

Aus dem Neuropathologischen Laboratorium (Prof. Dr. SCHARENBERG)
der Psychiatrischen Universitätsklinik Ann Arbor, Michigan
(Direktor: Prof. Dr. R. W. WAGGONER).

Zur Leistungsfähigkeit und zur Technik der HORTEGAschen Silberkarbonatmethoden.

Von
K. SCHARENBERG und WOLFGANG ZEMAN.

Mit 8 Textabbildungen.

(Eingegangen am 20. Februar 1952.)

Die ursprünglich für die Darstellung der Mikroglia angegebene Silberkarbonatmethode ist von DEL RIO HORTEGA zu einem umfassenden System elektiver Imprägnationsmethoden ausgebaut worden, welches in der Neurohistopathologie zweifellos eine besondere Stellung verdient. Die Elastizität dieser Methoden ermöglicht eine „elektive histologische Analyse“ (HORTEGA), weil sie gestattet die verschiedenen Zellarten und paraplasmatische Substanzen isoliert darzustellen. Damit ergibt sich nicht nur eine äußerst wertvolle Handhabe bei der Bearbeitung allgemein-histopathologischer Probleme, auch die spezielle Pathomorphologie, insbesondere die Tumordiagnostik erfährt eine wesentliche Bereicherung. Trotzdem sind diese Methoden in Deutschland, aber auch in anderen Ländern wenig bekannt geworden. Das ist auf eine Reihe von ungünstigen Umständen zurückzuführen, vor allem auf die Tatsache, daß HORTEGA seine technischen Publikationen ausschließlich in spanischer Sprache abgefaßt hat. Auch hat er eine Reihe wichtiger Modifikationen erst in den letzten Lebensjahren ausgearbeitet, weshalb sie zum Teil noch nicht publiziert sind. Hierzu gehört unter anderem die neueste Variante zur Darstellung von Gliomen, auf die HORTEGA selbst mit Recht große Hoffnungen gesetzt hat.

Die Silberkarbonattechnik stellt ein System von Varianten dar, das auch heute noch außerordentlich entwicklungsfähig ist. Es kann jederzeit modifiziert und der Eigenart des Problems angepaßt werden. So sind die hier angegebenen Methoden für die Imprägnierung der Astroglia und des Bindegewebes in diesem Laboratorium vervollkommen worden, was uns jedoch nicht berechtigt Prioritätsansprüche zu erheben, da die Verbesserungen den Gedankengängen HORTEGAS entnommen sind.

Die Vorteile der HORTEGAschen Technik liegen in ihrer Einfachheit und Zuverlässigkeit, welche es ermöglichen große Serien gleichmäßig

imprägnierter Schnitte innerhalb kurzer Zeit herzustellen. Die Anwendung dieser Methoden ist keineswegs auf das nervöse Gewebe beschränkt. Sie können für die Untersuchung beliebiger Organe des Menschen und der Tiere mit gleichguten Resultaten angewendet werden. Das menschliche Gewebe erscheint uns aber besonders geeignet.

Es ist nicht möglich und auch nicht im Sinne dieser Arbeit, das gesamte Lebenswerk HORTEGA darzustellen. Wir beschränken uns vielmehr auf die Beschreibung einiger weniger Grundmethoden, welche sich uns als besonders nützlich erwiesen haben.

Allgemeine technische Grundbedingungen.

1. Für das Zentralnervensystem im allgemeinen, insbesondere jedoch für die Darstellung der Glia, ist Fixierung in Bromformol (CAJAL) Voraussetzung. Für die Imprägnierung der Ganglienzellen und des peripheren Nervensystems genügt 10%iges Formol. Für die übrigen Organe des Körpers ist die Fixierung in 10%igem neutralen Formol die Methode der Wahl.

2. Gewebsblöcke nicht dicker als $\frac{1}{2}$ cm werden 24 Std. unter Umständen auch länger in Bromformol fixiert. Die Größe der Blöcke ist belanglos. Gefrierschnitte von 10 bis 15 μ , bei Gliomen wenn möglich nicht über 10 μ , werden in der Fixierungsflüssigkeit aufgefangen. Dickere Schnitte bis 25 μ sind meist beim Kleinhirn erforderlich. Im allgemeinen kann das bromformolfixierte Material 4 bis 6 Wochen lang versilbert werden, oftmals auch wesentlich länger. Bindegewebe imprägniert sich auch noch nach über 2 Jahren.

