

- Linck, Zur Kenntnis der ependym. Gliome des IV. Ventrikels. Zieglers Beiträge 1903, XXXII.
3. Stroebe, Über Entstehung u. Bau d. Hirngliome. Zieglers Beitr. XVIII. Saxer, Ependymepithel, Gliome usw. Zieglers Beitr. 1902. Buchholz, Beitr. z. Kenntnis d. Hirngliome. Archiv f. Psychiatrie XXII. Henneberg, Beitr. z. Kenntnis der Gliome. Archiv f. Psychiatrie XXX, 1899.
 4. Virchow, Die krankhaften Geschwülste, II.
 5. Prantois et Etienne, Sarcome primitif des ventricules du cerveau. Arch. d. Neurologie, 1884, Nr. 86.
 6. Pfeiffer, Ein Fall von ausgebreitetem ependymären Gliom der Gehirnhöhlen. Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde, 1894.
 7. Cimal, Die Geschwülste des IV. Ventrikels. Dieses Archiv 166, 1901. Bruns, Die Geschwülste des Nervensystems. Berlin 1897. Bielschowsky, Multiple ependymäre Gliome des IV. Ventrikels. Deutsche Zeitschr. f. Nervenheilkunde, XXII, 1902. Hunziker, Ventrikeltumoren. Deutsche Zeitschr. f. Nervenheilk., 1905.
 8. Ribbert, Geschwulstlehre, 1904.
 9. Weigert, Beiträge zur Kenntnis der normalen menschlichen Neuroglia.
 10. Bonome, Bau und Histiogenese des pathol. Neurogliagewebes. Dieses Archiv 163, 1901.
 11. Muthmann u. Sauerbeck, Über eine Gliageschwulst des IV. Ventrikels. Zieglers Beiträge 34, 1903.
 12. Ceni, Eine gliomatöse Infiltration beider Großhirnhemisphären. Arch. f. Psychiatrie, XXXI, 1898.
 13. Mosler, Zur Kasuistik der Hirntumoren. Mit Zusatz von Virchow. Dieses Archiv 43, 1868.

XVI.

Kleine Mitteilung.

Eine neue und leicht auszuführende dreifache Färbung für Zellen und Gewebsschnitte nach Flemmings Dreifachbehandlung.

(Aus dem Krebsuntersuchungs-Laboratorium in London.)

Von

Dr. Victor Bonney.

(Hierzu Taf. X.)

Im Verlaufe einer Untersuchung über die Kernveränderungen, welche gewisse Neubildungen kennzeichnen, kam ich auf verschiedene Versuche von Gewebsfärbung, hoffend, ich könnte mir die Arbeit erleichtern, wenn ich auf

einfache und schnell auszuführende Weise Kern, Protoplasma und Zwischengewebe scharf und different von einander zu färben vermöchte.

Ich erreichte mein Vorhaben durch eine Modifikation der Flemmingschen Dreifachbehandlung.

Im VI. Bande des Archivs des Middlesex-Hospitals ist schon darüber berichtet; seitdem habe ich weitere Verbesserungen hinzugefügt.

Die Dreifachbehandlung nach Flemming ist eine den Histologen wohlbekannte Methode. Sein ursprüngliches Vorhaben war, Saffranin, Gentianaviolett und Orange G. derart zu kombinieren, daß in den Geweben das Chromatin der Kerne mit Violett, das Protoplasma mit Saffranin und das Zwischengewebe mit Orange gefärbt sein sollte.

Das scheint wenigstens die Absicht des Erfinders gewesen zu sein, aber nicht alle seiner Nacharbeiter haben dies Ideal erreicht, bei einigen kam die Methode in schlechten Ruf, so beschreibt sie Bolles-Lee als ungeschickt und unsicher; andere empfehlen sie noch warm, obwohl sie auch nicht drei verschiedene scharf getrennte Farben damit hervorzubringen imstande sind. Noch weiter, sogar für eine Doppelfärbung ist die Methode langwierig und unzuverlässig.

In folgender Weise ist es leicht, schnell und sicher eine wirklich dreifache Färbung zu erreichen:

1. Fixieren kleiner Gewebsstücke in Alkohol-Eisessig (1 Teil Acid. acetic. glaciale, 2 Teile Alkohol absolut.). Je nach der Größe bleiben die Stücke 5—15 Minuten darin; zum schnellen Entwässern ist das Stück in mehrmals zu wechselnden absoluten Alkohol zu legen. Fixation in Hermannscher oder Flemmingscher Flüssigkeit ist ebenfalls statthaft, die anderen weniger guten, älteren Fixierungsmittel, wie z. B. Alkohol, sind unbrauchbar für die feinen Einzelheiten, für welche die Methode erdacht ist, Formalin läßt ihre Ausführung überhaupt nicht zu.

