

Aus dem Hirnpathologischen Institut der Deutschen Forschungsanstalt für Psychiatrie, Max-Planck-Institut, München (Direktor: Prof. Dr. W. SCHOLZ).

Über die kombinierte Anwendung von Phasenkontrast- und Polarisationsbild in der Histopathologie des Zentralnervensystems.

Von

Th. v. HIRSCH und H. HAGER*.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 20. Dezember 1954.)

Es ist eine für den Histologen und Histopathologen sehr bemerkenswerte Tatsache, daß im Zentralnervensystem das Strukturbild der Markscheiden infolge ihrer Doppelbrechung bei Beobachtung zwischen gekreuzten Polarisatoren hell auf dunklem Grund sichtbar wird. Schon Ende des vorigen Jahrhunderts hat H. AMBRONN (1890) das optische Verhalten des Nervenmarkes in einer grundlegenden Arbeit weitgehend aufgeklärt. Die Darstellung der Markscheiden am ungefärbten Präparat zwischen gekreuzten Polarisatoren, welche wir der Kürze halber das Polarisationsbild nennen wollen, ist von H. AMBRONN u. H. HELD (1896) zum Studium der Entwicklung des Nervenmarkes bei jugendlichen Tieren und von K. BRODMANN (1901) zur Untersuchung degenerierter markhaltiger Nervenfasern angewendet worden. Die genannten Autoren haben besonders darauf hingewiesen, daß das Polarisationsbild der Markscheiden den vergleichsweise herangezogenen WEIGERT- und Osmiumpräparaten nicht nur gleichwertig ist, sondern wegen der Einfachheit, Zuverlässigkeit und Vollständigkeit der Darstellung sogar den Vorzug verdient. Seitdem ist die polarisationsoptische Methode in zahlreichen Arbeiten über das Nervenmark verwendet worden.

Man sollte sich aber vergegenwärtigen, daß damals als Polarisatoren nur NICOLSche Prismen in Frage kamen, welche recht teuer sind und im allgemeinen das ausnutzbare Gesichtsfeld stark einengen. Infolgedessen besaß die Mehrzahl der routinemäßig verwendeten Mikroskope keine Polarisationseinrichtung, was einer allgemeineren Verbreitung polarisationsoptischer Methoden in der Histopathologie des Nervensystems hemmend entgegenstand. Heute besitzen wir die billigen und leistungsfähigen Filterpolarisatoren, welche ein fast selbstverständliches Zubehör zu jedem modernen Mikroskop sind. Dies wäre für sich allein ein Grund,

* Herrn Prof. Dr. W. SCHOLZ zum 65. Geburtstag.

für die Darstellung der Markscheiden das Polarisationsbild in steigendem Maße heranzuziehen.

Das Polarisationsbild erhält man vom ungefärbten Schnitt. Man vermeidet dabei alle durch den Färbeprozess möglicherweise bedingten Veränderungen im Gewebe und erspart sich die Arbeit des Färbens. Die Verwendung ungefärbter Präparate ist aber auch charakteristisch für das Phasenkontrastverfahren, welches seit etwa einem Jahrzehnt in zunehmendem Maße in den verschiedensten Gebieten der Mikroskopie verwendet wird. Es hat nichts mit Doppelbrechung oder polarisiertem Licht zu tun, ist aber in hervorragender Weise geeignet um alle Gewebsstrukturen in einem panoptischen Bild darzustellen. Es ist naheliegend, daß es besonders in der Histopathologie des Zentralnervensystems nützlich wäre, ein Phasenkontrastmikroskop mit Polarisationseinrichtung zu verwenden und so am selben Präparat und im gleichen Gesichtsfeld das panoptische Phasenkontrastbild mit der dazugehörigen Darstellung der Markscheiden im Polarisationsbild vergleichen zu können.

Wollte man für diese kombinierte Methode einen ungefärbten Schnitt verwenden, der in üblicher Weise in Alkohol entwässert und über Xylol in Caedax eingeschlossen ist, so erhielte man weder ein Polarisationsbild noch ein brauchbares Phasenkontrastbild. Denn einerseits zerstört schon die Behandlung mit Alkohol die Doppelbrechung der Markscheiden, andererseits entspricht der Brechungsindex von Caedax nicht den Voraussetzungen für eine gute Darstellung im Phasenkontrast. Für das Polarisationsbild der Markscheiden ist Glycerin das seit langem bewährte Einschlußmittel, es gibt aber bei der allgemein verwendeten Schnittstärke von 10–20 μ ein sehr schlechtes Phasenkontrastbild. Somit stellt sich die Aufgabe, ein für beide Abbildungsarten gleichermaßen geeignetes Einschlußmittel zu finden.

Wir werden im ersten Teil dieser Arbeit kurz zusammenfassend auf die Doppelbrechung der Markscheiden im Zusammenhang mit ihren Struktureigentümlichkeiten und auf die optischen Erfordernisse bei der Phasenkontrastabbildung eingehen und dann Herstellung und Anwendungsweise eines geeigneten Einschlußmittels beschreiben. Im zweiten Teil soll über die Anwendung der Methode in der Histopathologie des Nervensystems berichtet werden¹.

Doppelbrechung der Markscheide.

Die Doppelbrechung der Markscheide wurde zum erstenmal von F. EHRENBURG (1849) beobachtet. G. VALENTIN (1861) hat die Auffassung vertreten, daß sie sich optisch wie ein negativ einachsiger Kristall verhält, dessen optische Achse in Richtung der Faser liegt. Danach würde in einem Nervenlängsschnitt dem parallel zur Faserichtung schwingen-

¹ Der erste Teil wurde von TH. V. HIRSCH, der zweite von H. HAGER bearbeitet.

den Licht der kleinste, und dem senkrecht zur Faserrichtung schwingenden Licht der größte Brechungsindex zukommen, während ein Nervenquerschnitt keine Doppelbrechung zeigen sollte.