3. Verjüngung des Materials (HORTEGA), welches vorher in Formol oder zu lange in Bromformol fixiert worden war, ist nur in beschränktem Umfange möglich. HORTEGA empfiehlt 2 Methoden: a) nach GLOBUS, Gefrierschnitte werden in Ammoniakwasser, danach in destilliertem Wasser gewaschen und kommen dann für 2 Std in 10%ige Bromwasserstoffsäure. Nach Waschen in Ammoniakwasser und 2 Schalen destilliertem Wasser wird die gewünschte Silbermethode angewendet. b) 3fache Beizung nach HORTEGA besteht aus gleichen Teilen von Pyridin, konzentrierter Ammoniaklösung und destilliertem Wasser. In dieser Lösung bleiben die Schnitte 10 min bis 24 Std bei Zimmertemperatur oder 5 bis 15 min bei 45° C. Vor der Imprägnierung Auswaschen in 2 Schalen mit destilliertem Wasser.

4. Vor der Imprägnierung werden die Schnitte grundsätzlich, sofern nicht ausdrücklich anders vermerkt, in Ammoniakwasser (30 bis 50 Tropfen einer konzentrierten Ammoniaklösung auf 50 bis 100 cm³ destilliertes Wasser) für 2 bis 3 min, anschließend ebensolange in destilliertem Wasser gewaschen.

5. Für die Herstellung der Lösungen und der Waschbäder genügt einfach destilliertes Wasser. Im übrigen sind, wie bei allen anderen Silbermethoden, nur saubere Glasschalen und, zum Übertragen der Schnitte, Glashäkchen zu verwenden. Diese werden vor dem Eintauchen in die Waschbäder und Imprägnationslösungen stets mit einem sauberen Lappen abgewischt.

6. Herstellung der Silberkarbonatlösung: 300 cm³ einer 5%igen Natriumkarbonatlösung (Na₂CO₃ reinst, kristallisiert oder wasserfrei) werden mit 100 cm³ einer 10%igen Silbernitratlösung gemischt. Der entstehende Niederschlag wird durch tropfenweises Zusetzen einer konzentrierten Ammoniaklösung aufgelöst. Überschuß an Ammoniak ist zu vermeiden, kann aber durch Abdampfen bei Zimmertemperatur leicht entfernt werden. In braunem Glas aufbewahrt bleibt diese Stammlösung 6 bis 8 Wochen lang brauchbar.

Sie wird zum Gebrauch in folgenden Konzentrationen verdünnt: „Schwach“ 100 Teile Stammlösung und 275 Teile destilliertes Wasser, „Mittel“ 100 Teile Stammlösung und 100 Teile destilliertes Wasser, „Stark“ 100 Teile Stammlösung und 25 Teile destilliertes Wasser.

50 cm³ dieser Lösungen, die vor Gebrauch filtriert werden müssen, genügen jeweils für 30 Schnitte von etwa 4 cm² Größe.

7. Nach der Imprägnation wird bis auf einige Ausnahmen in 1%igem Formol mit Zusatz von 10 Tropfen Pyridin auf 250 cm³ reduziert. Die Reduktion dauert in der Regel etwa 1 min, manchmal länger. Das Reduktionsbad ist, besonders bei Anwendung von „starkem“ Silberkarbonat häufiger, wenigstens nach Reduktion von 5 Schnitten in ca. 80 cm³ zu wechseln.

8. Danach wird in destilliertem Wasser kurz gewaschen und in einer 0,2%igen Goldchloridlösung (braunes oder gelbes AuCl₃ HCl₃ H₂O) für 20 bis 30 min, unter Umständen auch kürzer oder länger, vergoldet. 50 cm³ der Goldlösung genügen für ebenfalls 30 Schnitte von etwa 4 cm² Größe.

9. Nach erneutem Waschen in destilliertem Wasser erfolgt Fixierung in einer 5%igen Natriumthiosulfatlösung mit oder ohne Zusatz von 20 bis 30 Tropfen konzentrierter Ammoniaklösung auf 50 cm³ des Fixierbades.

10. In destilliertem Wasser werden die Schnitte auf Objektträger gebracht, mit einem Pinsel ausgebreitet und dann bei Zimmertemperatur getrocknet. Die Schnitte schrumpfen dabei ein wenig. Man ist aber nur selten gezwungen, die Schrumpfung durch Entwässerung mit der Alkoholreihe oder besser mit Kreosot und Kreosotxylol zu verhindern. Erweichtes oder brüchiges Gewebe kann in Gelatine eingebettet und danach versilbert werden.