2. Einbetten, schneiden und aufkleben der Schnitte in der bekannten Weise.

3. 1 Stunde in gesättigter wässriger Saffraninlösung färben.

4. In Wasser auswaschen.

5. $\frac{1}{4}$ Stunde in gesättigter wässriger Methylviolettlösung färben.

6. Den Objektträger mit Ausnahme des vom Schnitt eingenommenen Teils in Wasser auswaschen und trocken wischen.

7. Mit der folgenden Lösung, die in einer Tropfflasche vorrätig gehalten wird, wird der Objektträger übergossen. 20 ccm Azeton wird tropfenweise gesättigte wässrige Lösung von Orange G hinzugesetzt, bis der flockige Niederschlag, der zuerst auftritt, bei weiterem Zusetzen der wässrigen Lösung wieder aufgelöst ist. Die Lösung ist zu filtrieren. Sofort kommt eine Farbwolke aus dem Schnitt heraus und macht ihn unsichtbar.

8. Fortsaugen der Farbe mit Fließpapier und von neuem die Lösung einzusetzen. Wird die Wolke dünner, dann kann der Schnitt wieder gesehen werden.



9. Wenn der Schnitt eine bräunlich-rosa Farbe bekommt, ist mit dem Zusatz der Orange-Azeton-Lösung einzuhalten.

10. Wenige Sekunden in Azeton auswaschen (Azeton ist in einem kleinen Glasgefäß aufzubewahren; es ist sehr flüchtig, man muß aufpassen, daß der Schnitt nicht trocken wird).

11. In Xylol bringen, dann bei schwacher Vergrößerung nachsehen, ob das gewünschte Resultat erreicht ist. Zweimal ist dann noch frisches Xylol zu nehmen.

12. In Kanada-Balsam einlegen.

Resultat:

1. Alles Chromatin, Kernkörperchen sowie gewisse Kerne (die der multinucleären Leukocyten) sind tief violett gefärbt, die Chromosomen sind durch besonders deutliche Färbung ausgezeichnet.

2. Die achromatischen Spindeln der Kernteilungsfiguren sind blaßrosa.

3. Das Protoplasma ist rosarot.

4. Das interstitielle Gewebe ist blaßgelb.

Zusätze:

A. Das Gelingen der Färbung scheint von einer Selektionswirkung des Azeton-Orange auf Saffranin und Methylviolett abzuhängen. Es entfernt beide Farben aus dem Gewebe, das Saffranin sehr schnell aus dem Chromatin, das Methylviolett ebenschnell aus dem Protoplasma.

B. Der wichtigste Faktor bei der ganzen Prozedur ist die Orange-Azeton-Lösung. Wirkt sie zu lange Zeit ein, dann färbt sich das ganze Präparat gleichmäßig gelb. Wirkt sie nicht lange genug, dann sieht das Präparat fleckig aus, Methylviolett bleibt im Protoplasma zurück, das bunt violett gefärbt erscheint. Nach einiger Zeit verschlechtert sich die Lösung noch.

C. Die Wirkungskdauer des Saffranin und Methylviolett muß, je nach der Besonderheit der Gewebe, eine verschiedene sein. Die von mir angegebenen Zeiten stellen den mittleren Durchschnitt dar.

Hat das Saffranin im Verhältnis zum Methylviolett zu lange eingewirkt, dann ist das Chromatin nicht violett, sondern ebenfalls mit Saffranin gefärbt, so daß ein Farb-Unterschied zwischen den beiden Zellelementen infolgedessen nicht mehr vorhanden ist.

Wirkte das Methylviolett zu lange ein, dann geht das Saffranin früher aus dem Protoplasma heraus als das Methylviolett, das Präparat wird fleckig und unscharf.

Ein ganz geringer Grad Geschicklichkeit läßt diese Schwierigkeiten leicht bewältigen.

D. Wenn die Untersuchung mit schwacher Vergrößerung (siehe oben) ergibt, daß nicht hinreichend die Farbe aus dem Präparat entfernt ist, dann ist von neuem Orange-Azeton hinzuzusetzen. Wenn dagegen zu stark entfärbt ist, dann muß das Präparat vom Xylol durch Azeton in Wasser zurückgebracht werden, und der Prozeß muß von neuem beginnen.