

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Marburg a. d. Lahn
(Direktor: Prof. Dr. J. LINZBACH)

Über den Nachweis von Fettstoffen im Gewebe mit Nilblausulfat

Von
Fr. PRINZ

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 31. Mai 1958)

Nilblausulfat wurde in den letzten Jahrzehnten als Fettfarbstoff kaum angewendet. Während schon LORRAIN SMITH vorschreibt, daß vor dem Färbegebrauch eine gesättigte wäßrige Nilblausulfat-Lösung mit 0,5%iger Schwefelsäure für 1—2 Std am Rückflußkühler zu kochen ist, wird diese Vorschrift in unserem Schrifttum über histologische Untersuchungsmethoden nicht erwähnt. Durch den Kochprozeß entsteht in der blauen Farblösung ein Oxazon-Derivat, welches rot und stark fettlöslich ist. Dieser rote Farbstoff färbt, wie Untersuchungen von LENNERT und WEITZEL zeigen, die veresterten flüssigen und weichen Fette rosarot, während das wasserlösliche Salz des Nilblau neben anderen Stoffen die flüssigen Fettsäuren blau färbt. LISON erbrachte den Nachweis, daß ein Nilblau des Handels bereits mehr oder weniger reichlich präformiertes Oxazon enthält. Daher kann auch schon eine nicht durch Kochen vorbehandelte Farblösung Fetttropfen rosarot färben. Im übrigen läßt sich, wie wir bestätigen können, im Chlorid des Nilblau schwerer als im Sulfat durch den Kochprozeß eine Anreicherung mit rotem Oxazon erzielen.

Eigene Untersuchungen zeigen, daß eine Fettfärbung mit Nilblausulfat weitgehend abhängig ist von dem Gehalt der Farblösung an rotem Oxazon. Wird eine frisch angesetzte, nicht gekochte Nilblausulfat-Lösung zur Fettfärbung verwandt, dann färben sich die Fetttropfen nur schwach rosa. Nilblausulfat so angewandt, stellt ein schwaches Fettdiachrom dar. Kocht man dagegen vor dem Gebrauch die Farblösung, dann färben sich die Fetttropfen kräftig rosarot. Durch diese Kochvorbehandlung wird der Farbstoff zu einem guten *Diachrom*. Daher halten wir es für angebracht, daß auch in unseren Methodenbüchern diese Kochvorschrift aufgenommen wird.

Bekannt ist, daß länger in Formalin fixiertes Gewebe bei der Färbung mit Nilblausulfat keine rosarote, sondern eine violette oder gar blaue Färbung seiner Fetttropfen ergibt. Nach BOEMINGHAUS wird diese Erscheinung auf Einwirkung der im alten Formalin sich bildenden Ameisensäure zurückgeführt, die das Neutralfett in Glycerin und Fettsäuren spalten soll. Nun haben wir entsprechendes Gewebe bei Zimmer-