11. Bei allen Modifikationen kann selbstverständlich der imprägnierte Schnitt auf Fett gegengefärbt werden. Dann natürlich Eindecken in Gelatine.

12. Zur Erzielung guter Resultate ist mikroskopische Kontrolle eines Schnittes vor der Vergoldung notwendig. Bereits der versilberte Schnitt muß eine ausreichende Darstellung der gewünschten Gewebsstrukturen zeigen. Unter Umständen sind die hier angegebenen Imprägnierungszeiten zu verkürzen oder zu verlängern, die Konzentrationen der Silberlösungen zu erhöhen oder abzuschwächen.

Spezielle Technik.

1. *Astrogliatechnik.* Fixierung in Bromformol, wenigstens 24 Std lang ist Vorbedingung. Das Material bleibt 3 Monate lang imprägnationsfähig.

Versilberung in Silberkarbonat „mittel“, 50 cm³ plus 20 Tropfen Pyridin für 45 bis 60 min bei 45° C. Die Schnitte färben sich deutlich tabaksbraun, während die Silberlösung eine dunkelgraue bis schwarze Farbe annimmt. Nur in seltenen Fällen ist eine Erwärmung von 60 min nicht ausreichend, meist bei älterem Material. Dann empfiehlt sich, die Schnitte bei Zimmertemperatur nach der Erwärmung noch 2 bis 10 Std im Silberkarbonat zu lassen.

Direktes Übertragen der Schnitte (einzeln!) in eine 2 bis 5% ige Silberammoniaklösung für 15 bis 30 sec.

Herstellung der ammoniakalischen Silberlösung: Man setzt einer 2—5% igen Silbernitratlösung unter ständigem Umrühren tropfenweise konzentrierte Ammoniaklösung zu bis der Niederschlag sich auflöst. Überschuß von Ammoniak ist sorgfältig zu vermeiden. Notfalls müssen noch einige Kubikzentimeter Silberlösung zugesetzt werden. Im allgemeinen genügt die 2% ige Lösung. Erfahrungsgemäß ergeben schwache Lösungen bessere Resultate.

Reduktion in einer 1% igen Formollösung plus 10 Tropfen Pyridin je 250 cm³ unter mäßig lebhaftem Schwenken. Waschen, Vergoldung usw.

Ergebnis: Diese zuverlässige und einfache Methode gestattet die Astroglia sowohl bei akuten als auch bei chronischen Prozessen darzustellen. Imprägniert werden normale, hypertrophische, mißbildete und in Degeneration befindliche (amöboide Glia) Astrocyten, aber nicht blastomatöse Formen. Unvollständig imprägniert werden Ganglienzellen, Gefäße und Bindegewebsfasern. In manchen Fällen färbt sich das Plasma von proliferierter Mikro- und Oligodendrogliä, von denen in der Regel sonst nur die Kerne dargestellt werden.

Abb. 1 a zeigt eine fasrige Markgliose. Auf Abb. 1 b sind bereits einige Astrocyten in amöboider Umwandlung begriffen (x), während in Abb. 1 c schon eine recht ausgeprägte Zerstörung der Astrocyten zu erkennen ist. Abb. 2 demonstriert die astrocytäre Reaktion um eine Plaque bei ALZHEIMERScher Krankheit.

2. *Mikrogliatechnik.* Fixierung in Bromformol nicht weniger als 24 Std. Oft werden nach längerer Fixierung bessere Ergebnisse erzielt.

Nach dem üblichen Waschen werden die Schnitte in einer frisch bereiteten 5% igen Natriumsulfatlösung (Na₂SO₃), welche vorher auf 45° C erhitzt worden ist, 5 bis 10 min lang bei derselben Temperatur gebeizt. Höhere Temperaturen sind zu vermeiden.

Direktes Übertragen in Silberkarbonat „stark“ ohne Pyridinzusatz für 15 bis 60 min bei Zimmertemperatur. Reduktion in 1% igem Formol mit oder ohne Zusatz von Pyridin. Schütteln der Reduktionslösung ist zu vermeiden. Die Formollösung muß oft gewechselt werden.

