

(Aus dem Anatomischen Laboratorium [Vorstand Prof. Dr. *H. Spatz*] der Psychiatrischen und Nervenklinik in München [Direktor: Geh. Rat Prof. Dr. *O. Bumke*.])

Eine Methode zur Silberimprägnierung des Gliomgewebes.

Von
L. Jaburek.

Mit 4 Textabbildungen.

(*Eingegangen am 31. Januar 1934.*)

Die Durchführung einer Einteilung von Gliomen nach *Bailey* und *Cushing* stellt an die Laboratoriumstechnik nicht unbedeutende Forderungen. Es müssen, um die verschiedenen morphologischen Eigenheiten des Tumorgewebes voll zu erfassen zahlreiche Methoden angewendet werden, von denen die Silber- bzw. Goldimprägnierungsmethoden der Glia die wichtigsten und zugleich auch die schwierigsten sind. Es sei hier erwähnt, daß die genannten amerikanischen Autoren an ihrem viele Hunderte von Tumoren umfassenden Material 24 verschiedene Färbe- und Imprägnierungsmethoden systematisch zur Anwendung brachten. Diese besitzen nun zwei große Nachteile: Erstens sie gelingen nicht, oder doch nur sehr schwer an einem Material, das schon mehrere Wochen in Formalin gelegen war und zweitens erfordern sie sämtlich Gefrierschnitte, deren Herstellung aus dem zum größten Teil bröckeligen und lockeren Tumorgewebe, wenn überhaupt möglich, nur mit großem Mühe- und Zeitaufwand zu erreichen ist. Dazu kommt es in der Regel vor, daß auch dickere Schnitte bei der weiteren Behandlung (Überführung mittels Glasstäbchen durch viele Schalen) zerfallen, wodurch es zum Verlust des manchmal kostbaren Materials kommt. Schließlich sind Gefrierschnitte zu exakten Untersuchungen oft ungeeignet; besonders sind die Zusammenhänge der verschiedenen Gewebspartien damit kaum erforschbar.

Diese Nachteile bringen es mit sich, daß nur Laboratorien mit gut geschultem Hilfspersonal an die Untersuchung von Gliomen nach *Bailey* und *Cushing* herantreten können. Auch dann bleibt aber das seit Jahren in Formalin liegende Material verloren. Wenn auch schon die Methoden von *Globus*, *Penfield*, *Kanzler* und anderen Autoren älteres Formalinmaterial durch Anwendung von Ammoniak zu retten vermögen, so haftet ihnen allen doch der Nachteil an, daß sie wiederum Gefrierschnitte erfordern und, daß sie bloß gewisse Gliaelemente zur Darstellung bringen; von einer idealen Methode zur Gliomuntersuchung wäre dagegen zu verlangen, daß sie an Paraffinschnitten gelingt und überdies nicht nur die ektodermale Glia umfassend imprägniert, sondern auch ihre einzelnen

Entwicklungstypen klar zur Darstellung bringt, auf denen doch die Gliomeinteilung beruht.

Vor kurzem (1930) wurde von *Weil* und *Davenport* eine Methode zur Silberimprägnierung von Gliomen angegeben, die alle vorhin erwähnten Übelstände zu beseitigen scheint. Die Imprägnierung wird dabei auf bereits aufgezogenen Paraffinschnitten ausgeführt. Die Methode ist, wie die Autoren hervorheben, nicht in dem Sinne selektiv, daß es mit ihrer Hilfe gelingen würde einzelne Gliaelemente gesondert herauszubringen. „Sie imprägniert ganz allgemein die verschiedensten Zellen der verschiedenen Gliome und ihre Fortsätze“.

Als wir uns an die Bearbeitung des Gliommaterials der Klinik nach *Bailey* und *Cushing* anschickten, wußten wir von der Methode noch nichts. Wir gingen unsere eigenen Wege und die kleinen Erfolge, die wir beim fortwährenden Modifizieren der gebräuchlichen Methoden zu verzeichnen hatten, ermunterten uns zum weiteren Experimentieren. Schließlich glaubten wir unser Ziel erreicht zu haben. Wir erhielten regelmäßig gute Imprägnierungsbilder bei Material, welches bis zu 14 Jahren (!) in Formalin gelegen war — über älteres Material verfügten wir nicht — und welches, da es in Paraffin eingebettet wurde, mühelos zu dünnsten Schnitten verarbeitet werden konnte. Die letzteren waren nachträglich einer Gegenfärbung mit Eosin, Erythrosin, Lichtgrün und anderem zugänglich, wodurch die erhaltenen Bilder an Schärfe und Klarheit oft noch gewannen.

