

Die Chromotrop-Anilinblau-Färbung zur besseren Darstellung frischer Herzmuskelfaserschädigungen*

U. Zollinger

Gerichtlich-Medizinisches Institut der Universität Zürich, Postfach, CH-8028 Zürich,
Schweiz

Improved Representation of Fresh Damage to Myocardial Fibers by Chromotrop-Anilinblue-Staining

Summary. The Chromotrop-Anilinblue (CAB) trichrome staining method, developed for liver specimens, enables rapid detection of fresh damage to myocardial fibers by staining contraction-bands bright red. Dehiscence of the transverse striation, although yet unexplained in its pathogenetic significance, becomes visible with CAB staining. Overall, the method seems less sensitive to artefacts than former so-called infarction-staining-methods. Contraction-bands are not conclusive evidence for ischemic damage, as they also appear in traumatic heart damage (e.g. knife- and gunshot-wounds).

Key word: Myocardial infarction, staining methods

Zusammenfassung. Die für Leberpräparate entwickelte Trichrom-Färbung Chromotrop-Anilinblau (CAB) erlaubt die rasche Erfassung frischer Herzmuskelfaserschädigungen, indem die dabei auftretenden Sarcoplasmaverklumpungen leuchtend-rot angefärbt werden. Eine Dehiszenz der Querstreifung, deren pathogenetische Bedeutung jedoch noch nicht geklärt ist, lässt sich mittels der CAB-Färbung sichtbar machen. Die Färbemethode erscheint insgesamt weniger Artefakt-anfällig als frühere sogenannte Infarkt-Färbungen. Sarcoplasmaverklumpungen weisen nicht zwingend auf eine Ischämie hin, da sie auch bei einem Herztrauma (z. B. Stich, Schuß) anzutreffen sind.

Schlüsselwort: Myokardinfarkt, Färbemethoden

Einleitung

In den letzten Jahren wurden verschiedentlich Versuche unternommen, mittels geeigneter histologischer Färbemethoden durch Hypoxie bzw. Ischämie bedingte Früh-Veränderungen an den Herzmuskelfasern zur Darstellung zu

* Vorgetragen beim 9. Treffen des Arbeitskreises Süddeutscher Rechtsmediziner in Stuttgart, März 1982

bringen [3, 9]. Erwähnt seien in diesem Zusammenhang die Fuchsinfärbung nach Lie [4, 7], die Weinsteinsäure-Kresylechtviolett-Einschlußfärbung [5, 6] und die Wolframsäure-Hämatoxilin (PTAH)-Färbung [10]. Unseres Wissens vermochte sich bis heute keine dieser Methoden zur zuverlässigen Diagnostik einer akuten Coronarinsuffizienz zu etablieren. Dies trotz der Tatsache, daß es mit diesen Färbungen im Tierexperiment gelungen war, bereits 15-20 min nach Unterbindung einer Kranzarterie Alterationen an den Muskelfasern nachzuweisen [8, 10].

In der vorliegenden Arbeit soll eine zwar nicht neue, in diesem Zusammenhang jedoch bisher noch nicht angewendete alternative Färbemethode vorgestellt werden, die unserer Meinung nach zuverlässige Resultate liefert, weder in zeitlicher noch in technischer Hinsicht besondere Anforderungen an das Laboratorium stellt und am formolfixierten und in Paraffin oder Paraplast eingebettetem Material durchgeführt werden kann.

Es handelt sich um die Chromotrop-Anilinblau-Färbung, abgekürzt CAB, eine Trichromfärbung mit den Farbstoffen Chromotrop 2 R, Anilinblau und, zur Kerndarstellung, Weigert's Eisenhämatoxylin. Wie die Mehrzahl der Trichromfärbungen wurde auch diese primär zur Darstellung bindegewebiger Strukturen angewendet. Auf der Suche nach einer beständigen, gleichzeitig Parenchymstrukturen und Bindegewebe hervorhebenden Färbung stießen die Leber-Pathologen des Mount Sinai Hospitals in New York 1965 auf die Mallory-Färbung und modifizierten diese durch Einführung des Farbstoffes Chromotrop 2 R (Bianchi, persönliche Mitteilung). Mittels dieser Methode konnten insbesondere Mallory bodies, Lysosomen und Riesenmitochondrien färberisch hervorgehoben werden.