In einem optisch einachsigen Kristall hat der Brechungsindex für linear polarisiertes Licht, welches in irgendeiner Richtung senkrecht zur optischen Achse schwingt, denselben Wert, während für parallel zur optischen Achse schwingendes Licht der Brechungsindex einen davon abweichenden Wert hat. Der Kristall heißt positiv einachsig, wenn der Schwingungsrichtung parallel zur optischen Achse der größere Brechungsindex zukommt, im gegenteiligen Fall heißt er negativ einachsig. Um im Polarisationsmikroskop positiv einachsige von negativ einachsigen Kristallen zu unterscheiden, bedient man sich eines Gipsplättchens Rot I. Ordnung. Auf der Fassung des Gipsplättchens ist durch eine Strichmarke die Richtung gekennzeichnet, welche dem größten Brechungsindex entspricht. Bringt man das Gipsplättchen so in den Strahlengang, daß die Strichmarke in 45° -Stellung zu den Schwingungsrichtungen von Polarisator und Analysator steht, so erscheint das Gesichtsfeld in der Interferenzfarbe Rot I. Ordnung. Bringt man nun den zu untersuchenden Kristall in das Gesichtsfeld und dreht ihn so, daß seine optische Achse parallel zur Richtung der Strichmarke steht, so zeigt er die Additionsfarbe Blau oder die Subtraktionsfarbe Gelb, je nachdem ob er positiv einachsig oder negativ einachsig ist. Bei Drehung des Kristalls um 90° kehren sich die Farben um.

G. KLEBS (1865) hat erstmalig erkannt, daß die Markscheiden auch im Querschnitt doppelbrechend sind. Sie zeigen zwischen gekreuzten Polarisatoren ein positives Interferenzkreuz, ähnlich wie Stärkekörner. Er hat auch die richtige Erklärung hierfür gegeben, nämlich, daß die Markscheide sich optisch so verhält, als ob sie aus positiv einachsigen Kristallen aufgebaut wäre, deren optische Achsen radial zur Längsachse des Nerven angeordnet sind. Man erkennt ohne weiteres, daß auch bei dieser Anordnung die Zuordnung des kleinsten Brechungsindex zur Längsrichtung des Nerven bestehen bleibt.

Um dieses für die Doppelbrechung der Markscheiden sehr charakteristische Merkmal zum Ausdruck zu bringen, hat es sich eingebürgert, in Anlehnung an die bei Kristallen gebräuchliche Bezeichnungsweise, die Markscheiden als „negativ doppelbrechend in bezug auf die Längsachse“ zu bezeichnen. Mit dieser Ausdrucksweise soll nur gesagt werden, daß für linear polarisiertes Licht, welches in Richtung der Längsachse der Nervenfaser schwingt, der Brechungsindex den kleinsten Wert hat. Als einfaches Unterscheidungsmerkmal ist dies insofern von Bedeutung, als die meisten anderen faserigen Gewebsbestandteile, z. B. Muskel-, Bindegewebs- und Gliafasern „positiv doppelbrechend in bezug auf die Längsachse“ sind.

Dieses Modell macht auch die Beobachtung verständlich, daß bei einer der Länge nach im Gesichtsfeld liegenden einzelnen Nervenfaser zwischen gekreuzten Polarisatoren immer nur zwei parallele Randstreifen hell aufleuchten, während die Mitte dunkel bleibt. Dieses Verhalten ist leicht verständlich, wenn man sich vergegenwärtigt, daß die radial um die Längsachse angeordneten optischen Achsen im mittleren Streifen zur Blickrichtung parallel, in den Randstreifen quer zu ihr liegen, und daß bei allen optisch einachsigen Kristallen die Doppelbrechung bei Beobachtung in Richtung der optischen Achse verschwindet.

Als Träger der beschriebenen Doppelbrechung müssen die Lipide angesehen werden, welche einen großen Teil der Substanz des Nervenmarkes ausmachen. Unter der Bezeichnung Lipide ist hier ein recht kompliziertes Gemisch von Glycerinphosphatiden, Sphingomyelinen und Cerebrosiden, sowie Cholesterin zu verstehen. Über ihren chemischen Aufbau hat E. KLENK (1953) eine zusammenfassende Darstellung gegeben. (Siehe auch die Monographie von H. THIERFELDER u. E. KLENK [1930].) Durch Behandlung mit Alkohol und Äther oder anderen lipidlösenden organischen Lösungsmitteln kann man die Lipide aus der Markscheide entfernen, wodurch auch die durch sie bedingte Doppelbrechung verschwindet. W. J. SCHMIDT (1936) hat diesen Vorgang näher untersucht und gezeigt, daß bereits 50%iger Alkohol einen Teil des Lipoids unter intermediärer Bildung von Myelinkugeln auflöst, während der Proteinanteil der Markscheide dabei die als Neurokeratin-Netzwerk beschriebenen Formen annimmt. Auch durch Erhitzen in verdünntem Glycerin auf etwa 100° wird die Doppelbrechung zerstört, wobei aber im Gegensatz zur Wirkung des Alkohols die Lipide nicht herausgelöst werden, sondern nur durch eine Art Schmelzvorgang die Parallelorientierung der Lipoidmoleküle aufgehoben wird. Nach dem Erkalten kehrt die frühere Doppelbrechung in voller Stärke wieder zurück.

In einer sehr sorgfältigen Untersuchung konnte nun H. AMBRONN (1890) zeigen, daß nach Herauslösen der Lipide eine bedeutend schwächere Doppelbrechung noch übrigbleibt. Diese kann nicht auf ungelöste Lipoidreste zurückgeführt werden, da sie in bezug auf die Längsachse der Nervenfaser positives Vorzeichen hat, im Gegensatz zu der von den Lipoiden herrührenden negativen Doppelbrechung. Diese positive Doppelbrechung muß dem Proteinbestandteil des Nervenmarkes zugeschrieben werden. Die hier vorliegenden Verhältnisse sind von W. J. SCHMIDT (1936) aufgeklärt worden. Er konnte zeigen, daß der Proteinbestandteil der Markscheide zwar keine Eigendoppelbrechung besitzt wie die Lipide, aber infolge seiner Anordnung in koaxialen zylindrischen Schichten eine positive Formdoppelbrechung verursacht.

