

XVII.

Eine Modifikation des Färbens mit Hämatoxylin, Cochenille und Karmin.**Ein neues Aufhellungsmittel.**

Von

Prof. Dr. Bernhard Rawitz.

1. Das Färben mit Alaunhämatoxylin bzw. -hämatein, Alauncochenille und Alaunkarmin ist mit mancherlei Übelständen verknüpft, die weniger im Material als in dem verwendeten Farbstoffe begründet sind. Die Alaunhämatoxyline, gleichgültig nach welcher Vorschrift sie angefertigt sind, müssen, bevor sie angewendet werden können, „ausreifen“. Das dauert unter Umständen Monate; immer aber sind dafür mehrere Wochen erforderlich. Und ist die Lösung verwendbar geworden, dann ereignet es sich nicht gar so selten, daß sie ziemlich schnell verdirbt. Worauf dieses Verderben beruht, läßt sich nicht in jedem einzelnen Falle feststellen. Selbst mein Glycerinalaunhämatoxylin (vgl. mein „Lehrbuch der mikroskopischen Technik“, S. 175), das sich im allgemeinen jahrelang unverändert hält, verdirbt sehr schnell, wenn das Glycerin, was jetzt häufig der Fall ist, nicht ganz rein ist. Die Alaunhämateine bedürfen der Reifung nicht. Aber das Hämatein selber ist seit längerer Zeit sehr unzuverlässig geworden. Neben einer Droge, welche allen Anforderungen genügt, kommen auch solche im Handel vor, die in jeder Kombination versagen. Die Herstellung der Alauncochenille ist sehr umständlich und die mit dem Reagens erzielten Färbungen genügen den Ansprüchen der Mikroskopiker darum nicht, weil sie oft durch Farbstoffniederschläge verunreinigt sind. Die alte Klage über die Unzuverlässigkeit der Karmine des Handels besteht auch heute noch zu Recht. Und die Karmalaune (vgl. mein zitiertes Lehrbuch, S. 170) versagen fast immer am Material, das in einem Chromsalz fixiert war.

Darum dürften die in folgenden Zeilen zu schildernden Verfahren der Färbung vielleicht nicht unwillkommen sein. Denn Mißerfolge mit ihnen sind bei richtiger Ausführung an gut fixiertem Material nicht zu befürchten und die erzielten Färbungen genügen nicht nur allen Ansprüchen, sondern sind auch meines Erachtens denen vorzuziehen, die man mit den gewöhnlich gebrauchten Farblösungen erhält. Das Prinzip besteht darin, die Vereinigung von Alaun und Farbkörper im Präparate sich vollziehen zu lassen. Dadurch wird bei den Hämatoxylinen die Reifung unnötig und erübrigt sich die umständliche Anfertigung der Farblösungen von Cochenille und Karminsäure bzw. Karmin.

Hämatoxylin. Schnitte von Rückenmark von Mensch und Säugetier (andere Vertebratengruppen habe ich noch nicht geprüft), das nach meiner Modifikation der Betzschen Methode