Unter Umständen können mit der folgenden Methode gleichgute Resultate erzielt werden: Nach dem üblichen Waschen werden die Schnitte, entweder direkt oder nach Beizung in Natriumsulfit, einzeln in 3 nacheinander zu benützenden

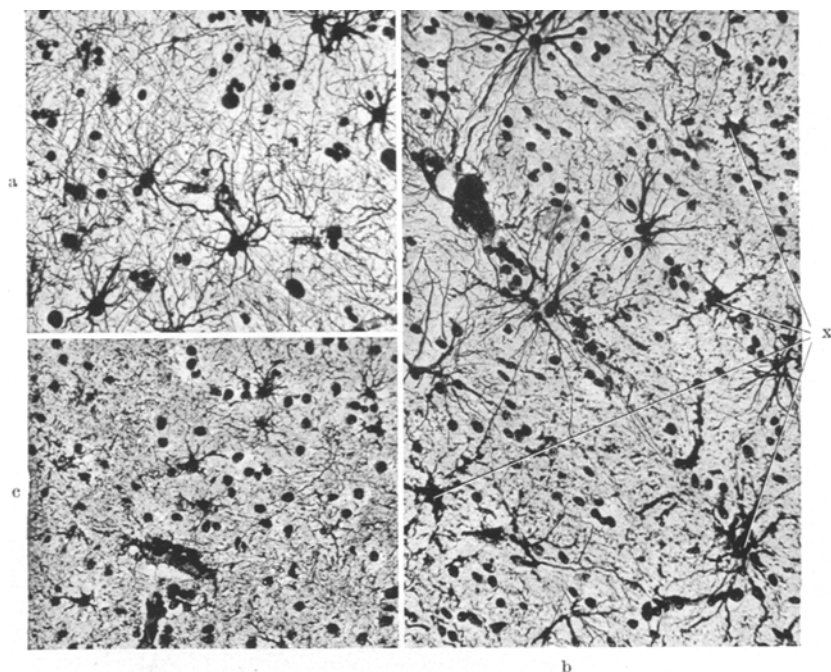


Abb. 1. Astrogliatechnik. a) Nr. 13 849. Psychomotorische Epilepsie. Operationspräparat vom Schläfenpol, weiße Substanz. b) Nr. 13 840. Schizophrenie, Tod 2 Monate nach Leucotomie im ersten epileptischen Anfall. Corpus striatum etwa 1—2 cm dorsal von der Leucotomiewunde. c) Nr. 13 159. Psychomotorische Epilepsie. Operationspräparat vom Schläfenlappen, weiße Substanz.

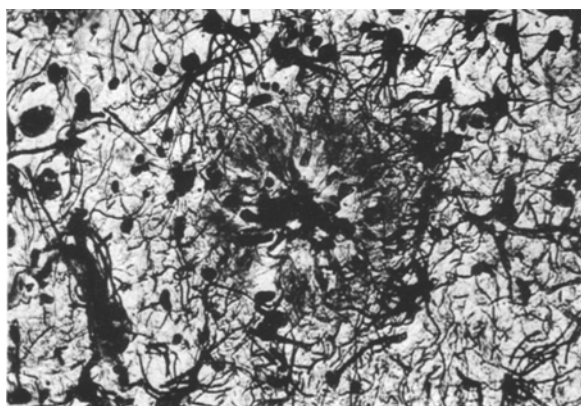


Abb. 2. Astrogliatechnik Nr. 13 906. ALZHEIMERSche Krankheit. Uncus. Mittelschnitt durch eine Plaque.

Schalen mit Silberkarbonat „stark“ für jeweils 1 bis 5 min imprägniert und dann reduziert.

Waschen, Vergoldung usw.

Ergebnis: Mit beiden Varianten färben sich gleichzeitig Oligodendro- und Mikrogliazellen mit ihren plasmischen Ausläufern. Teilweise werden auch Astrocyten dargestellt. Die Nervenzellen und die Gefäße sind meist unvollständig imprägniert.

Abb. 3a stellt ein kleines, vorwiegend aus Oligodendroglia aufgebautes gliöses Knötchen dar. 3b zeigt proliferierte Mikrogliazellen der Hirnrinde. Auffallend sind die engen Beziehungen der protoplasmatischen Zellfortsätze zu den Gefäßwänden.