Zufällig wurde am Institut für Pathologie der Universität Basel erkannt, daß mittels CAB gefärbte Herzpräparate im Bereich von Infarkten und Nekrosen eine Metachromasie aufwiesen (Mihatsch, persönliche Mitteilung). Seit 1980 haben wir diese Färbung in den Gerichtlich-Medizinischen Instituten in St. Gallen und Zürich praktisch routinemäßig am Herzen angewendet (insgesamt etwa 500 Autopsien) und damit gute Erfahrungen gemacht. Da sich Herzschwielen durch intensive Blaufärbung vom Muskelgewebe deutlich abheben, konnte nunmehr auf die bisher übliche van Gieson-Färbung verzichtet werden.

Methode

Die Fixation der Gewebestücke erfolgt in 4%iger wässriger Formalinlösung. Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe, Xylol. Einbetten in Paraffin oder Paraplast. Färbung der aufgezogenen entparaffinierten, ca. 5-7 μ dicken Schnitte in folgender Weise: Kernfärbung in Weigert-Eisenhämatoxylin 5 min. Abspülen, differenzieren in 0,5% HCl-Alkohol. 10 min wässern. Zwei min beizen in 1%iger wässriger Phosphormolybdänsäure. Rasch spülen in Aqua dest. Vier min färben in Chromotrop-Anilinblau. Rasch spülen in Aqua dest. und entwässern in 96%igem Alkohol (kurz), dann 100%igem Alkohol. Xylol. Einschließen in synthetisches Einschlußmittel.

Herstellung der Chromotrop-Anilinblau-Färbelösung

4 g Chromotrop 2 R; 1 g Anilinblau; 200 ml 0,2 n-HCl.

Anilinblau in der Salzsäure durch leichtes Erwärmen lösen, nach dem Abkühlen Chromotrop begeben. pH sollte zwischen 0,9-1,3 betragen.

Ergebnisse

Im Vergleich zur Hämatoxylin-Eosin-Färbung wird die Querstreifung normaler Herzmuskelfasern mittels der CAB-Färbung deutlicher sichtbar. Normale Herzmuskelfasern haben eine blaß-blaue bis blaß-violette Farbe. Besonders deutlich kommt mit dieser Färbemethode eine *vergrößerte Querstreifung* zur Darstellung, indem die nun rot angefärbten Querstreifen durch eine blaß-blaue helle Zone voneinander abgesetzt sind (Abb. 3). Hort [8] beobachtete im Tierexperiment bereits 15 min nach Unterbindung einer Kranzarterie eine Dehiszenz der Querstreifen. Er führte dies einerseits auf eine passive Überdehnung der Muskelfaser und andererseits auf das Ausbleiben der postmortalen Kontraktion der selben zurück. Allerdings fanden Berry et al. [1] 1980 keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Sarcomerenlänge zwischen normalen und ischämisch geschädigten Fasern, weshalb wir die Vergrößerung der Querstreifung nicht als sicheres Zeichen für eine Ischämie bzw. Hypoxie betrachten.

Anders verhält es sich mit den *Sarcoplasmaverklumpungen*, die auch als hyaline Querbänder oder Kontraktionsbänder bezeichnet werden und von Büchner [2] unseres Wissens erstmals 1934 beschrieben worden sind. Es scheint sich dabei um eine unspezifische, frühe Form der Muskelfaserschädigung zu handeln, deren Ursache sowohl eine Ischämie als auch ein direktes Trauma (Contusio cordis) sein kann. Am Rande von Herz durchschüssen und Herzstichen fanden wir, in Übereinstimmung mit Voigt [10] derartige Muskelfaserveränderungen. Im Gegensatz zu seinen Untersuchungen, die mittels der PTAH-Färbung durchgeführt wurden, konnten wir Sarcoplasmaverklumpungen zwar nicht bei Personen, die an einem plötzlichen Hirntod verstorben waren, wohl aber – dies ebenfalls im Gegensatz zu Voigt – bei Kohlenmonoxyd-Intoxikationen finden. Die Frage nach dem Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens der Sarcoplasmaverklumpungen bei akuter Coronarinsuffizienz bzw. Hypoxie ist nicht zuletzt deshalb schwierig zu beantworten, weil der Zeitpunkt des Auftretens der Hypoxie bzw. Ischämie in Relation zum Todeseintritt im realen Fall nicht bekannt ist. Im Zusammenhang mit frischen Nekrosen in den Papillarmuskeln bei Zustand nach genereller Hypoxie beobachteten wir einen Fall, bei dem eine Mofa-Lenkerin 2 h nach einem Unfall infolge schwerer Blutaspiration, kombiniert mit schwerer pulmonaler Fettembolie, verstorben war und Sarcoplasmaverklumpungen in den Papillarmuskelpitzen aufwies [11].