Es sei vorweg gesagt, daß bei dieser Methode etwas grundsätzlich Neues nicht zur Anwendung kommt, wie den überhaupt die gebräuchlichen Gliaimprägnierungsmethoden mit Ausnahme einiger weniger, wie z. B. der *Cajalschen* Goldsublimatmethode, nur Varianten des *Bielschowskyschen* Verfahrens sind, das wiederum in weiterer Linie auf einer Idee von *Fajersztajn* fußt.

Das Prinzipielle unserer Modifikation beruht auf der Anwendung von höherer Temperatur, welche die Reaktion beschleunigt und verstärkt und auf der Durchführung einer Imprägnierung im Block, die der *Bielschowskyschen* Blockimprägnierung der Neurofibrillen nachgeahmt ist, mit nachfolgender Paraffineinbettung und Vergoldung sowie Gegenfärbung am Schnitt. Die Methode selbst kann, wo es die Beschaffenheit des untersuchten Materials gestattet, natürlich auch an Gefrierschnitten ausgeführt werden. Ähnlich wie in dem Verfahren von *Weil* und *Davenport* werden nicht einzelne Gliaelemente elektiv dargestellt, sondern ganz allgemein die verschiedensten Gliomzellen und ihre Fortsätze. Dies bedeutet natürlich bei einer Gliomuntersuchung einen großen Gewinn, da dadurch andere Methoden zum großen Teil entbehrlich werden.

Die Methode.

A. Blockimprägnierung.

1. Bis 1,5 mm dicke Scheiben des beliebig lang formolfixierten Materials kommen in eine gut verschließbare Schale mit der *Hortegaschen* Fixierungsflüssigkeit:

Bromammonii	10,0
Formoli	70,0
Aqua dest.	430,0

und werden darin bei 55—60° C 30 Min. lang erwärmt.

2. Das Bromammoniumformol wird abgegossen, das Material in:

Liquor ammonii caust.
Aqua bidest. aa.

gebracht und wie bei 1 30 Min. lang erwärmt. Es ist ratsam, die Erwärmung zunächst über einer Spiritusflamme vorzunehmen und im Brutofen fortzusetzen.

3. Nach Abgießen des Ammoniaks kommen die Scheiben in eine 10—15%ige Lösung der konzentrierten Bromwasserstoffsäure und werden wie bei 1 und 2 erwärmt.

4. Abgießen der Bromwasserstoffsäure und Abspülen des Materials in doppelt destilliertem Wasser. Die Schale wird zu diesem Zwecke zweimal mit dem Wasser aufgefüllt und nach kurzem Schütteln, um Säurereste auch vom Glasdeckel fortzuwaschen, wieder entleert.

5. Die Scheiben werden nun in die *Hortegasche* Silbercarbonatlösung gebracht:

10% Argentum nitr.	5,0
5% Natrii carb.	20,0

Liquor ammonii caust. in Tropfen,

soviel, bis sich der gelbe Niederschlag bis auf einige Körnchen löst. Erwärmen wie bei 1, 2 und 3. Die Materialblöcke werden in der ammoniakalischen Silberlösung zunächst gelb, dann graubraun, schließlich schwärzlich. Oft verfärbt sich auch die Lösung bräunlich. Es ist ratsam, dieselbe nach 15 Min. durch eine frische zu ersetzen. Man bereite sich also im Voraus die entsprechende Menge. Der Glasdeckel muß gut schließen, damit beim Erwärmen über der Flamme und im Brutofen kein Ammoniak entweicht.

6. Ganz kurzes Abspülen im doppelt destillierten Wasser.

7. Reduktion in

Formoli neutr.	1,0
Aqua dest.	9,0

in der Schale. Die Reduktion dauert etwa 20—30 Min. Auch hier soll das Formol in der Zwischenzeit einmal gewechselt werden.