nach Vorkonservierung in 10 prozentigem Formol fixiert war (vgl. meine Abhandlung „Neue Methoden zur Untersuchung des Zentralnervensystems der Vertebraten“. In Ztschr. f. wissensch. Mikroskopie Bd. 26, 1909), werden folgendermaßen behandelt: Die gut gewässerten Schnitte — gleichgültig, ob sie von zelloidiniertem oder nicht durchtränktem Material stammen, gleichgültig auch, ob sie in Alkohol oder in Kaliumbichromat-Lösung aufbewahrt wurden — kommen für 1 bis 1½ Stunden in eine 4 prozentige mit gewöhnlichem Wasser hergestellte Lösung von Aluminiumammoniumsulfat (Ammonalaun). Kalialaun und gebrannter Alaun (das Aluminium ustum des Deutschen Arzneibuches) sind entschieden zu widerraten, da sie oft körnige Niederschläge geben, die beim Ammonalaun ausbleiben. Nach der Alaunisierung wird in destilliertem Wasser gut abgewaschen. Darauf kommen die Schnitte in eine Hämatoxylinlösung, die zum jedesmaligen Gebrauche frisch angefertigt wird. Und zwar gibt man auf 20—30 ccm destillierten Wassers 3—4 Tropfen einer 1 prozentigen alkoholischen Hämatoxylinlösung (1 g Hämatoxylin in 100 ccm 92 prozentigem Alkohol gelöst). Frische oder alte Hämatoxylinlösungen verhalten sich ganz gleich, höchstens muß man von ersteren einige Tropfen mehr nehmen. In diesem gelblich aussehenden Hämatoxylin bleiben die Schnitte 24 Stunden. Dann wird in destilliertem Wasser gut abgewaschen, dann Alkohol und Aufbewahrung wie üblich. In den meisten Fällen hat die Färbung nach 24 Stunden diejenige Intensität erreicht, bei welcher alle Einzelheiten im Präparat hervortreten. Manchmal erscheinen die Schnitte statt dunkelblau tiefschwarz. Dann bringt man sie nach dem Abwaschen auf ½—1 Stunde in 2 prozentige Ammonalaunlösung, in welcher sie den normalen dunkelblauen Farbenton erhalten. Nur sehr selten, wenn ich nämlich die Hämatoxylinlösung zu stark gemacht hatte, mußten die Schnitte 24 Stunden lang in der 2 prozentigen Ammonalaunlösung bleiben, um den richtigen Farbenton zu erhalten. Es bewahrheitet sich hier also die alte färberische Erfahrung, daß Färbungen, die an einem irgendwie gebeizten Stoffe vorgenommen wurden, in der verdünnten Beize oder in einem Überschuß der Beize sich wieder lösen.

Die auf die vorstehend geschilderte Weise gefärbten Schnitte zeigen alle Einzelheiten des Rückenmarkbaues auf das schönste. Die Ganglienzellen, die Glia mit ihren Kernen und die Achsenzylinder sind tiefblau, unterscheiden sich aber voneinander durch verschiedene Nüancen.

Auch Gehirnschnitte kann man in der angegebenen Art färben und erhält gleichfalls brauchbare Resultate. Freilich zeigt sich der alte Übelstand, daß nicht alle Ganglienzellen der grauen Rinde gefärbt sind. Gleichgültig nämlich, welchen Farbstoff man bei Schnitten von der Hirnrinde anwendet — nur einige Aniline färben alle Zellen —, immer erhält man dasselbe Bild. Die Zellen nämlich, die auf der Höhe der Windungen stehen, sind gut gefärbt, während die Rindenzellen in den Hirnfurchen ungefärbt bleiben, kaum daß ihre Kerne hervortreten. Die modifizierte Hämatoxylinfärbung bringt aber im Gegensatz zu allen anderen Färbungen — einige Aniline, wie gesagt, ausgenommen — die Zellen der Windungshöhe viel scharfer zur Erscheinung, als dies sonst der Fall ist.

Durch die Liebenswürdigkeit der Herren Westenhöfer vom Pathologischen Museum und Heitzmann vom Pathologischen Institut standen mir einige Schnitte von pathologischem Material zur Verfügung. Die Objekte waren in Formol konserviert, die Schnitte mit dem Gefriermikrotom angefertigt: Methoden, welche zwar eine schnelle Diagnostik ermöglichen, aber für histologische Zwecke völlig ungenügend sind. Auch an solchem Material bewährt sich die Färbung, denn alle Einzelheiten in den Schnitten werden auf das schärfste hervorgehoben. Ja, ich glaube mich nicht zu täuschen, wenn ich behaupte, daß die mit meiner zweizeitigen Methode erzielten Ergebnisse die mittels der Schnellfärberei erhaltenen, was ihren wissenschaftlichen Wert betrifft, bedeutend übertreffen.

Statt des Ammonalauns kann man mit dem gleichen Erfolge das Natriumhyposulfit (Natriumthiosulfat) nehmen, das die Firma C. A. F. Kahl-

baum mit der Bezeichnung „zur Analyse“ in den Handel bringt. Diese Substanz ist bisher in der histologischen Technik noch nicht verwendet worden.

