

# Über eine elektive Färbungsmethode des braunen und des melanotischen Pigmentes.

Von

Dr. Eugenio P. Lasnier,

Direktor des pathol. Univ.-Institut. Montevideo.

(Eingegangen am 17. Juni 1927.)

In dieser Mitteilung soll ein Verfahren veröffentlicht werden, welches das braune *Pigment der Organe*, besonders das des *Herzens* und das *melanotische Pigment*, besonders das der Geschwülste *elektiv färbt*. In der Bibliographie, die uns zur Verfügung steht, haben wir nichts ähnliches gefunden, daher glauben wir, daß es eine originelle Technik ist.

Wie wir schon erwähnten, färbt sich das *braune Pigment des Herzens* mit einer Methode elektiv, und wir müssen hinzufügen, daß wir zuerst bei diesem Pigment das Verfahren anwandten. Später haben wir es mit positivem Ergebnis beim braunen Pigment, das man in gewissen Fällen in der Niere und in der Leber findet, benutzt.

Das *melanotische Pigment*, speziell das der melanotischen Geschwülste, färbt sich sehr gut, besonders in den ersten Phasen seiner Entstehung, wenn es noch nicht die charakteristische tief schwarze Färbung darbietet. Diese elektive Färbung in den *Anfangsphasen* bietet das größte histologische Interesse. Wenn das melanotische Pigment schon seine tief schwarze Farbe erreicht hat, wie z. B. in den melanotischen Geschwülsten und in der normalen Haut, erhält man nicht so eine deutliche Färbung.

Ein anderes Pigment, welches zu färben wir erreicht haben, ist das *gelbbraune*, welches in den atrophischen oder in Rückbildung befindlichen Altersnervenzellen vorkommt, sowie in den weniger dunklen Körnern der normal pigmentierten Gegenden des Gehirns wie z. B. des *Locus niger* usw.

Es ist wahrscheinlich, daß noch andere Pigmente vorhanden sind, welche sich mit diesem Verfahren färben, aber aus Mangel an Material haben wir diese Frage nicht verfolgen können. Unter den Pigmenten, die sich nicht färben, müssen wir besonders die eisenhaltigen hämoglobinogenen Pigmente und die Gallenpigmente erwähnen. Wenn diese Pigmente zusammen mit Melanin oder dem braunen Pigment vorkommen, z. B. eisenhaltiges und Melanin in melanotischen Geschwülsten mit Blutungen, braunes und Gallenpigment in der Leber, können mit den gewöhnlichen Färbemethoden Irrtümer entstehen; zum wenig-

sten kann man Zweifel über die Natur des Pigmentes hegen. Dagegen sind sie mit der Methode, die wir empfehlen, sehr leicht zu unterscheiden. Speziell erlaubt die Methode das Pigment der braunen Atrophie sehr leicht von den feinen Tröpfchen der lipoiden Degeneration zu unterscheiden, wenn diese beiden Prozesse zusammen vorkommen, während sich die beiden Degenerationsformen mit der Methode von *Ciaccio* oder der Reduktion der Osmiumsäure nicht unterscheiden lassen. Das schwarze Malariapigment färbt sich auch nicht mit unserer Technik.

*Zusammenfassung:* Es wird eine Methode mitgeteilt, welche gewisse Pigmente elektiv färbt und mit großer Deutlichkeit und in Gegensatz mit der übrigen histologischen Struktur hervorhebt. Sie erlaubt gewisse Stoffe, welche mit den gewöhnlichen Methoden gleiche Bilder darbieten, leicht zu unterscheiden. Schließlich erlaubt diese Technik die gefärbten Stellen noch mehr hervorzuheben, sie noch sichtbarer zu machen, wenn man bei der Beleuchtung die gewöhnlichen Filter der Mikrophotographie, besonders die Filter aus Kupfersulfat und Schwefelsäure oder Kupfersulfat und Pikrinsäure, benutzt.

#### *Technik.*

*Fixierung:* Fast alle Fixierungsflüssigkeiten, die in der täglichen histologischen Praxis benutzt werden, haben uns gute Ergebnisse ergeben, sowohl bei frischfixierten Präparaten, als auch bei lange in Formol, Alkohol oder Glycerinlösungen konservierten Objekten. Von den gewöhnlichen Fixierungslösungen sind empfehlenswert: 10—15% Formol allein oder kombiniert mit Kaliumbichromat oder Pikrinsäure oder irgendeine dieser Mischungen mit oder ohne Sublimat. Die Fixierung nach *Ciaccio* (mit Ausschließung der Varianten der Osmiumsäure) gibt gute Resultate; wir haben keine guten Ergebnisse bei allen Präparaten, die in Osmiumsäure enthaltenden Mischungen fixiert worden sind, erzielen können.

*Schnitte:* Diese müssen sehr fein sein von 3—5  $\mu$ , man erzielt noch annehmbare Resultate mit 10  $\mu$ , sowohl bei Gefrierschnitten wie in Celloidin oder in Paraffin eingebetteten Schnitten; die Technik ist mit den letzten am leichtesten.

*Färbung:* Man präpariert die Farblösung folgendermaßen: Man mischt einen Teil Karbolfuchsin nach *Ziehl* mit 20—25 Teilen Brunnenwasser, um eine rubinrote, reine, durchsichtige und brillante Lösung zu erhalten. Dieses Verhältnis gilt für eine frische Ziehlösung. Wenn die Ziehlsche Lösung alt ist und Niederschläge enthält, kann man sie dennoch benutzen, indem man sie in weniger Wasser löst, z. B. einen Teil Farblösung in 10—15 Teilen Wasser. Man gießt das Wasser langsam ein und rührt stetig um.