8. Waschen in fließendem Wasser etwa 1 Stunde lang.

9. Steigende Alkoholreihe, Intermedien, Paraffin.

Die ganze Entwässerungs- und Einbettungsprozedur nach Tunlichkeit kurz, sie soll in etwa 5—6 Stunden beendet sein.

10. Paraffinschnitte mit dem Optimum zwischen 5 und 10 μ werden auf Objektträger aufgezogen und nach Auflösung des Paraffins in

1% sol. Auri chlor.	0,5
Aqua dest.	4,0

vergoldet. Die braunen Schnitte färben sich dabei graugelb. Der Prozeß ist in einigen Minuten beendet.

11. 5% Fixiernatron 30 Sek.

12. Fließendes Wasser 1 Stunde.

13. Abspülen in destilliertes Wasser.

14. Gegenfärbung (nicht unbedingt erforderlich) mit Eosin, Lichtgrün, Erythrosin o. dgl.

14. Gegenfärbung.

15. Steigende Alkoholreihe, Xylol, Balsam.

Die angegebene Einwirkungszeit der einzelnen Reagenzien bezieht sich auf ein Material von mitteldichter Konsistenz.

Es ist ratsam, mit der Blockimprägnierung in den Vormittagsstunden zu beginnen. Bei einiger Übung ist man dann mit der Imprägnierung und Reduktion nach

3 Stunden fertig, so daß das Material in der Mittagspause unter fließendes Wasser gestellt werden kann. Nachmittags wird entwässert, am Abend eingebettet.

B. Gefrierschnitte.

1. 10—20 dicke Gefrierschnitte von altem Formalinmaterial kommen in eine Schale der *Hortegaschen* Fixierungsflüssigkeit wie bei der Blockimprägnierung und werden bei 55—60° C etwa 10 Min. lang erwärmt.

2. Die Schnitte werden mittels Glasstäbchen in eine Mischung von

Liquor ammonii caust. 5,0

Aqua bidest. 15,0

übertragen und wiederum wie bei 1 über einer Spiritusflamme oder im Brutofen erwärmt.

3. Direktes Übertragen in eine 10%ige Lösung der konzentrierten Bromwasserstoffsäure und erwärmen, wie bei 1 und 2.

4. Ganz rasches Durchziehen durch doppelt destilliertes Wasser und

5. Einlegen in die *Hortegasche* Silbercarbonatlösung wie bei der Blockimprägnierung (gut verschlossene Schale!) und erwärmen über einer Spiritusflamme oder im Thermostat bis sich die Schnitte tabakbraun färben, was in etwa 10 Min. eintritt. Nachher sofort in

6. Neutrales Formalin wie bei der Blockimprägnierung. Die Reduktion geht rasch vor sich, man läßt die Schnitte allenfalls einige Minuten in der Lösung. Es ist wie bei der Originalmethode *Hortegas* vorteilhaft über die in einer größeren Petrischale befindliche Flüssigkeit zu blasen, damit die Schnitte in schnelle Bewegung kommen.

7. Die Schnitte kommen in destilliertes Wasser; nach der Originalmethode *Hortegas* wird eine 1stündige Wässerung bei 3maligem Wasserwechsel verlangt. Die Wässerungszeit kann bis auf wenige Minuten reduziert werden, wenn man dem Wasser eine kleine Menge von Liquor ammonii caust. zusetzt.

8. Übertragen der Schnitte in die Goldchloridlösung wie bei der Blockimprägnierung, wo sie ihre braune Färbung verlieren und nach 10—15 Min. dunkelgrau werden.

9. Fixiernatron 30 Sek.

10. Destilliertes Wasser mehrfach gewechselt etwa 1 Stunde. Auch hier kann die Wässerungszeit wesentlich (bis auf einige Minuten) verkürzt werden, wenn man dem Wasser einige Tropfen Jodtinktur zusetzt. Da durch das Fixiernatron das freie Jod in ein Natriumsalz (Natriumtetrathionat) übergeführt wird, so erschöpft sich langsam die Lösung und hellt sich auf.

11. Durchziehen durch 70 und 96% Alkohol, Carbol-Xylol, Xylol, Balsam.

Das Material.

Die Methode wurde an 40 Gliomen der hiesigen Klinik, die in den Jahren 1917—31 zur Sektion kamen und in Formalin aufbewahrt wurden, erprobt. Aus unserem Material wollen wir nachfolgende Fälle anführen, um die Leistungsfähigkeit der Methode zu demonstrieren.