Man macht sich eine 5 prozentige Lösung des Salzes in gewöhnlichem Wasser. Das Verfahren ist ganz wie beim Ammonalaun. Die Schnitte kommen also für 1—1½ Stunden in die 5 prozentige Lösung des Natriumthiosulfats, werden dann gut in destilliertem Wasser abgewaschen und für 24 Stunden in eine Hämatoxylinlösung gegeben, die genau wie die nach Ammonalaun-Behandlung verwendete hergestellt wird. Nach dem Färben Waschen in destilliertem Wasser und Weiterbehandeln wie gewöhnlich. Eine Überfärbung habe ich bei meinem Material niemals beobachtet. Sollte sie gelegentlich sich einstellen, so dürfte es genügen, die abgewaschenen Schnitte auf ½—1 Stunde in 2½ prozentige Natriumthiosulfat-Lösung zu bringen, um die Überfärbung zur richtigen Färbung zu modifizieren.

Die Resultate sind an Rückenmarksschnitten ganz ausgezeichnet. Mit derselben Schärfe wie bei der vorigen Methode treten alle Einzelheiten des Präparates hervor. Nur ist der Farbenton statt dunkelblau dunkellila.

Schnitte durch die Hirnrinde werden ebenfalls gut gefärbt. Und selbstverständlich ist auch hier die Tatsache festzustellen, daß die Pyramidenzellen in den Hirnfurchen ungefärbt bleiben.

An demjenigen pathologischen Material, das mir zur Verfügung stand, versagte das Natriumthiosulfat vollständig, und zwar nicht nur in der Kombination mit Hämatoxylin, sondern auch in allen noch zu schildernden Kombinationen mit anderen Farbstoffen. Es dürfte kaum ein Zweifel sein, daß die von histologischen Gesichtspunkten aus ganz ungenügende Fixierung des Materials allein die Schuld trägt.

Cochenilletinktur. Man behandelt Schnitte von Rückenmark mit Ammonalaun, wie oben angegeben, und bringt sie nach gutem Abwaschen in verdünnte Cochenilletinktur. Diese letztere Farblösung, die von Paul Mayer empfohlen wurde (vgl. mein zitiertes Lehrbuch S. 154), stelle ich mir statt mit 70 prozentigem mit 92 prozentigem Alkohol her. In 20—30 ccm destillierten Wassers kommen 5—10 Tropfen — die Menge der Tinktur richtet sich nach der Anzahl der Schnitte — Cochenilletinktur, die gut umgerührt werden. Die Lösung wird milchig trübe und erhält einen gelbroten Farbenton. In ihr bleiben die Schnitte 24 Stunden, dann sorgfältiges Abwaschen in destilliertem Wasser und Weiterbehandlung wie gewöhnlich. Ist sorgfältig, also in mehrere Male gewechseltem Wasser abgewaschen worden, dann treten im Präparate keine Niederschläge von Farbstoff bei der nachherigen Alkoholbehandlung auf. Die Färbung ist ganz ausgezeichnet, denn alle Einzelheiten des Präparates treten scharf hervor. Der Farbenton ist hochrot oder karminrot. Das gleiche Resultat erhält man, wenn man statt Ammonalaun Natriumthiosulfat zur Vorbehandlung wählt. Auch in diesem Falle sind die Schnitte in einer allen Ansprüchen genügenden Weise gefärbt; der Farbenton ist blaßrot.

Die Ergebnisse an der Hirnrinde entsprechen vollkommen denen, die bei der Hämatoxylinfärbung zu verzeichnen waren. Und es ist gleichgültig, ob Ammonalaun oder Natriumthiosulfat verwendet wurde. An dem mir zur Verfügung stehenden pathologischen Material versagte die Cochenilletinktur völlig. Nur die histologisch ungenügende Fixierung, das sei wiederholt hervorgehoben, ist dafür verantwortlich zu machen.

Karminsäure. Man löst 1 g Karminsäure in 200 ccm destillierten Wassers. Die Lösung wird im Laufe der Zeit schimmelig, doch hat das auf ihre Färbekraft gar keinen Einfluß. Denn weder entstehen dadurch Niederschläge in den Schnitten, noch leidet der Farbenton und die Klarheit und Schönheit der Bilder. Rückenmarksschnitte, die entweder mit Ammonalaun oder

Natriumthiosulfat vorbehandelt waren, kommen in eine Farbflotte, die auf 20—30 ccm destillierten Wassers 10—15 Tropfen der Karminsäurelösung enthält. Nach 24 Stunden wird in destilliertem Wasser abgewaschen und wie üblich weiterbehandelt. Das Ergebnis ist insofern nicht unabhängig von der Vorbehandlung, als Ammonalaun und Natriumthiosulfat Unterschiede im Farbenton bedingen. Nach Ammonalaun wird der Farbenton karminrot, nach Natriumthiosulfat braunrot. In beiden Fällen treten aber alle Einzelheiten auf das schönste und schärfste hervor. Gehirnschnitte zeigen die bekannten Unterschiede in der Färbung zwischen Windungshöhe und Hirnfurche. Die Färbung pathologischen Materials, die, wie gesagt, nur nach Vorbehandlung mit Ammonalaun gelingt, ist gut, wenn auch nicht sehr diskret, wenigstens nicht so diskret, wie bei der Hämatoxylinfärbung.