1. Man färbt  $\frac{1}{2}$ — $1\frac{1}{2}$  Min., je nachdem es sich um Gefrier-, Celloidin- oder Paraffinschnitte handelt.

2. Im Wasser abspülen, bis der Überschuß des Farbstoffes ausgezogen ist, es genügen einige Sekunden, aber die Färbung wird durch längeres Abspülen nicht geschädigt.

3. *Starke* Färbung mit reduziertem Hämatoxylin (Hämatein). Wir benutzen systematisch die alte Formel *Bizzozeros*.

4. Die Schnitte einige Minuten in Wasser abspülen, das man ein paarmal wechselt. Das längere Verbleiben im Wasser schadet der Färbung nicht, im Gegenteil verbessert sie, indem es dem Hämatoxylin eine schöne blaue Nuance verleiht.

5. Die Differenzierung und die Entwässerung werden gleichzeitig gemacht. Dieses ist der delikate Augenblick der Technik. Es empfiehlt, sich die Differenzierung nicht unter dem Mikroskop vorzunehmen, denn die Entfärbung geschieht sehr schnell, und es würde sich alles während des Transportes der Schnitte zum Mikroskop entfärben. Es ist empfehlenswerter am Anfang ein halbes Dutzend Schnitte zu opfern, bis man *durch Probieren* eine gute Differenzierung erhält, je nach dem Aussehen der Schnitte mit bloßem Auge. Man entfernt das Wasser, indem man so gut wie möglich mit Fließpapier die Schnitte trocknet. Die Schnitte mit 95—97% Alkohol *überschwemmen*. Der Alkohol entfernt den Überschuß an Fuchsin, und sobald sich die rote Farbe nicht mehr in *sichtbarer Menge* entfernt (was man zwischen 4 und 6 Sek. beobachtet), und die violettblaue Farbe des Hämatoxylins erscheint, überschwemmt man die Schnitte mit Xylol. Den Überschuß an Xylol abtupfen und mit Xylol aufhellen und in Balsam einschließen.

Ergebnisse: Die Kerne erscheinen violett oder tief blau, das Protoplasma blau oder blaßviolett, die Pigmente lebhaft rot. Die Myofibrillen des Herzens, je nach dem Grad ihrer Differenzierung erscheinen in rötlichvioletter bis lilavioletter Farbe; das Sarkoplasma lila oder sehr blaßviolett, fast ungefärbt; die Pigmentkörner kräftig lebhaft rot, die roten Blutkörperchen erhalten oft eine rosa Tönung, aber in den gut differenzierten Präparaten erscheinen sie in grünlichlila-Farbe.

Diese Methode erlaubt einige Varianten in der Grundfärbung: um einen größeren Kontrast zu erhalten, ist es möglich, mit einem anderen sauren Farbstoff zu färben, z. B. Lichtgrün; aber die kombinierte Färbung mit Hämatoxylin und Pikroindigocarmin nach *Cajal* ist unzweifelhaft eine der interessantesten und anschaulichsten Methoden. Mit dieser Farblösung sollte man Eisenhämatoxylin benutzen, aber mit diesem Hämatoxylin ist es nicht leicht, eine gute lebhaft rote Färbung des braunen Pigmentes zu erhalten. Darum benutzen wir mit Vorliebe das Hämatoxylin nach *Bizzozero*, aber wir glauben, daß alle anderen ähnlichen Formeln gleiche Resultate geben. Ein

Nachteil ist, daß die Präparate sich mit der Zeit vollständig entfärben.

Will man das Pikroindigocarmin *Cajals* gebrauchen, färbt man wie folgt:

1. Starke Färbung mit Hämatoxylin,
2. Abspülen im Wasser,
3. Färbung mit verdünntem Fuchsin wie mit der vorherigen Methode,
4. Abspülen im Wasser,
5. Färbung mit Pikroindigocarmin während 1—3 Min.,
6. rasches Abspülen im Wasser (ein paar Sekunden),
7. Gleichzeitige Entwässerung und Differenzierung wie in der ersten Methode. Bei dieser Methode ist die Differenzierung vollendet, wenn die Schnitte einen mehr oder weniger orange-gelben Ton erhalten. Die Ergebnisse dieser Modifikation sind ausgezeichnet, denn nur die Pigmentkörner behalten die rote Färbung, das Protoplasma ist gelb oder leicht orange. Das Bindegewebe grün, die roten Blutkörperchen gelb und die Kerne violettbraun.

Wenn es sich um *Celloidinschnitte* handelt, ist es nötig, gewisse Vorsicht bei der Differenzierung und Entwässerung zu beobachten.:

Man muß ein paar kleine Gefäße mit 95—97% Alkohol zur Verfügung haben. Die Schnitte kommen einzeln aus dem Wasser in das erste Gefäß, in diesem werden sie mit Nadeln hin und herbewegt. Wenn sich der rote Farbstoff löst, was plötzlich eintritt, wird der Schnitt sofort während ein paar Sekunden in das zweite Gefäß mit Alkohol und gleich in reines Xylol gebracht. Mit dem Karbolxylol erhält man gute Präparate, aber es hat den Nachteil, daß die Körner sich etwas entfärben. Darum ziehen wir nach dem Alkohol das reine Xylol vor, trotzdem seine Benutzung ein wenig umständlicher ist, denn es hat den Vorteil, den Körnern die lebhaftere rote Farbe zu lassen. In Balsam einschließen.

In gewissen Fällen ist es zweckmäßig, die Schnitte in Glycerin-Gelatine einzuschließen, dazu bringt man nach der Differenzierung die Schnitte von neuem ins Wasser.

---