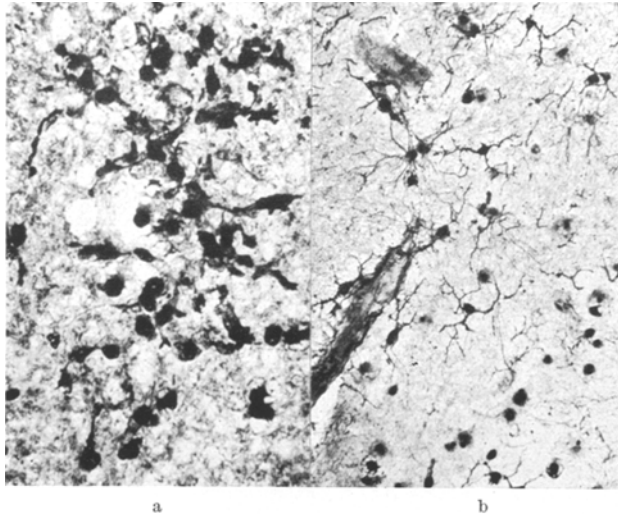


Abb. 3. Mikrogliatechnik. a) Nr. 13 649. Oligodendroglia, zum Teil im Stadium der akuten Schwellung. Umgebungsreaktion eines Hirnpunktionskanals im Mark. b) Nr. 13 349. Mikroglia in der Hirnrinde. Psychomotorische Epilepsie. Operationspräparat vom Schläfenlappen.

3. Doppelte Imprägnation ohne Reduktion. Fixierung in Bromformol oder Formol.

Imprägnation der gewaschenen Schnitte in 2%iger Silbernitratlösung mit Zusatz von 20 Tropfen Pyridin je 50 cm³ der Lösung für 2 bis 4 Std bei 45° C, bis sich die Schnitte leicht braun angefärbt haben. Direktes Übertragen der Schnitte in Silberkarbonat „schwach“ mit 20 Tropfen Pyridin auf 50 cm³ der Lösung. Darin verbleiben sie bei Zimmertemperatur und vor Licht geschützt für 12 bis 16 Std, unter Umständen länger. Dann werden die Schnitte einzeln 10 sec lang in destilliertem Wasser gewaschen und in 0,2%iges Goldchlorid gebracht, worin sie rasch eine graue Farbe annehmen. Eine leichte Trübung der Goldlösung ist belanglos. Übertragen in eine zweite Schale mit Goldchloridlösung, die auf 45° C erwärmt wird. Hierbei muß die Goldimprägnation mikroskopisch kontrolliert werden. Nach etwa 10 bis 30 min erfolgt nach Waschen Fixierung in Natriumthiosulphat, mit oder ohne Zusatz von Ammoniak.

Aufziehen und Eindecken wie üblich.

Diese Methode arbeitet mit großer Sicherheit und liefert polychromatische Bilder von geschädigten Achsenzyllindern bei degenerativen und regenerativen Prozessen. Die ALZHEIMERSchen Fibrillenveränderungen lassen sich fast elektiv darstellen. Am peripheren Nervensystem werden auch Ganglien- und SCHWANNsche Zellen

imprägniert. Sehr gut lassen sich mit dieser Methode die cerebellären Fasersysteme demonstrieren.

4. *Dreifache Imprägnation.* Fixierung in Bromformalin, formolfixiertes Material arbeitet weniger sicher.

Nach Waschen wird in 2%igem Silbernitrat mit Zusatz von 20 Tropfen Pyridin je 50 cm³ 2 bis 4 Std lang bei 45° C versilbert. Anschließend direktes Verbringen der Schnitte in Silberkarbonat „schwach“ plus 20 Tropfen Pyridin je 50 cm³ für 24 bis 48 Std bei Zimmertemperatur und vor Licht geschützt. Bei längerer Einwirkung des schwachen Silberkarbonats erhält man oft bessere Präparate. Dann werden die Schnitte einzeln (!) in einer 2%igen Silberammoniaklösung (siehe Astroglieotechnik) für 20 bis 30 sec verstärkt und anschließend sofort reduziert. Vergoldung usw.