Die Sarcoplasmaverklumpungen sind in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung unter Verwendung starker Vergrößerungen durchaus sichtbar (Abb. 1). Mittels der CAB-Färbung lassen sie sich jedoch sehr deutlich darstellen und auch bei Übersichtsvergrößerung bereits lokalisieren. Die Verklumpungen erscheinen im Gegensatz zum intakten Sarcoplasma leuchtend-rot (Abb. 2). Um solche Befunde von Artefakten (s. u.) abgrenzen zu können, ist zu fordern, daß die roten hyalinen Bänder scharf begrenzt und mit einer segmentalen Verbreiterung der Muskelfaser vergesellschaftet sind. Büchner [2] sprach von einer „rosenkranzartigen Bildung“. Noch anschaulicher scheint uns der Vergleich mit einer japanischen Hängelampe zu sein, deren Papier- oder Stoffbespannung durch Ringe in gleichmäßigen Abständen ausgebuchtet wird. Zwischen den einzelnen hyalinen Bändern ist das Sarcoplasma blaß-blaue angefärbt und oft schollig zerfallen.

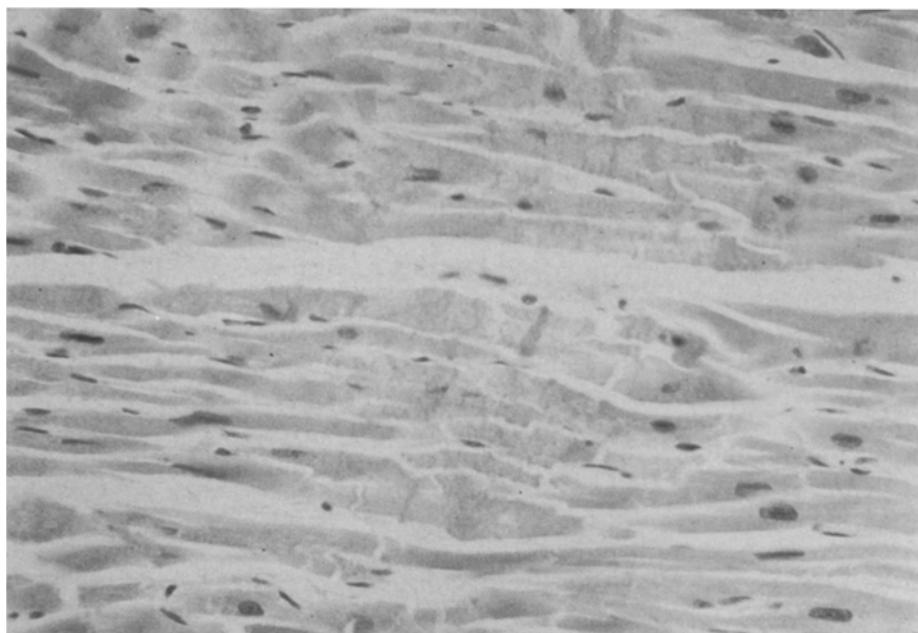


Abb. 1. SN 821/80, 66jähriger Mann. Herdförmig angeordnete, frische Herzmuskelfaserschädigungen bei obliterierender Coronarsklerose. Nur schwach erkennbare Sarcoplasmaverklumpungen. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (Vergrößerung 250fach)

