

(Aus dem Pathologisch-Anatomischen Institut der Universität in Wien.
Vorstand: Prof. Dr. R. Maresch.)

Die färberische Darstellung der Hauptzellgranula in der menschlichen Magenschleimhaut.

Von

H. Hamperl (Wien).

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 17. August 1925.)

Wenn ich es im folgenden unternehme, einen kurzen Überblick über die Methoden zu geben, die von einzelnen Autoren zur färberischen Darstellung der Hauptzellgranula angewandt wurden, so ist es von vornherein klar, daß es unmöglich sein wird, jede der zahlreichen Arbeiten, die sich mit der normalen und pathologischen Histologie der Magenschleimhaut beschäftigen, einzeln anzuführen. Es sollen deshalb nur die wichtigsten, für die Färbetechnik grundlegenden Arbeiten erwähnt werden, und im Anschluß daran möchte ich eine neue einfache Methode zur Darstellung der erwähnten Granula vorschlagen.

Rollet und *Heidenhain* haben vor über 50 Jahren in den Fundusdrüsen des Magens zwei Zellarten unterschieden, die sie delo- und adelomorphe (*Rollet*), bzw. Haupt- und Belegzellen (*Heidenhain*) nannten. Als eines der Hauptunterscheidungsmerkmale diente in gleicher Weise beiden Forschern die Granulierung der Zellen, wie sie sich leicht an frischen Zupfpräparaten darstellen läßt: Die Hauptzellen besitzen zahlreiche grobe, stark lichtbrechende Granula, während das Protoplasma der Belegzellen durchaus feingekörnt erscheint. Diese Angaben wurden von *Langley*, *Nussbaum* u. a. Untersuchern bestätigt, die sich ebenfalls hauptsächlich frischen Materials bei ihren Untersuchungen bedienten. In einer späteren Arbeit wies dann *Langley* darauf hin, daß an Material, welches mit Osmiumsäure fixiert wurde, die Körnchen der Hauptzellen auch nach der Einbettung am Schnittpräparat erhalten bleiben und einen bräunlichen Farbton aufweisen. Die feine Körnelung der Belegzellen zu erhalten, gelang viel leichter, und genügten zu diesem Zweck schon die gewöhnlichen Fixierungsmittel. Auch diese Angaben wurden von vielen Seiten bestätigt und viele Autoren wendeten in der Folgezeit auch Osmiumsäure oder osmiumsäurehaltige Gemische an, wenn es sich um die Fixierung der Hauptzellgranula handelte. Waren dann die Granula fixiert, so gelang es nicht schwer, sie mit den verschiedenen Granulafarbstoffen zu färben.

So benützte z. B. *Eklöf* ein Osmiumsäure-Kaliumbichromat-Eisessig-Gemisch und konnte bei Nachfärbung mit Krystallviolett (*Benda*) zumeist, jedoch nicht regelmäßig, die Körnchen gefärbt darstellen.

Noll und *Sokoloff* fixierten in Osmiumsäure-Kalumbichromat-Sublimat und erhielten bei Nachfärbung mit Pikrinsäurefuchsin (*Altmann*) keine regelmäßigen, eindeutigen Bilder. In den Randpartien des Schnittes waren wohl nur die Hauptzellgranula gelblich gefärbt, in den mittleren Anteilen nahmen jedoch Protoplasma und Körnchen einen gleichmäßigen, gelben Farbton an, so daß die letzteren nicht charakteristisch und klar dargestellt waren.

J. E. Schmidt beschreibt nach *Altmann*-Fixierung und -Färbung eine braunrote Färbung der Körnchen.

Schließlich hat *Pirone* in einzelnen Zellen nach *Flemming*-Fixierung Granula gesehen, doch erschienen wieder andere Zellen wie vakuolisiert; offenbar blieb nach Herauslösung der Körnchen nur das protoplasmatische Netzwerk übrig.

Aus den eben angeführten Tatsachen erhellt, daß die Osmiumsäure kein unbedingt verlässliches, jedoch bei richtiger Anwendung ein immerhin brauchbares Fixierungsmittel für die Körnchen der Hauptzellen darstellt. Viele Autoren haben sich jedoch damit begnügt, bloß das protoplasmatische Netzwerk, das durch Herauslösung der Granula entsteht, zur Darstellung zu bringen. Hier seien nur *Kolossow*, *Hovén*, *Liebert*, *Zimmermann* und *Altmann* erwähnt.

Daß in dem erwähnten feinen protoplasmatischen Netzwerk auch feinste Fäden und Körnchen (Mitochondrien) vorkommen, ist bei der drüsigen Natur der in Rede stehenden Zellen durchaus nicht verwunderlich, nur sind solche Granula streng von den größeren Sekretkörnchen (*Zymogengranula* — *Langley*) zu trennen, eine Unterscheidung, auf die *Renaut* und *Théohari* nicht mit wünschenswerter Klarheit hingewiesen haben.