Formdoppelbrechung entsteht immer dann, wenn langgestreckte (Stäbchendoppelbrechung) oder flächenhaft ausgebildete (Schichtendoppelbrechung) Strukturen, welche keine Eigendoppelbrechung besitzen, in paralleler Orientierung in einem Medium von abweichendem Brechungsindex angeordnet sind. Die Gesetzmäßigkeiten der Formdoppelbrechung sind theoretisch von O. WIENER (1904, 1909) und experimentell von H. AMBRONN (1916) untersucht worden. Ein Mischkörper mit Stäbchendoppelbrechung verhält sich wie ein positiv einachsiger Kristall, dessen optische Achse parallel zur Längsrichtung der Stäbchen liegt, während ein Mischkörper mit Schichtendoppelbrechung sich wie ein negativ einachsiger Kristall verhält, dessen optische Achse senkrecht auf den Schichten steht. Die Formdoppelbrechung der entmyelinisierten Markscheiden ist eine Schichtdoppelbrechung, die sich so verhält, als ob negativ einachsige Kristalle mit ihren optischen Achsen senkrecht zur Nervenfaser orientiert wären. Dies ergibt „in bezug auf die Längs-

richtung“ eine positive Formdoppelbrechung. In einem wäßrigen Medium ($n=1,33$) ist die Formdoppelbrechung der entmyelinisierten Markscheiden verhältnismäßig groß, wenn auch noch kleiner als die früher besprochene Eigendoppelbrechung des Myelins. Wird das Wasser durch eine Flüssigkeit von höherem Brechungsindex ersetzt, nimmt die Formdoppelbrechung ab und verschwindet ganz, wenn der Brechungsindex der Durchtränkungsflüssigkeit mit demjenigen der die Formdoppelbrechung verursachenden Eiweißschichten ($n = 1,54$) übereinstimmt. Erhöht man den Brechungsindex der Durchtränkungsflüssigkeit weiter, so nimmt die Formdoppelbrechung wieder zu, behält aber das gleiche Vorzeichen.

Aus den beschriebenen eigenartigen Doppelbrechungserscheinungen in Verbindung mit dem chemischen Aufbau und den Ergebnissen der Röntgenstrukturuntersuchungen von F. O. SCHMITT u. Mitarb. (1935, 1939, 1941, 1950) hat man folgendes Bild vom Bau der Markscheiden gewonnen, welches auch mit den elektronenmikroskopischen Untersuchungen von H. FERNANDEZ-MORAN (1950, 1952, 1953) im Einklang ist. Die Markscheide besteht aus einer großen Anzahl von übereinander gelagerten Lipoid-Proteinschichten von $18\text{ m}\mu$ Dicke, welche den Achsenzylinder konzentrisch umschließen. Die Lipide sind in einer molekularen Doppelschicht so angeordnet, daß die radial zur Nervenfasern stehenden langgestreckten Paraffinketten der Fettsäuren ihre freien Enden einander zukehren, während die hydrophilen Gruppen nach außen gerichtet sind und die Verbindung mit den etwa $3\text{ m}\mu$ dicken Proteinschichten herstellen, welche zwischen den Lipiddoppelschichten eingefügt sind.

Für die Praxis der Beurteilung der Doppelbrechung der Markscheiden ist es wichtig nochmals hervorzuheben, daß die Doppelbrechung „in bezug auf die Längsachse der Nervenfasern“ sich aus zwei Anteilen zusammensetzt, einer negativen Eigendoppelbrechung, welche vom Brechungsindex des Einschlußmediums unabhängig ist, und einer positiven Formdoppelbrechung, welche um so größer ist, je mehr der Brechungsindex des Einschlußmediums von demjenigen der Markscheidentrockensubstanz abweicht und bei Übereinstimmung beider Brechungsindizes ganz verschwindet. Die Gesamtdoppelbrechung erreicht somit ihren größten negativen Wert, wenn der Brechungsindex des Einschlußmittels etwa gleich 1,54 (dem Durchschnittswert für das wasserfreie Gewebe) ist. In Wasser hat die Gesamtdoppelbrechung bei Wirbeltieren nur noch einen ziemlich kleinen negativen Wert. Bei vielen Wirbellosen ist infolge einer geringeren Myelinisierung der Anteil der negativen Eigendoppelbrechung soweit herabgesetzt, daß die Gesamtdoppelbrechung in Wasser bereits schwach positiv ist, während sie in Glycerin negative Werte hat. Diese Beobachtung wurde schon von G. F. GÖTHLIN (1913) gemacht und hat ihn veranlaßt, zwischen myelotropen und metatropen Nerven zu unterscheiden. Die obige Deutung stammt von P. CHINN u. F. O. SCHMITT (1937).

Für ein Einschlußmittel, welches die Markscheiden im Polarisationsbild mit möglichst großer Helligkeit darstellen soll, ergeben sich somit

die beiden Forderungen, daß es kein Lösungsvermögen für die Lipide der Markscheide haben darf und daß sein Brechungsindex dem Wert 1,51 möglichst nahe kommt.

Phasenkontrastabbildung.

Das Phasenkontrastverfahren, dessen Einführung in die Mikroskopie auf die grundlegenden Arbeiten von F. ZERNIKE (1934, 1935, 1942) zurückgeht, erzeugt durch einen physikalischen Eingriff in den Strahlengang im Mikroskop Schwarz-Weiß-Bilder von ungefärbten Objekten. Man verwendet Spezialobjektive, welche in ihrer hinteren Brennebene ein ringförmiges Phasenplättchen enthalten. Dieses besteht aus einer dünnen, durch Aufdampfen auf eine Linsenfläche hergestellten Schicht, welche die Aufgabe hat, dem durchfallenden Licht eine Phasenverschiebung von einer Viertelwellenlänge zu erteilen und es gleichzeitig durch Absorption zu schwächen. Die Irisblende im Kondensor wird durch eine Ringblende ersetzt, deren Größe so bemessen ist, daß ihr optisches Bild in der hinteren Brennebene des Objektives mit dem Phasenplättchen zur Deckung kommt. Für die Bildentstehung ist es wesentlich, daß das im Präparat abgebeugte Licht außerhalb des Phasenplättchens durch das Objektiv geht, während das direkte Licht durch das Phasenplättchen hindurchgeht.