temperatur und im Brutschrank (37°) in saurem Formalin, in mit Magnesium carbonicum alkalisch gehaltenem Formalin sowie in Formalin freier Kaliumbichromatlösung fixiert und laufend histologisch untersucht. Als Kontrolle diente unfixiertes Gewebe, welches über die gleiche Zeit bei Zimmertemperatur gehalten wurde. Unsere Untersuchungen zeigen, daß sowohl in saurem wie in alkalischem Formalin als auch in der Formalin freien Fixierungsflüssigkeit wie im Frischgewebe ein Farbumschlag der Fetttropfen und Fettzellen von rosarot über violett nach blau überall sich vollzog und schon nach 1—2 Wochen einsetzte. Das in alkalischem Formalin fixierte Material machte durchaus keine Ausnahme. Jedoch ließ sich hier eine Verzögerung des Farbumschlages gegenüber dem sauren Formalin feststellen. Während im sauren Formalin der Farbumschlag bald einsetzte und nach 4—5 Wochen bereits weitgehend beendet war, zeigte das in alkalischem Formalin fixierte Gewebe nach etwa 8 Wochen neben violetten und blau gefärbten Fetttropfen noch rosarote Tropfen. Mit Sudan-Färbung durchgeführte Kontrollen zeigten weder bei der Fixierungsart noch der Fixierungsduer erkennbare Unterschiede. Ein solcher Farbumschlag kann auch sofort durch einen Kunstgriff an Gewebeschnitten erzielt werden, wenn der Schnitt vor der Färbung mit Nilblausulfat 2—3 Std einer Lipaselösung ausgesetzt wird. Nach der Färbung sind histologisch dann unterschiedlich von rosarot nach violett und blau gefärbte Fetttropfen zu erkennen. Aus unseren Untersuchungen geht hervor, daß ein Farbumschlag von Fetttropfen in länger fixierten Geweben bei der Färbung mit Nilblausulfat nicht nur in Formalin haltigen, sondern auch in Formalin freien Fixierungsflüssigkeiten, ja selbst in unfixierten Geweben eintritt. Wir möchten daher die Erscheinung des Farbumschlages nicht, wie bisher angenommen wurde, nur auf die in altem Formalin sich bildende Ameisensäure allein, sondern ganz allgemein auf den natürlichen, nach dem Tode eintretenden Zersetzungsprozess der veresterten Fette zurückführen, der im sauren Milieu schneller als im alkalischen sich vollzieht. Das während des Lebens vom Organismus aufgebauten Fett zerfällt nach dem Tode wieder in seine einzelnen Komponenten. Daher ist eine Fettfärbung mit Nilblausulfat nur dann sinnvoll, wenn sie an Frisch- oder nur kurz fixiertem Gewebe ausgeführt wird, weil sonst die bald nach dem Tode einsetzenden Fettabbauveränderungen störend wirken. Weitgehend bis zu den wasserlöslichen Komponenten abgebauten Fettstoffe sind im lebenden Gewebe unter normalen Verhältnissen morphologisch kaum je nachweisbar. Anders dagegen bei krankhaften Veränderungen, wie die Fettnekroseherde einer akuten Pankreasnekrose zeigen. Hier lassen sich bei Färbung mit Nilblausulfat in einem Blickfeld die verschiedensten Abbaustufen mit lila, violetten oder gar blauen Farbtönen feststellen.

Auf eine weitere, in der Botanik erst seit 1952 durch die Untersuchungen von DRAWERT an Pflanzenmikrosomen bekannte Eigenschaft des Nilblausulfat möchten wir hier aufmerksam machen, die bei uns bisher weitgehend unbeachtet blieb. Das Nilblausulfat richtig angewandt, ist nicht nur, wie unsere Untersuchungen zeigen, ein brauchbares Diachrom, sondern auch ein ebenso ausgezeichnetes *Fett-Fluorochrom*. Die fluoreszierende Eigenschaft hängt wiederum weitgehend von dem Gehalt der Farblösung an rotem Oxazon ab. Fettropfen, die mit Nil-

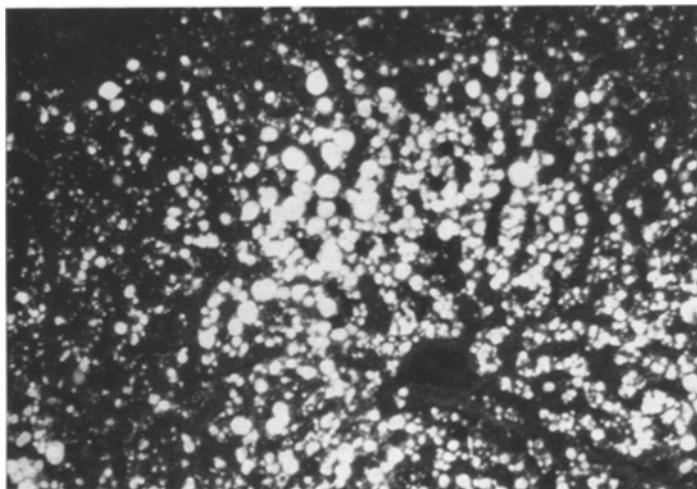


Abb. 1. Mit Nilblausulfat gefärbte Fettleber im UV-Licht. Kräftige goldgelbe Fluorescenz der Fettropfen (im Bilde weiß)