Fall 1. 2324. Sektion am 9. 6. 25, 5 Stunden post mortem. Das Material ist also 6 Jahre alt. Ein sehr kleinzelliges Gliom, noch nicht klassifiziert. Das Mikrophotogramm dieses Falles, das aus einer Stelle außerhalb des Tumors herrührt, zeigt die Makro- und Oligodendroglia bei 275facher Vergrößerung (Abb. 1). Die Makroglia ist intensiv imprägniert, die Zellen treten mit allen ihren Ausläufern sehr scharf hervor. Die feinsten Verzweigungen bilden ein gut sichtbares *Heldsches* Grundnetz. In den Zelleibern sind die Kerne gut dargestellt, was die Mikrophotogramme nur mangelhaft wiedergeben. Auch über dem ungeheuren Reichtum an

Plasmafortsätzen gibt die Abbildung nicht genügend Aufschluß. Gefäße und rote Blutkörperchen imprägnieren sich natürlich, wie bei allen Silbermethoden, mit. Von der Oligodendro- und Hertegaglia sind bloß die Zellkerne dargestellt.

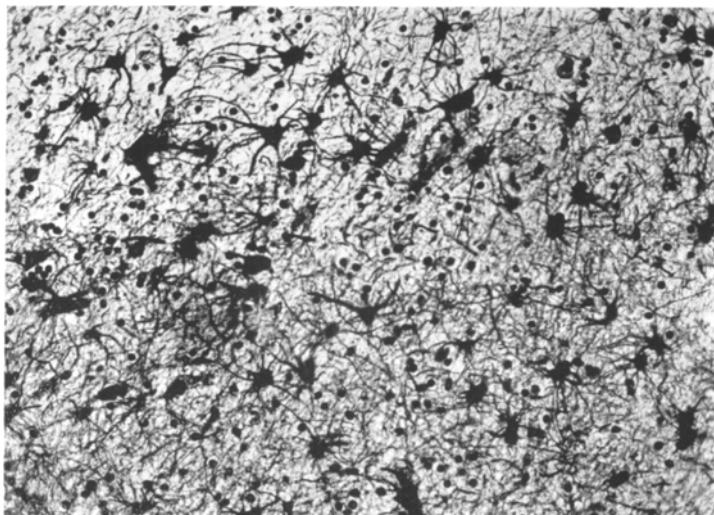


Abb. 1.

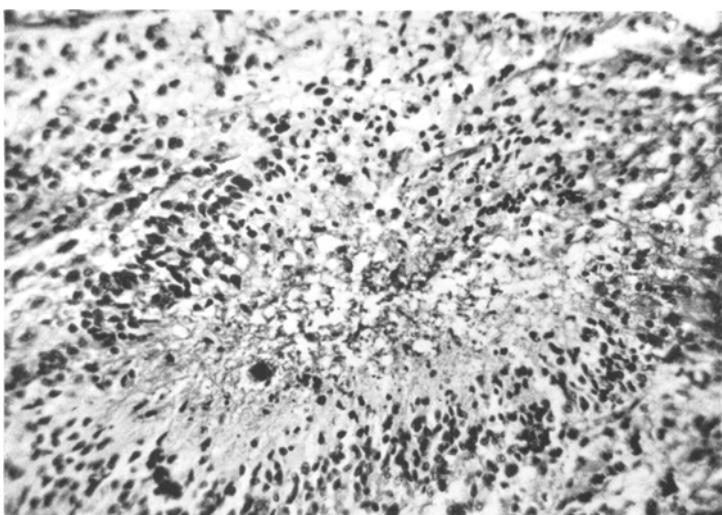


Abb. 2.

Präparate: Blockimprägnierung, Paraffin, $10\text{ }\mu$ ohne Gegenfärbung.

Fall 2, 1351. Sektion am 18. 2. 17. Das Material ist also 14 Jahre alt. Glioblastoma multiforme. Abb. 2 zeigt eine für dieses Gliom charakteristische Stelle

bei 275facher Vergrößerung. Das nekrotisierende Gewebe wird von palisadenartig angeordneten Zellen umgeben. (Pseudorosette.)