Es werden alle Strukturen des ungefärbten Präparates abgebildet, welche sich durch Unterschiede in der Lichtbrechung gegeneinander oder gegen das Einschlußmittel abheben. Um ein gutes Bild zu erhalten, ist es wichtig, daß diese Brechzahlunterschiede weder zu klein noch zu groß sind, was man durch geeignete Wahl des Brechungsindex des Einschlußmittels erreichen kann. Für histologische Schnitte von 10—20 μ Dicke konnte gezeigt werden, daß der günstigste Wert für den Brechungsindex des Einschlußmittels 0,02 bis 0,03 Einheiten unterhalb des Brechungsindex der wasserfreien Gewebesubstanz, d. h. bei 1,51 bis 1,52 liegt (TH. v. HIRSCH 1953).

Für das Polarisationsbild waren wir zu einem optimalen Wert von 1,54 für den Brechungsindex des Einschlußmittels gelangt. Hierzu ist noch zu bemerken, daß hier Abweichungen von einigen Einheiten der zweiten Dezimale noch keinen merklichen Unterschied in der Helligkeit des Polarisationsbildes verursachen.

Es ist also möglich, die Anforderungen für das Polarisationsbild und für das Phasenkontrastbild gleichzeitig zu erfüllen, wenn man ein Einschlußmittel findet, welches die Lipide der Markscheide nicht auflöst und einen Brechungsindex von 1,51 bis 1,52 hat.

Einschlußmittel.

Mit Rücksicht auf die Löslichkeit der Lipide muß man auf die Verwendung von Alkohol, Aceton und allen aliphatischen und aromatischen Kohlenwasserstoffen verzichten. Glykol ($n = 1,431$) und Glycerin

($n = 1,473$) greifen zwar die Markscheiden nicht an, haben aber einen zu kleinen Brechungsindex.

Man kommt zum Ziel, wenn man wasserfreies Glycerin (Glycerin bidest., $d = 1,26$, Merck) mit Phthalsäureanhydrid kurz bis 200° erhitzt. Das Phthalsäureanhydrid löst sich bei etwa 100° auf und bildet bei weiterer Erwärmung Glycerin-Phthalsäureester. Bei Verwendung äquivalenter Mengen würde als Endprodukt ein hartes, alkohollösliches, in Wasser unlösliches Harz entstehen, das wegen seiner Löslichkeitseigenschaften für unsere Zwecke nicht brauchbar wäre. Bei genügend großem Überschuß an Glycerin und wenn beim Erhitzen die Endtemperatur von 200° eingehalten wird, ist das Reaktionsprodukt eine zähe, fast farblose, mit Wasser verträgliche Flüssigkeit. Der Brechungsindex steigt

mit zunehmendem Gehalt an Phthalsäureanhydrid (PSA), wie folgende Tabelle zeigt.

Tabelle.

Glycerin g	PSA g	n
10	0	1,473
10	2	1,493
10	4	1,509
10	6	1,522
10	8	1,533
10	10	1,542
10	12	1,549

Die für unsere Zwecke geeignetste Zusammensetzung ist 10 g Glycerin und 5 g Phthalsäureanhydrid mit $n = 1,515$.

Für die Herstellung der Präparate verwendet man Gefrierschnitte von formalinfixiertem Material. Sie werden aus Was-

ser auf Objektträger aufgezogen und sofort, ohne antrocknen zu lassen, mit einer reichlichen Menge Einschlußmittel ganz bedeckt. Das Antrocknen der Schnitte auf dem Objektträger muß vermieden werden, weil dadurch die Doppelbrechung der Markscheiden beeinträchtigt oder bei längerer Dauer sogar fast vollständig zerstört werden kann. Bevor das Deckglas aufgelegt wird, wartet man so lange, bis der Schnitt ganz aufgeheilt ist, was höchstens einige Minuten dauert. Nach Auflegen des Deckglases muß das Präparat einige Stunden beschwert werden, damit der Schnitt glatt liegt und das überschüssige Einschlußmittel herausgedrückt wird. Es schadet nicht, wenn dabei etwas Einschlußmittel über das Deckglas fließt, weil das Präparat anschließend unter einem feinen Strahl fließenden Wassers abgewaschen und dann, am besten in stehender Lage, getrocknet wird.

Durch die zähflüssige Konsistenz des Einschlußmittels haftet das Deckglas auf dem Objektträger. Da das Einschlußmittel aber nicht erhärtet, ist es zweckmäßig, das Präparat zu umranden. Man verwendet hierfür einen schnell trocknenden Klarlack, der mit dem Einschlußmittel nicht mischbar ist und infolgedessen nicht durch Eindringen unter das Deckglas das Präparat verändern kann. Einen Umrandungslack, der sich im Gebrauch gut bewährt hat, erhält man durch Auflösen von 8 g

hellem Colophonium und 2 g Pioloform BL (Dr. Alexander Wacker G. m. b. H., München) in 20 cm³ Chlorbenzol.

Anwendung in der Histopathologie des Zentralnervensystems.

Um die Verwendbarkeit und Leistungsfähigkeit des Verfahrens in der Histopathologie des Zentralnervensystems zu erproben, haben wir von geeigneten Fällen in der beschriebenen Weise Präparate hergestellt und die Phasenkontrast- und Polarisationsbilder mit solchen von gefärbten Präparaten verglichen. Es war zu prüfen, in welcher Form die normalen und pathologisch veränderten Strukturen des zentralnervösen Gewebes auf diesem Wege, der von jeder färberischen und sonstigen Vorbehandlung unabhängig macht, zur Darstellung kommen.

Von den Ganglienzellen, die ja in den einzelnen grauen Massen beträchtliche Unterschiede in Form und Größe aufweisen, treten im Phasenkontrastbild die Zellgrenzen, die Kernmembran, Chromatinpartikel und Nucleolen prägnant hervor; die NISSL-Schollen sind meist in derselben Form und Anordnung erkennbar, die wir in nach NISSL gefärbten Präparaten zu sehen gewohnt sind. Lipofuscinpigment wird in Form dunkler Körnchen sichtbar (Abb. 1a), sonstige Protoplasmaeinlagerungen und Granulationen treten je nach Größe und Lagerung der Teilchen mehr oder weniger gut hervor. Was die Veränderungen der Nervenzellen betrifft, so sind bei primär gereizten Zellen die Schwellung des Zelleibes, die zentrale Tigrolyse und die Kernverdrängung gut zu erkennen. Nicht so sicher wie im nach NISSL gefärbten Präparat kann man sich im Phasenkontrastbild über das Vorliegen von atrophischen und Schrumpfungszuständen, von Zerfalls- und Verflüssigungsprozessen und ischämischen Zellveränderungen Rechenschaft geben. Die ALZHEIMERSche Fibrillenveränderung ist, wie alle nur im Silberbild darstellbaren neurofibrillären Strukturen, phasenoptisch nicht zu erkennen.