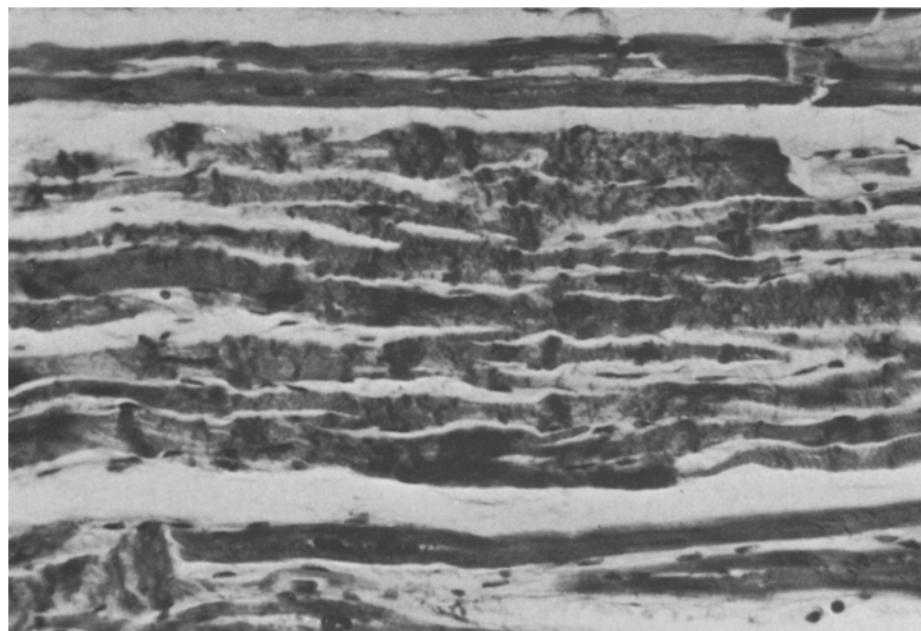


Abb. 2. Gleicher Fall wie Abb. 1. Deutlich hervortretende (im Präparat leuchtend rot angefärbte) Sarcoplasmaverklumpungen. Chromotrop-Anilinblau-Färbung (Vergrößerung 250fach)

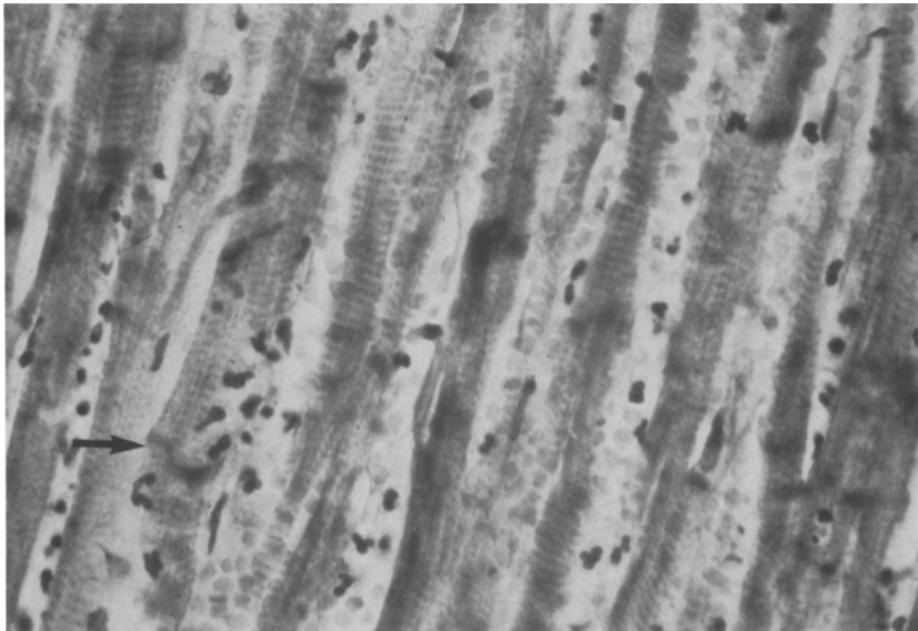


Abb. 3. SN 922/80, 85jähriger Mann. Frischer Myokardinfarkt bei schwer stenosierender Coronarsklerose. Diffuse leukozytäre Infiltration. Nur noch vereinzelte Sarcoplasmaverklumpungen (Pfeil). Deutlich vergrößerte Querstreifung. Chromotrop-Anilinblau-Färbung (Vergrößerung 400fach)

Mit dem Auftreten reaktiver Veränderungen verschwinden die Sarcoplasmaverklumpungen und damit auch die Metachromasie. In diesem Stadium der Nekrose sind geschädigte Areale in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung deutlicher zu erkennen, da die Fasern eosinophil aufleuchten und sich damit von den dunkel gefärbten Leukozyten abheben.