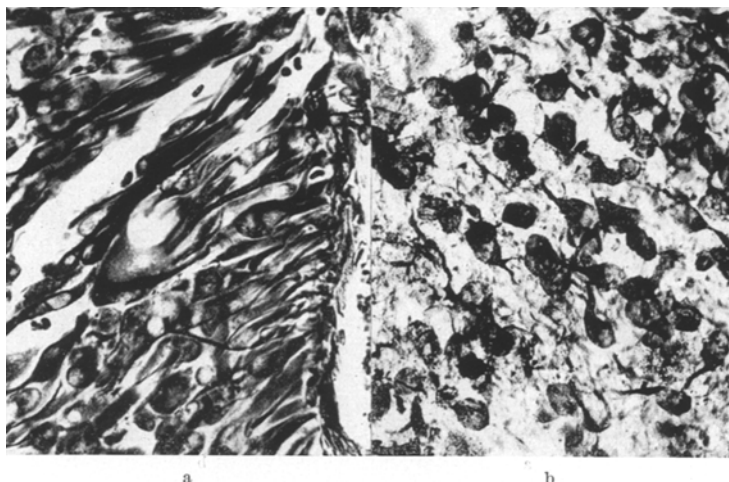


Abb. 4. Dreifache Imprägnation. a) Nr. 11 582. Ependymom (Gliapitheliom HORTEGA). b) Nr. 13 555. Medulloblastom (Neuroblastom des Kleinhirns HORTEGA).

Ergebnis: Diese Variante ist für die Imprägnation gliomatöser Zellen von besonderem Wert, und zwar bei allen Typen ektodermaler Geschwülste des zentralen und peripheren Nervensystems. Die blastomatösen Elemente färben sich mit ihren Zellfortsätzen. Schwierig ist nur die Darstellung der Medulloblastome (Neuroblastome des Kleinhirns von HORTEGA). Hierbei muß man eventuell stärker konzentrierte Silberammoniaklösungen, höhere Temperaturen und „starkes“ Silberkarbonat bei kürzerer Einwirkungszeit wählen, was im Einzelfalle auszuprobieren ist. Weiterhin gibt die Methode gute Bilder bei degenerativen Prozessen der Hirnrinde und des Kleinhirns. Hierbei geht die Imprägnation oft schneller vonstatten als bei den Tumoren.

Abb. 4a und b geben Einzelheiten eines Ependymoms und eines Medulloblastoms. Abb. 5 zeigt die histologische Struktur eines Sympathikocytoblastoms der Haut im HE-Präparat und bei Anwendung der 3fachen Technik. Abb. 6 zeigt die histologischen und cytologischen Differenzierungsmerkmale, mit deren Hilfe es HORTEGA gelang, Schwannome und Lemmocytoe voneinander abzugrenzen.

5. *Bindegewebsfärbung.* Fixierung in Formol oder Bromformol.

Die Schnitte werden nur in Wasser gewaschen, dann für 5 bis 10 min in einer 0,25%igen Kaliumpermanganatlösung gebeizt, anschließend 2mal in destilliertem

Wasser gewaschen, bis sie keine Farbe mehr abgeben. Dann erfolgt Entfärbung in 1,5—3%iger Oxalsäurelösung. Anschließend 2 mal in destilliertem Wasser waschen und versilbern mit der 3fachen Technik, Vergoldung usw.

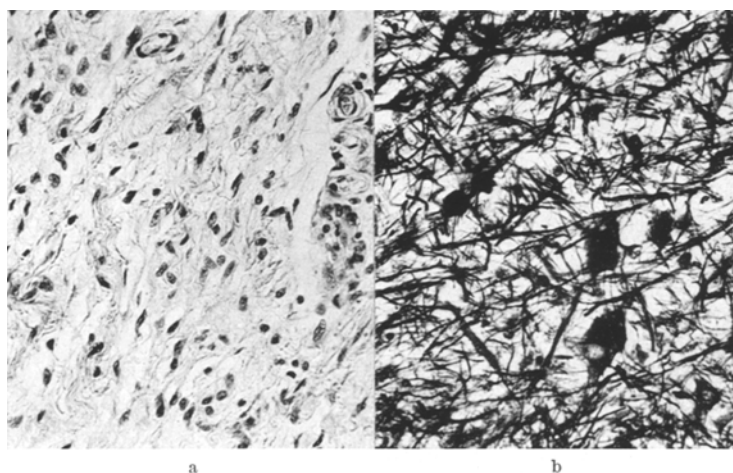


Abb. 5. Dreifache Imprägnation. Nr. 13873. Sympathiocytoblastom der Haut. a) HE-Färbung; b) Silberkarbonatmethode.