Präparate: Blockimprägnierung, Paraffin, 10 μ , Gegenfärbung mit Erythrosin.

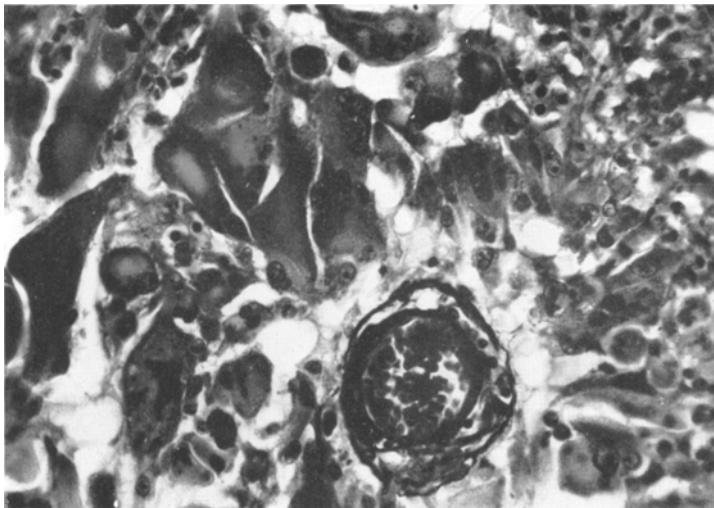


Abb. 3.

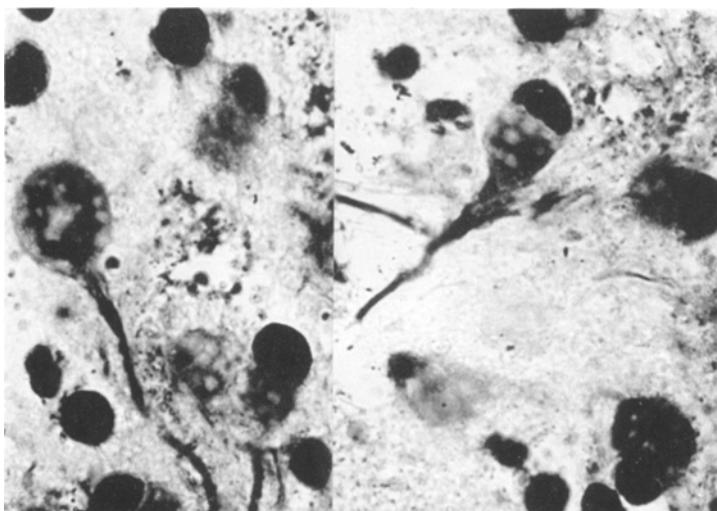


Abb. 4.

Fall 3, 1529. Sektion am 9. 12. 19, 14 Stunden post mortem. Das Material ist also 11 Jahre alt. Ein gemischtzelliges Gliom, in welchem neben kleinen Elementen auch Riesenzellen von ungewöhnlich großen Dimensionen angetroffen werden; die letzteren sind ein- und vielkernig. Das Gliom ist noch nicht klassifiziert. Auf

Abb. 3 sind die beiden erwähnten Zellarten bei 550facher Vergrößerung zu sehen. Daneben ein quergetroffenes Gefäß, dessen Bindegewebsfasern sehr scharf imprägniert sind.

Präparate: Blockimprägnierung, Paraffin, 10 mm, Gegenfärbung mit Erythrosin.

Fall 4, 2153. Sektion am 5. 8. 24, 5 Stunden post mortem. Das Material ist also 7 Jahre alt. Ein Gliom vom Typus des Astroblastoma, dessen Zellen aber reichen Polymorphismus aufweisen. In Abb. 4 (Vergrößerung 1000fach) sind einige Zellen vom Typus der unipolaren Spongioplasten zu sehen. Die Kerne sitzen den Zellen gewöhnlich kappenartig auf. In den Fortsätzen werden Fibrillen wahrgenommen, die sich im Zelleib aufbündeln und dort in ein korbartiges Geflecht übergehen.

Präparate: Blockimprägnierung, Paraffin, 8 μ , ohne Gegenfärbung.

Literaturverzeichnis.

Fajerzstajn (-Krzemicki): Neur. Zbl. 3 (1901). — *Weil, A. u. H. A. Davenport:* Z. Neur. 126 (1930).