Ältere Nekroseherde, die oft von Granulationsgewebe umgeben sind, erscheinen im Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Präparat homogen-rot und im CAB-gefärbten Präparat dunkelblau (Abb. 4).

Bekanntlich bestehen gegenüber den sog. Infarktfärbungen, vor allem gegenüber der Fuchsin-Färbung nach Lie [4, 7] Vorbehalte wegen der zahlreichen *Artefakte*. In dieser Beziehung scheint uns die CAB-Färbung weniger launenhaft zu sein. Einzelne Artefakte kommen aber vor und sollten dem Betrachter bekannt sein. So findet man gelegentlich am Rande des Präparates eine fleckförmige, unscharf begrenzte Rotfärbung einzelner Fasern. In Nischen des Präparates können außerdem rote Farbkleckse bestehen bleiben, die ebenfalls zu einer Anfärbung benachbarter Muskelfasern führen können. Diese beiden Artefakte sind auf ein ungenügendes Spülen des Präparates zurückzuführen.

Gelegentlich haben wir diffus rot angefärbte Muskelfasern perivasculär beobachtet, was wir ebenfalls als Artefakt deuten. Generell kann gesagt werden, daß nur scharf begrenzte, quer zur Muskelfaser verlaufende Bänder, die oftmals mit einer Verbreiterung der Faser vergesellschaftet sind, als positive Befunde gewertet werden sollten. Um der Gefahr der Mißdeutung einer falsch-positiven

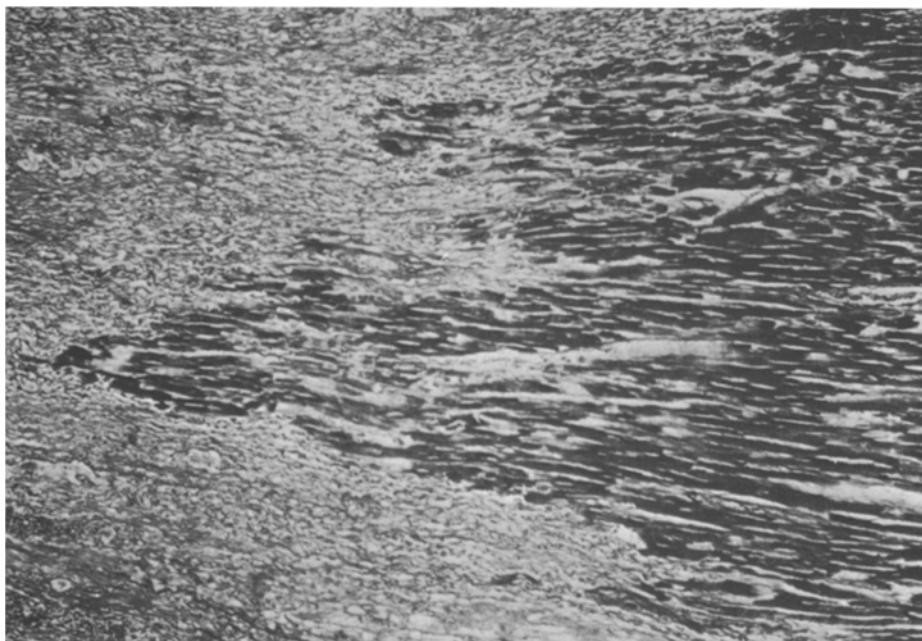


Abb. 4. SN 363/80, 68jähriger Mann. Alterer, in den Randpartien bereits organisierter Myokardinfarkt bei Coronarthrombose. Rechts dunkle (im Präparat tiefblaue), homogen angefärbte Nekrose. Chromotrop-Anilinblau-Färbung (Vergrößerung 40fach)

Metachromasie zu begegnen, fordern wir, daß auch in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung an entsprechender Stelle, wenn auch wesentlich schwerer zu erkennen, eine Sarcoplasmaverklumpung vorhanden sein muß. Schließlich ist noch darauf hinzuweisen, daß insbesondere in den subendocardialen Arealen die Disci intercalares oft rot angefärbt sind. Die Möglichkeit, daß solche Normalbefunde mit pathologischen verwechselt würden, ist kaum gegeben.