Die Markscheiden der zentralen und peripheren Nervenfasern zeichnen sich meist schon phasenkontrastmikroskopisch deutlich ab. Bei Anwendung der Polarisationseinrichtung läßt sich mühelos im selben Schnitt und im selben Gesichtsfeld die Gliederung und Anordnung der Markmängel erkennen, die sich als hell leuchtende Längs- und Querschnitte vom dunklen Untergrund abheben (Abb. 1b). Sowohl Struktur und Verlauf geschlossener Faserbündel als auch feinere myeloarchitektonische Einzelheiten der Großhirnrinde werden auf diese Weise sichtbar. Die gestaltlichen Umwandlungen bei Zerfallsvorgängen an den Markscheiden, nämlich Quellungen, Anschwellungen und Auftreibungen des Myelins, Zerfall des Markrohres in Ballen, Kugeln und Scheiben, kommen im Polarisationsbild ausgezeichnet zur Darstellung. Daß Abnahme und Verschwinden der Doppelbrechung des Myelins einen empfindlichen Indicator für früheste Stadien von Markfaserschädigungen darstellt, haben Unter-

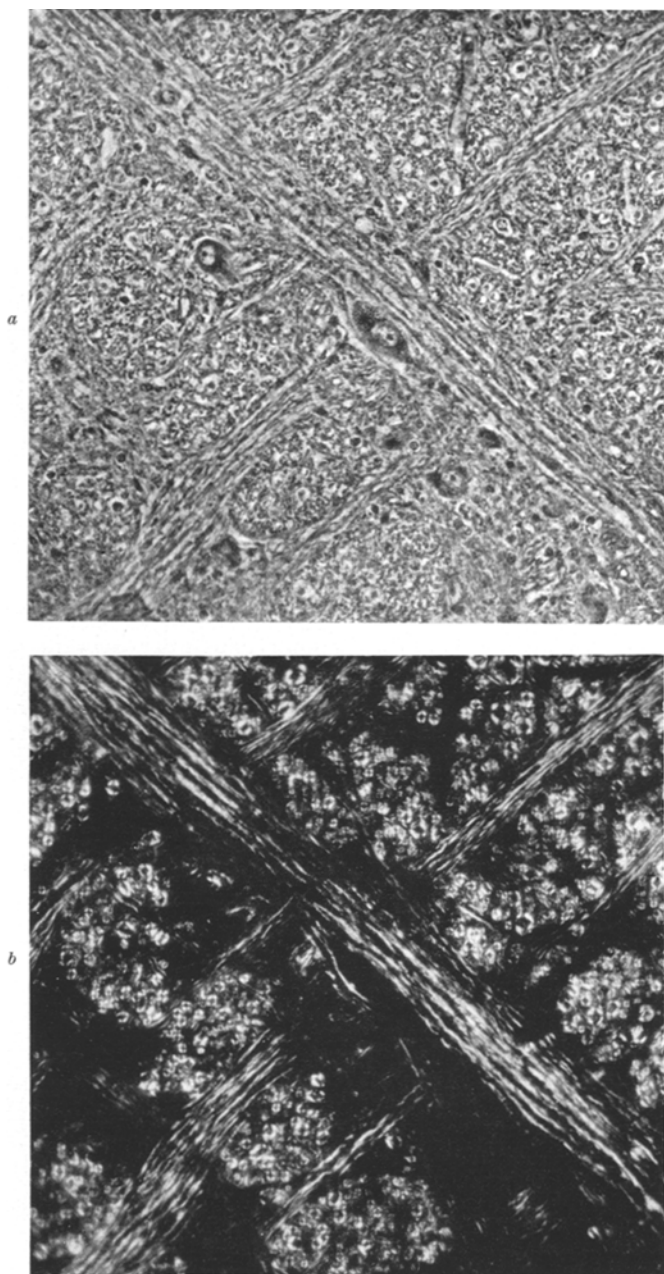


Abb. 1a u. b. Aus der Substantia reticularis grisea der Medulla oblongata. Sich durchflechtende quer und längs getroffene Markfaserbündel; lipofuscinhaltige Ganglienzellen. Phasenkontrast- und Polarisationsbild. In letzterem erscheinen die Markscheidenbündel hell auf dunklem Grund.