blausulfat sich rosarot färben, zeigen im UV-Licht eine kräftige, leuchtend goldgelbe Fluorescenz. Selbst kleinste Tröpfchen fluoreszieren intensiv (Abb. 1). Auch hier lässt sich ein deutlicher Unterschied zwischen einer kalt angesetzten und einer vorher gekochten Farblösung feststellen. Der Fluoreszenzfarbton ist bei Anwendung einer frisch angesetzten Farblösung deutlich blasser. Der im Hellfeldmikroskop so charakteristische Farbumschlag des sich zersetzen Fettes lässt sich auch bei der Fluorescenz im UV-Licht feststellen. In Abbau begriffene Fettropfen, die im Hellfeldbild violett oder blau erscheinen, zeigen im UV-Licht eine verdämmernde Fluorescenz. Weitgehend abgebaute, tief blau gefärbte Fettropfen fluoreszieren nicht mehr. Die hervorragende Fluoresceneigenschaft des roten Oxazons lässt sich nutzbringend im Routinebetrieb des Sektionssaales verwenden. So kann beispielsweise eine Lungenfettembolie schnell im Fluorescenzmikroskop an Lungenzupfpräparaten bei Zusatz eines Tropfens Nilblausulfat sofort und sicher nachgewiesen werden.

Zusammenfassung

Nilblausulfat ist ein ausgezeichneter Fettfarbstoff, wenn die schon von LORRAIN SMITH empfohlene Färbevorschrift beachtet wird. Der Farbton des Fettes hängt von dem in der blauen Farblösung vorhandenen roten Oxazon-Farbstoff ab, der durch Kochen angereichert werden muß. Das Oxazon-Derivat ist ein gutes Diachrom und ebenso ausgezeichnetes Fluorochrom für flüssige und weiche veresterte Fettstoffe. Ein Farbumschlag der Fetttropfen in länger Formalin fixierten Geweben bei Färbung mit Nilblausulfat von rosarot nach blau beruht nicht allein auf Einwirkung der im alten Formalin sich bildenden Ameisensäure, sondern auf einem natürlichen Zersetzungssprozeß der veresterten Fette, der nach dem Tode einsetzt und im sauren Milieu schneller als im alkalischen abläuft.

Summary

Nile Blue sulphate is an excellent dye for fats if used according to LORRAIN SMITH. The color of the fat depends from the red oxazone present in the blue dye solution, which must be enriched by boiling. The oxazone derivative is also a fluorochrome for liquid and soft esterified fatty substances. A color change from pink to blue is observed in fat droplets which have been fixed for a longer time in formalin; this change is not only caused by the formic acid formation in old formalin, but also by the natural decomposition of fat beginning after death and proceeding more rapidly in acid milieu than in alkaline.

Literatur

- BOEMINGHAUS, H.: Über den Wert der Nilblaumethode für die Darstellung der Fettsubstanzen. Beitr. path. Anat. **67**, 533 (1920). — DRAWERT, H.: Vitale Fluorochromierung der Mikrosomen mit Nilblausulfat. Ber. dtsch. bot. Ges. **65**, 263 (1952). — LENNERT, K., u. G. WEITZEL: Zur Spezifität der histologischen Fettfärbungsmethoden. Z. wiss. Mikr. **61**, 20 (1952/53). — LISON, L.: Histo chimie et Cytochimie Animales. Paris: Gauthier-Villars 1936. — SMITH, J. L.: On the simultaneous staining of neutral fat and fatty acid by oxazine dyes. J. Path. Bact. **12**, 1 (1908).

Doz. Dr. F. PRINZ, Pathologisches Institut der Universität Marburg a. d. Lahn
Robert-Koch-Straße 5