Eine fehlende Metachromasie von Sarcoplasmaverklumpungen, also falsch-negative Befunde, beobachteten wir bei zu langer Wässerung des Präparates, bei Verwendung einer alten Färbelösung oder bei alkalischer Formalinlösung. Es sollten daher die Färbelösung monatlich erneuert und das pH des Fixationsmedium, falls nicht gepuffertes Formalin verwendet wird, periodisch überprüft werden.

Während wir Autolyse-bedingte falsch-positive Befunde bisher nie beobachteten konnten, sind bei längerer postmortaler Liegezeit, bei der es zum Verlust der Querstreifung der Muskelfasern kommt, falsch-negative autolysebedingte Befunde nicht ausgeschlossen.

Die Chromotrop-Anilinblau-Färbung stellt eine einfache Methode zur Darstellung frischer Herzmuselfaserschädigungen dar. Im jetzigen Zeitpunkt, d. h. ohne systematische Überprüfung im Tierexperiment, betrachten wir diese Färbemethode lediglich als gutes Hilfsmittel zur besseren und vor allem schnelleren Erkennung von Muskelfaseralterationen, als dies mit den bisherigen routinemäßig durchgeführten Färbungen möglich war. Da sich hierbei Bindegewebsstrukturen vom Muskelgewebe durch leuchtend blaue Farbe deutlich ab-

heben, sind gleichzeitig allfällig vorhandene Narbenherde zudem gut zu erkennen.

Literatur

1. Berry CL, Van der Walt J, Wyse R (1981) Sarcomere relaxation and ischaemic myocardial injury. *Virchows Arch* 390:205-210
2. Büchner F, Lucadou W (1934) Elektrocardiographische Veränderungen und disseminierte Nekrosen des Herzmuskels bei experimenteller Coronarinsuffizienz. *Zieglers Beitr* 35:183-197
3. Doerr W (1981) Sekundenherztod. *Beitr Gerichtl Med* 39:1-25
4. Frick R (1980) Stenosierende Coronararteriensklerose und Färbung des Myokards nach Lie (Fuchsinorrhagie). 9. Tagung, Pathologen am Oberrhein, Chur, 26. 4. 1980
5. Holczabek W (1970) Über das histologische Bild der ischämischen Schädigung des Herzfleisches bei Anwendung der Weinsteinsäure-Kresylechtviolett-Einschlußfärbung. *Beitr Gerichtl Med* 27:275-283
6. Holczabek W (1973) Nachweis von Isoproterenol-bedingten Herzmuskelschäden an der Ratte mittels der Weinsteinsäure-Kresylechtviolett-Einschlußfärbung. *Beitr Gerichtl Med* 30:175-186
7. Lie JT (1968) Detection of early myocardial infarction by the acid fuchsin staining technic. *Am J Clin Pathol* 50:317-319
8. Hort W (1965) Ventrikeldilatation und Muskelfaserdehnung als früheste morphologische Befunde beim Herzinfarkt. *Virchows Arch [Pathol Anat]* 339:72-82
9. Musy JP, Haag JR (1977) Diagnostic de nécroses myocardiques au stade initial par des colorations simples. *Ann Anat Pathol* 22:97-116
10. Voigt GE (1967) Zur Diagnostik frischer Myokardläsionen. *Dtsch Z Gesamte Gerichtl Med* 59:113-118
11. Zollinger U, Sigrist T (1982) Zur Entstehung isolierter Nekrosen in den Papillarmuskeln des Herzens ohne Alterationen der Coronargefäße. *Schweiz Med Wochenschr* 112: 719-726

Eingegangen am 18. Oktober 1982