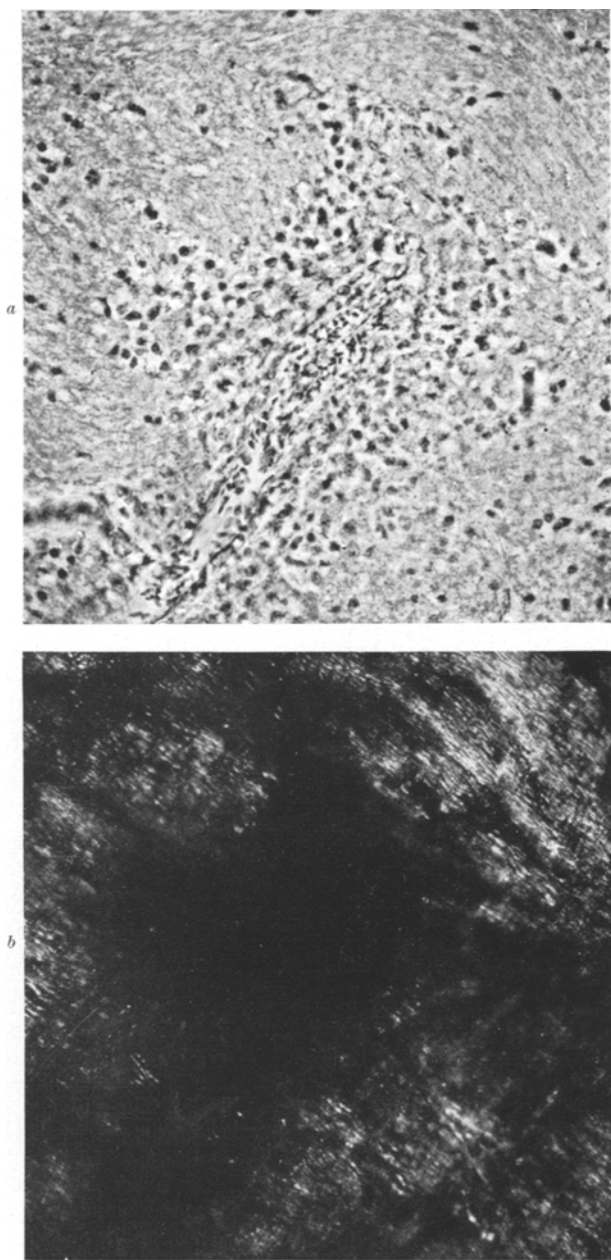


Abb. 2a u. b. Fall von postvaccinaler Encephalitis. Lebhaftes gliös-mesenchymale Zellreaktion, saumförmig eine tangential getroffene Markvene umschließend. Wucherung des gliösen Interstitiums in der näheren Umgebung. Phasenkontrast- und Polarisationsbild. Letzteres zeigt den Untergang der Markfasern im Bereich der Reaktionszone.

suchungen von sekundär-degenerativen Vorgängen durch BRODMANN (1901), SETTERFIELD u. SUTTON (1935), SCHABEL (1936), DRAGANESCO u. CASANGIU (1938), PRICKET u. STEVENS (1939) und MARMIER (1945) ergeben.

Als sehr vorteilhaft erwies sich die Möglichkeit, durch den Übergang auf das Phasenkontrastbild im selben Gesichtsfeld die cellulären Reaktionen und Abbauvorgänge im Bereich von Entmarkungsprozessen analysieren zu können, so daß wenig Prozeßeigentümliches der Darstellung entgeht. Bei einem Fall von postvaccinaler Encephalitis sind z. B. im Marklager die perivenös angeordneten Säume lebhaft reagierender gliös-mesenchymaler Zellelemente phasenoptisch gut zu erkennen, während sich im Polarisationsbild im Bereich der Reaktionszone der Untergang der Markscheiden darstellt (Abb. 2a u. b). Bei einem Fall von akuter multipler Sklerose zeigte das Polarisationsbild des Rückenmarkes zahlreiche disseminierte, unscharf begrenzte Entmarkungsherde (Abb. 3). Im Bereich dieser Herde waren im Phasenkontrastbild an den Gefäßen massive rundzellige Infiltrationen und progressive Umwandlung ortständiger gliöser Elemente zu erkennen. Als weiteres Beispiel möge ein frischerer Herd von multipler Sklerose dienen. Bei schwacher Vergrößerung treten im polarisierten Licht neben der scharfen Herdbegrenzung die in größerer Menge vorhandenen doppelbrechenden Abbauprodukte hervor (Abb. 4). Bei stärkerer Vergrößerung sieht man, daß sie teils in Körnchenzellen, teils frei in dem große Faserbildner enthaltenden Narbengewebe liegen (Abb. 5a u. b). Durch ihre nadelförmige Gestalt und sehr starke Doppelbrechung sind diese Gebilde, die in der Literatur als Cholesterinesterkristalle beschrieben worden sind (KAWAMURA 1911, AMORIM 1934), nicht zu verkennen.

Es sei noch erwähnt, daß Schnitte von Hirnmaterial, welches lange Zeit in Formalin gelegen war, oft mit doppelbrechenden Niederschlägen übersät sind. Ihre wahllose Anordnung und das Fehlen jeder regelmäßigen Beziehung zu bestimmten Gewebsveränderungen legt von vornherein die Annahme nahe, daß es sich um Kunstprodukte handelt. Sie wurden als solche von TEBELIS (1938) beschrieben.

Von großer Bedeutung ist es schließlich, daß nicht nur die Zellelemente des gliösen Interstitiums, sondern auch Gliafaserbildungen in ihrer wechselnden Struktur und Dichte im Phasenkontrastbild besonders gut zu sehen sind. Am schönsten stellen sich locker gefügte, schwammig strukturierte Faserfilze dar, wie wir sie in älteren Entmarkungsherden bei multipler Sklerose finden (Abb. 6). Parallelfaserige isomorphe Gliosen treten ebenfalls in ihrer fibrillären Struktur gut hervor. Bei atrophisierenden Prozessen, wie z. B. bei der Chorea HUNTINGTON, sind faserbildende Gliazellen in früheren Prozeßstadien oft nur spärlich vorhanden. Sie sind aber auch in diesen Fällen bei sorgfältiger Durchmusterung des Präparates im Phasenkontrastbild zu erkennen.

Abschließend bleibt noch zu erörtern, in welcher Form die Kombination von Phasenkontrast- und Polarisationsbild in der Histopathologie des Nervensystems mit Vorteil verwendet werden kann. Nach unseren



Abb. 3. Akute multiple Sklerose. Rückenmarksquerschnitt. Diffuse und herdförmig disseminierte Entmarkung, besonders im Bereich der Hinter- und Seitenstränge. Polarisationsbild.

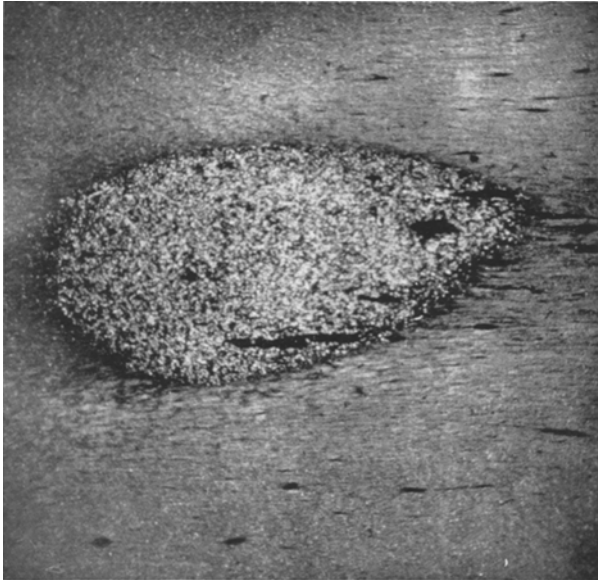


Abb. 4. Multiple Sklerose. Nicht sehr alter, ziemlich scharf und regelmäßig begrenzter Herd im Großhirnmarklager, angefüllt mit intensiv doppelbrechenden Abbauprodukten. Polarisationsbild.