Karmin. Man verreibt 1 g Karmin zu einem feinen Pulver und gibt dies in 100 ccm destillierten Wassers. Die Mischung ist zwar sofort verwendbar, doch tut man gut, einige Tage zu warten, weil sich dann das Karmin — wenigstens war dies bei meiner Droge der Fall — in ziemlicher Menge löst. Nach Vorbehandlung mit Ammonalaun oder mit Natriumthiosulfat kommen die gut abgewaschenen Rückenmarksschnitte in eine Farbflotte, die auf 20—30 ccm destillierten Wassers 10—20 Tropfen wässrige Karminlösung enthält. Letztere muß nach dem Eingießen in das Wasser gut umgerührt werden. Nach 24 Stunden ist die Färbung beendet. Das Resultat ist sehr gut. Die mit Ammonalaun behandelten Schnitte sind hochrot, die mit Natriumthiosulfat behandelten hellrosa gefärbt. Die Einzelheiten treten scharf hervor. Das gleiche Ergebnis in tinktorialer Beziehung ist an Hirnrindenschnitten zu beobachten. Und selbstverständlich zeigen diese die wiederholt hervorgehobenen Übelstände. In den Schnitten von pathologischem Material, die ich zur Verfügung hatte, versagte die Färbung zwar nicht, doch waren die färberischen Ergebnisse ungenügend. Es war überall ein gleichmäßiger roter Farbenton ohne diskretes Hervorheben der Einzelheiten vorhanden. An gut fixiertem Material werden zweifelsohne befriedigende Ergebnisse zu erzielen sein.

2. Von den verschiedenen Reagenzien, die zur Aufhellung mikroskopischer Schnitte verwendet werden, verlangt das Xylol eine vorherige gute Entwässerung in absolutem Alkohol. Diese kann bei Anilinfärbungen nicht vorgenommen werden, weil der absolute Alkohol allen Farbstoff auszieht. Das Karbol-Xylol hat den Anilinen gegenüber den gleichen Nachteil, ist überhaupt für feinere Arbeiten gänzlich unverwendbar. Das Bergamottöl — Nelkenöl und Origanumöl haben nur noch historisches Interesse — ist zur Zeit kaum noch zu haben. Das Terpeneöl ist zu fett. Ich empfehle daher auf das wärmste das bisher in der histologischen Technik noch gar nicht verwendete Thymianöl.

Es ist eine angenehm riechende, wasserklare oder schwach gelbliche Flüssigkeit, die allen Anforderungen an ein aufhellendes Intermedium genügt. Die Schnitte brauchen nicht völlig entwässert zu werden, sondern kommen aus dem gewöhnlichen Laboratoriumsalkohol direkt in das Öl. Sie hellen sich darin in kürzester Zeit völlig auf. Thymianöl greift keinen Farbstoff an, läßt insbesondere die Anilinfarben unberührt, namentlich wenn man die mit ihnen gefärbten Schnitte mit meinem Brechweinsteinalkohol (vgl. meine Abhandlung: „Zur Technik der Untersuchung des Zentralnervensystems der Säugetiere“. In Ztschr. f. wissensch. Mikroskopie Bd. 28, 1911) behandelt hat. Die Durchtränkung mit Balsam oder Dammar erfolgt sofort, wenn man die aufgehellten Schnitte auf dem Objektträger mit etwas Filtrierpapier abgetrocknet hat. Das gebrauchte Thymianöl ist immer wieder zu verwenden und hat hierdurch einen Vorzug vor allen übrigen Aufhellungsmitteln. Es greift niemals das Zelloidin an, das z. B. von gelb gewordenem Bergamottöl aufgelöst wird.

Berlin, 7. November 1919.