen die Lithioncarbonatlösung zu, so sind beide Lösungen nicht mehr voneinander zu unterscheiden. Die Reifung der Hämatoxylinlösung, die sonst ganz allmählich in Wochen und Monaten sich vollzieht, geschieht beim Kochen sofort, was sich auch daraus ergibt, daß an den mit alten und frischen gekochten Lösungen gefärbten Schnitten bei meiner Methode kein Unterschied zu erkennen ist. Man ist also vom Reifezustand der Hämatoxylin-Stammlösung ganz unabhängig. Auch für Celloidinschnitte ist die Anwendung der gekochten Farblösung sehr zu empfehlen.

Bei der Färbung der Schnitte ist noch folgendes zu beachten. Auf die nach der Chromierung zweimal mit Aqua dest. abgespülten Schnitte wird zunächst nur ein geringer Teil der Farblösung aufgegossen und die Schale hin und wieder leicht bewegt. Dabei gehen dunkle Farbwolken von den Schnitten ab, die dadurch entstehen, daß aus den Schnitten das nicht an das Lecithin gebundene Chrom sich löst und mit dem Hämatoxylin wolkige Niederschläge bildet. Sobald sich beim Bewegen keine

Farbwolken mehr bilden (nach etwa einer Viertelstunde) wird die Hämatoxylinlösung abgegossen, neue dazu gegeben, ein Stück Fließpapier aufgelegt und 24 Stunden bei 37° gefärbt. Nach Abspülen wird die Differenzierung nach *Lustgarten-Pal* vorgenommen; frisch hergestellte Kaliumpermanganatlösung $\frac{1}{4}\%$ — Oxalsäure 1% + Kal. sulfur. 1% aa, dann Aqua dest., Leitungswasser, Aqua dest., Wiederholung des Turnus. Die Differenzierung muß mit der üblichen Vorsicht geschehen, zunächst nur $\frac{3}{4}$ —1 Minute Kal. perm., beim nächsten und den folgenden Malen eventuell noch kürzere Zeit. Kontrolle unter dem Mikroskop. So gelingt es leicht, das Grundgewebe vollkommen zu entfärben, ohne daß die feinsten Fasern bereits abblassen. Die Schnitte werden erst eingelegt, nachdem sie 2 oder mehr Stunden in mehrmals gewechseltem Leitungswasser gelegen haben. Alkohol 70%, 96%, Karbolxylol, Xylol, Canadabalsam. Vor dem Karbolxylol kann das Kollodium bzw. Photoxylin durch Methylalkohol entfernt werden. Natürlich müssen dann solche entkollodinierten Schnitte besonders behutsam behandelt werden. Ich habe die Methode ganz ausführlich unter Berücksichtigung aller Handgriffe geschildert, da von solchen scheinbaren Kleinigkeiten, die bei der Beschreibung von Färbemethoden oft weggelassen werden, bisweilen das Gelingen guter Präparate abhängt.

Kurz zusammengefaßt besteht die Methode in folgendem:

Formalinhärtung.

Gefrierschnitte von etwa 30 μ .

Beizung in *Weigerts* Kal. bichrom.-Fluorchrom-Schnellbeize bei 37° 2 Tage lang.

Abspülen. Kollodieren nach der Dextrin-Zuckerplatten-Methode von *Obregia*.

Nochmaliges Beizen in *Weigerts* Schnellbeize 24 Stunden bei 37°, Abspülen. Färbung in gekochter Hämatoxylinlösung bei 37°. 24 Stunden.

Differenzierung nach *Lustgarten-Pal*.

Alkohol 70%, 96% (eventuell Methylalkohol) Karbolxylol, Xylol, Canadabalsam.

Die Vorteile der angegebenen Methode bestehen in folgendem:

1. Sämtliche, auch die allerfeinsten Markfasern heben sich blauschwarz vom fast ungefärbten, leicht gelblich getönten Grunde mit größter Schärfe ab, so daß sich Bilder ergeben, wie man sie sonst nur bei besonders gut gelungenen Präparaten von chromiertem und eingebettetem Material zu sehen gewohnt ist.

2. Die Methode ist eine vollkommen sichere.

3. Das Alter und der Reifezustand der Hämatoxylinlösung ist für das Gelingen der Präparate vollkommen bedeutungslos.

4. Die Gefahr der Überdifferenzierung läßt sich mit Sicherheit vermeiden.

5. Die Schnitte werden nicht brüchig.