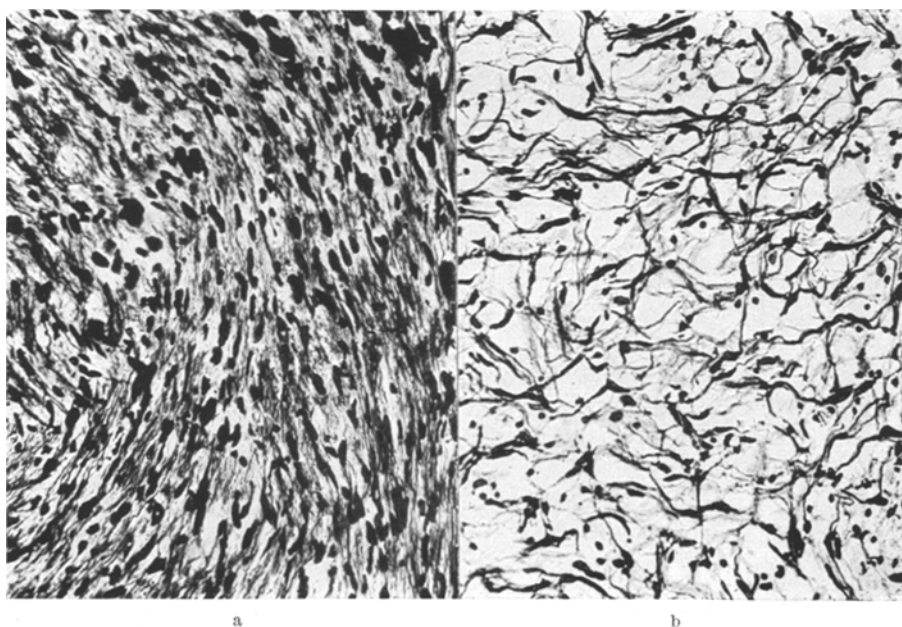


Abb. 6. Dreifache Imprägnation. a) Akustikusneurinom (Schwannom HORTEGAs). b) Nr. 12074. Neurofibrom der Haut (Lemmoeytom HORTEGAs).

Ergebnis: Mit dieser Methode lassen sich sowohl kollagene als auch Retikulumfasern mit Sicherheit in allen Organen darstellen. Zellen werden gar nicht oder nur mit ihren Kernstrukturen imprägniert.

Abb. 7 gibt einen Ausschnitt aus der Randzone eines Tuberkuloms der re. Großhirnhemisphäre.

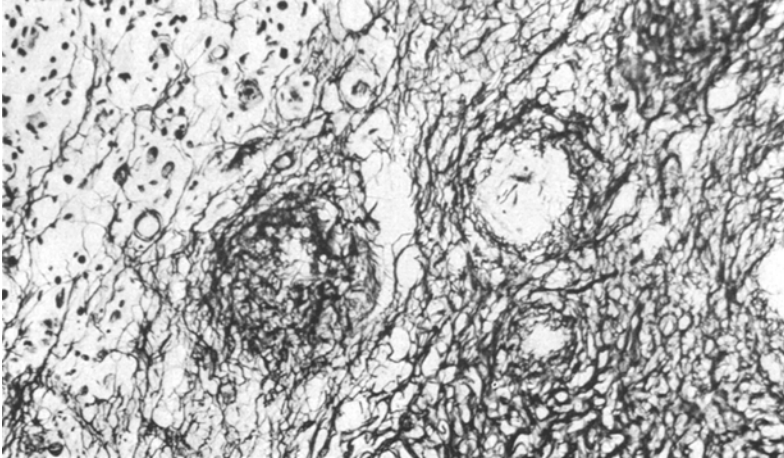


Abb. 7. Bindegewebstechnik. Nr. 13 952. Gitterfasern und kollagenes Bindegewebe in einem solitären Tuberkulom des Großhirns.

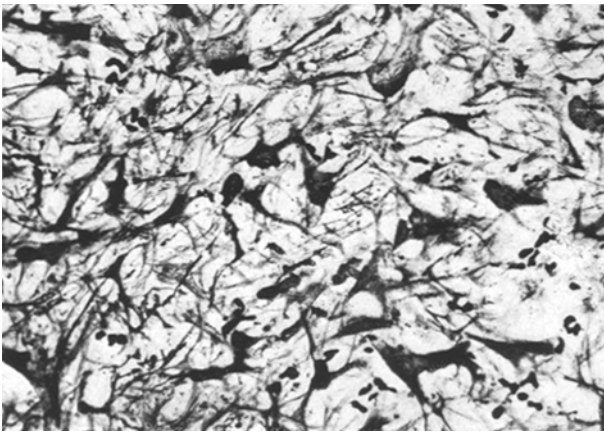


Abb. 8. Panoptische Färbung. Nr. 12 704. Fibroblasten in einem Neurofibrom.