Erfahrungen ist es zweckmäßig, neben der Färbung mit Kresylviolett, von formolfixierten Gefrierschnitten ungefärbte Präparate mit dem

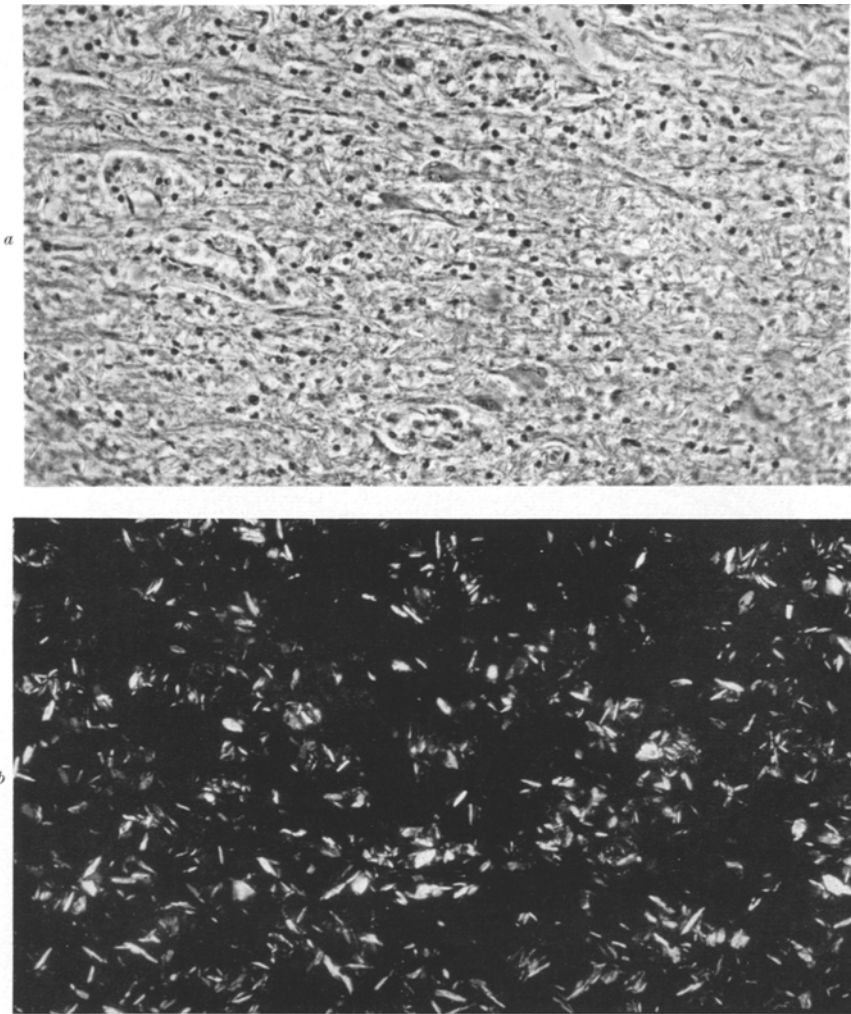


Abb. 5a u. b. Aus der Randzone des in Abb. 4 dargestellten Herdes. In glöser Organisation befindlicher zellreicher Herd. Neben großen, plasmareichen Faserbildern zahlreiche, verstreut im Gewebe liegende doppelbrechende Lipoidkristalle. Phasenkontrast- und Polarisationsbild desselben Gesichtsfeldes.

beschriebenen Einschlußmittel anzufertigen. Damit ist in Ergänzung des gefärbten Zellbildes durch das Phasen- und Polarisationsbild ohne nennenswerten mikrotechnischen Mehraufwand eine weitergehende Orientierung über die feingeweblichen Merkmale eines Gewebsprozesses

möglich. Wie im einzelnen erörtert wurde, gelangt man damit auf schnellem und einfachem Wege unter anderem zu einem Überblick über den Zustand der Markscheiden und weitgehend auch über die Existenz und Struktur pathologischer Gliafaserbildungen. Dieser ersten Orientierung muß gegebenenfalls die zielgerichtete Anwendung von färbereischen

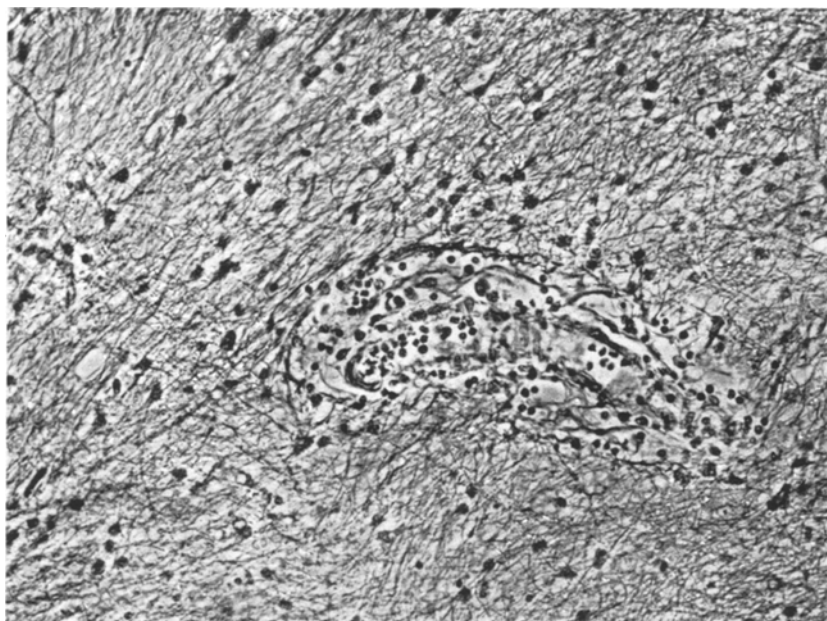


Abb. 6. Multiple Sklerose, älterer subcorticaler Entmarkungsherd. Dichtverflochtener, relativ zellarmer Gliafaserfilz. Kleines, tangential geschnittenes Gefäß mit Resten rundzelliger Infiltration im adventiellen Raum. Phasenkontrast.