6. *Panoptische Methoden.* Diese einfachen und wenig zeitraubenden Methoden können sowohl am bromformol- als auch am formolfixierten Material durchgeführt werden. Nach dem üblichen Auswaschen werden die Schnitte entweder a) in reinem Pyridin für 10 bis 12 min oder länger oder b) in einer Mischung von 20 cm³ 96%igem Alkohol und 60 Tropfen konzentrierter Ammoniaklösung bei ca. 50° C für 15 min oder länger gebeizt. Aus diesen Bädern kommen die Schnitte für 10 bis 20 min bei

45° C in eine 2%ige Silbernitratlösung, der bei Anwendung der Beize b) 20 Tropfen Pyridin je 50 cm³ zugesetzt werden. Direktes Übertragen in Silberkarbonat „mittel“ mit Zusatz von 20 Tropfen konzentrierter Ammoniaklösung je 50 cm³, worin die Schnitte 2 bis 10 min lang verbleiben. Danach direktes Übertragen in Silberkarbonat „mittel“ ohne Zusatz für 30 bis 60 sec oder länger. Anschließend Reduktion in 1 bis 10%igem Formol, dem der Konzentration entsprechend Pyridin zugesetzt wird (6 bis 20 Tropfen je 250 cm³ Formollösung). Fällt die Versilberung zu schwach aus, so kann man versuchen mit einer stärker konzentrierten Reduktionslösung zu arbeiten oder aber nach Auswaschen die Schnitte nochmals in Silberkarbonat „mittel“ ohne Zusatz für 5 bis 20 sec zu verstärken, anschließend nochmalige Reduktion. Vergoldung usw.

Ergebnis: Zellige Elemente, vor allem Bindegewebszellen, Tumorzellen, weniger Ganglienzellen, werden mit ihren Ausläufern dargestellt. Paraplastische Substanzen werden kaum imprägniert. Die Präparate sind denen mit der 3fachen Technik gewonnenen ähnlich, doch arbeitet letztere an Tumoren besser, während die panoptischen Methoden hervorragende Bilder an allen Zellen bindegewebiger Herkunft liefern.

Abb. 8 stellt die mit dieser Methode gefärbten Fibroblasten in einem Neurofibrom dar.

Schlußbemerkung.

Neben den 6 hier angeführten Varianten hat HORTEGA wenigstens noch 30 andere Modifikationen angegeben, von denen viele nicht publiziert worden sind. Sie erlauben die elektive Darstellung der verschiedensten Gewebelemente und sind meist für mehr oder weniger spezielle Fragestellungen ausgearbeitet, so daß wir in diesem Rahmen auf ihre Darstellung verzichten zu können glaubten.

Aus unserer eigenen Erfahrung möchten wir noch bemerken, daß die Silberkarbonatmethoden zwar mit großer Sicherheit arbeiten, doch dauert es eine gewisse Zeit, bis man sich technisch mit ihnen vertraut gemacht hat. Die Präparate enthüllen oftmals erst bei starker und stärkster Vergrößerung alle ihre Einzelheiten, deren Interpretation nicht immer einfach, wenn nicht gar unmöglich ist. Man muß bedenken, daß die Silberkarbonattechnik noch relativ jung ist. Oft befindet man sich sozusagen auf Neuland. HORTEGA hat dies erkannt und geraten, schwer oder zunächst gar nicht zu deutende Befunde nicht unbeachtet zu lassen, da sie mit wachsender Erfahrung oftmals späterhin gedeutet werden können. Aber es wird doch noch viel Arbeit erfordern, bis wir erkennen und wissen, was uns die beschriebenen Methoden alles vermitteln.

Literatur.

Die technischen Publikationen HORTEGAs erschienen ausnahmslos in den „Archivos de Histologia Normal y Pathologica“, Buenos Aires, Argentina, Vola. I—III, (1942—45).

Dr. W. ZEMAN, University of Michigan, University Hospital,
Dept. of Neuropsychiatry, Ann Arbor/Michigan USA.