Spezialmethoden zur Darstellung der einzelnen krankhaft veränderten Gewebsteile folgen. Nicht selten werden jedoch die zusätzlichen Auskünfte, welche uns das Phasenkontrast- und Polarisationsbild gibt, ausreichend sein, um den Charakter von Gewebsprozessen zu erkennen.

Zusammenfassung.

Es wird gezeigt, daß in der Histopathologie des Nervensystems sowohl die Markscheiden und ihre Veränderungen als auch die cellulären Elemente und die pathologischen Gliafaserbildungen in ein und demselben ungefärbten Gefrierschnitt dargestellt werden können. Dies wird erreicht durch Kombination des Phasenkontrast- und Polarisationsbildes und Anwendung eines eigens hierfür entwickelten Einschlußmittels, dessen Herstellung beschrieben wird. Der Anwendungsbereich des Verfahrens wird an Hand von Beispielen diskutiert.

Literatur.

AMBRONN, H.: Das optische Verhalten markhaltiger und markloser Nervenfasern. Ber. Sächs. Ges. Wiss. (math.-phys. Kl.) **42**, 419 (1890). — Über das Zusammenwirken von Stäbchendoppelbrechung und Eigendoppelbrechung. Kolloid. Z. **18**, 90, 273 (1916). — AMBRONN, H., u. H. HELD: Beiträge zur Kenntnis des Nervenmarks. Arch. f. Anat. (Anat. Abt.) **1896**, 202, 214, 222. — AMORIM, M.: Das Vorkommen kristallinischer Lipoide in den Körnchenzellen und deren histochemische Unterscheidung. Z. Neur. **151**, 171 (1934). — BRODMANN, K.: Die Anwendung des Polarisationsmikroskops auf die Untersuchung degenerierter markhaltiger Nervenfasern. Zbl. Nervenheilk. **24**, 193 (1901). — CHINN, P. and F. O. SCHMITT: On the birefringence of nerve sheaths as studied in cross sections. J. Cellul. a. Comp. Physiol. **9**, 288 (1937). — DRAGANESCO, S. et D. CASANGIU: Etude sur la birefringence dans les phenomenes de degenerescence des nerfs peripheriques au cours de lesions experimentales et de pathologie humaine. Arch. roum. Path. expé. **11**, 103 (1938). — EHRENBURG, F.: Resultate bei Anwendung des chromatisch polarisierten Lichtes für mikroskopische Verhältnisse. Ber. Verh. preuss. Akad. (1849). — FERNANDEZ-MORAN, H.: Elektronenmikroskopische Untersuchung der Markscheide und des Achsenzyllinders im internodalen Abschnitt der Nervenfasern. Experientia (Basel) **6**, 339 (1950). — The submicroscopic organisation of vertebrate nerve fibres. Exper. Cell Res. **3**, 282 (1952); **4**, 480 (1953). — GÖTHLIN, G. F.: Die doppelbrechenden Eigenschaften des Nervensystems, ihre Ursachen und ihre biologischen Konsequenzen. K. Svenska Vetensk. Akad. Handl. **51**, 1 (1913). — HIRSCH, TH. v.: Phasenkontrastmikroskopie histologischer Schnitte. Z. wiss. Mikrosk. **61**, 337 (1953). — KAWAMURA, R.: Die Cholesterinesterverfettung. Jena 1911. — KLEBS, G.: Die Nerven der organischen Muskelfasern. Virchows Arch. **32**, 168 (1865). — KLENK, E.: Die Lipoide im chemischen Aufbau des Nervensystems. Naturwissenschaften **40**, 449 (1953). — MARMIER, C.: Demonstration über die Doppelbrechung am Nerven im Verlauf der sekundären Degeneration. Helvet. physiol. Acta **3**, 24 (1945). — PRICKET, C. O., and C. STEVENS: Verwendung polarisierten Lichtes zur Untersuchung von Myelindegenerationen. Amer. J. Path. **15**, 241 (1939). — SCHABBEL, E.: Zahlenmäßige Beziehungen und polarisationsoptische Analyse von Degenerationen im Zentralnervensystem der Schildkröte. Gegenbaur's Jb. [Abt. Anat. u. Ontog.] **61**, 391 (1936). — SCHMIDT, W. J., Doppelbrechung und Feinbau der Markscheide der Nervenfasern. Z. Zellforsch. **23**, 657 (1936). — SCHMITT, F. O., R. S. BEAR and G. L. CLARK: X-ray diffraction studies on nerve. Radiology **25**, 131 (1935). — SCHMITT, F. O., and R. S. BEAR: The ultrastructure of nerve axon sheath. Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc. **14**, 27 (1939). — SCHMITT, F. O., R. S. BEAR and K. J. PALMER: J. Cellul. a. Comp. physiol. **18**, 31 (1941). — SCHMITT, F. O.: Morphology in muscle and nerve physiology. Biochim. et Biophysica Acta **4**, 68 (1950). — SETTERFIELD, H. E., and T. S. SUTTON: The use of polarized light in the study of myelin degeneration. Anat. Rec. **61**, 397 (1935). — TEBELIS, F.: Über Fixierungsartefakte im Zentralnervensystem. Z. Neur. **162**, 767 (1938). — THIERFELDER, H., u. E. KLENK: Die Chemie der Cerebroside und Phosphatide. Berlin 1930. — VALENTIN, G.: Die Untersuchung der Pflanzen- und Tiergewebe im polarisierten Licht. Leipzig 1861. — WIENER, O.: Lamellare Doppelbrechung. Physik. Z. **5**, 332 (1904). — Zur Theorie der Stäbchendoppelbrechung. Ber. Sächs. Ges. Wiss. **61**, 113 (1909). — ZERNICKE, F.: Beugungstheorie des Schneidenverfahrens und seiner verbesserten Form, der Phasenkontrastmethode. Physica **1**, 689 (1934). — Das Phasenkontrastverfahren bei der mikroskopischen Beobachtung. Physik. Z. **36**, 848 (1935). — Phase-contrast, a new method for microscopic observation of transparent objects. Physica **9**, 686, 974 (1942).

Dr. TH. V. HIRSCH u. Dr. H. HAGER, München 23, Kraepelinstr. 2.