Das Ergebnis all dieser Fixierungs- und Färbeversuche finden wir in fast allen Lehrbüchern teils durch Abbildungen, teils durch besondere Hinweise niedergelegt (*Schaffer*, *Prenant*, *Stoehr*). Im *Kölliker-Ebners* Lehrbuch heißt es: „Die Körnchen der Hauptzellen sind sehr empfindliche Gebilde, die durch die meisten Reagenzien zerstört werden, doch konnte *Langley* bei einigen Tieren dieselben mit Osmiumsäure fixieren.“ Erst in einer der Arbeiten *Bensleys* finden wir eine Abbildung, die die Hauptzellengranula distinkt gefärbt zeigt. *Bensley* wandte zur Fixierung nicht Osmiumsäure, sondern ein Kalumbichromat-Sublimatgemisch an und färbte mit Methylviolett („Neutral gentian Violet“), einem Farbstoff, den schon *Bonnet* seinerzeit zur Unterscheidung von Hauptzellen, Pyloruszellen und Belegzellen verwendet hatte. Da jedoch *Bensley* bei Anwendung dieser Methode keine regelmäßigen Bilder erzielen konnte, verbesserte er sie späterhin, in welcher Form sie dann *Harvey* benutzt hat, der ebenfalls klare Abbildungen gefärbter Hauptzellengranula bringt. Die Angaben *Bensleys* waren mir leider im Original nicht zugänglich (auch *Oppels* Referat der betreffenden Arbeit bringt keine technischen Einzelheiten). Der gleiche Umstand dürfte wohl auch dafür maßgebend gewesen sein, daß *Bensleys* Methode nirgends in der deutschen Literatur erwähnt ist (*Romeis*, *Schmorl*, *Herxheimer*, *Mayer*).

Aber auch späteren deutschen Untersuchern ist es manchmal gelungen, ohne Anwendung von Osmiumsäure die Hauptzellengranula zu fixieren und zu färben.

Heyrovsky fixiert in Müller-Formol und färbt mit stark verdünntem Jenner-schen Farbstoff. In seinen Bildern scheint jedoch die protoplasmatische Zellbasis stärker gefärbt zu sein als der dem Lumen zugewendete Teil der Hauptzellen, was eher gegen eine distinkte Färbung der Sekretkörnchen spricht.

Kokubo fixiert ebenfalls in Müller-Formol und benützt *Unnas* polychromes Methylenblau zur Färbung, bringt aber keine Abbildung seiner Schnitte, an denen deutliche Färbung der Hauptzellgranula festzustellen gewesen sein soll.

Aschoff hat in einer neueren Arbeit anscheinend *Kokubos* Methode (Müller-Formolfixierung) angewandt und bringt klare Abbildungen von nach *Giemsa* gefärbten Hauptzellen.

Auch *E. Müller* hat nach Kaliumbichromat-Formol-Fixierung (*Kopsch*) in manchem seiner Schnitte die Körnchen mittels der *Heidenhainschen* Eisenhämatoxylin-Methode darstellen können.

Schließlich haben *Unna* und *Wissig* die Kaliumpermanganat-Methode *Unnas* auf die Magenschleimhaut angewandt und runde, deutlich gefärbte Körnchen in den Hauptzellen gesehen, doch konnte *Groebbel*s diese Beobachtung nicht bestätigen. Er beschreibt vielmehr nur eine klare Färbung von Körnchen (Granoplasma) an Alkohol fixiertem Material nach *Unna-Pappenheim*-Färbung, doch erscheint es nach seinen Abbildungen durchaus nicht sicher, daß er die typischen „Zymogengranula“ *Langley*s am fixierten und gefärbten Präparat vor sich gehabt hat.

Vergleichen wir die hier allein in Betracht kommenden, einwandfreien Resultate *Heyrovskys* und *Kokubos* (*Aschoffs*) mit denen *Bensleys* und *Harveys*, so sind dieselben sowohl, was Färbung als auch Fixierung anlangt, bemerkenswert.

Während *Bensley* und *Harvey* reines Methylviolettt anwandten, benutzten *Heyrovsky* und *Kokubo* kompliziert zusammengesetzte Farbstofflösungen, bei denen es schwer ist, den die Hauptzellengranula färbenden Farbstoffanteil zu bestimmen, immerhin erscheint es jedoch auffällig, daß in allen Fällen die Färbung der Körnchen eine blaue bzw. violette war.

Ich hatte Gelegenheit, frische menschliche Magenschleimhaut, die in Kaiserlingscher Flüssigkeit fixiert war, zu untersuchen, und konnte feststellen, daß bei progressiver Färbung mit stärkst verdünntem *Romanovskyschen* Farbstoff die Hauptzellkörnchen einen sehr distinkten, blauvioletten Farnton annehmen. Auch bei Färbung mit Methylgrün-Pyronin (der Farbstoff wurde aus den von Grübler bezogenen Chemikalien nach der Vorschrift *Pappenheims* hergestellt) waren die Hauptzellengranula zum größten Teil grün, zum Teil aber auch violett gefärbt, wobei auffallenderweise im Laufe der Zeit bei längerem Liegen in den Präparaten immer mehr grünlich gefärbte Körnchen langsam einen violetten Farnton annahmen. Da eine solche Metachromasie, die auch bei reiner Methylgrünfärbung beobachtet wurde, unwahrscheinlich war und wir andererseits wissen, daß das in den Handel kommende Methyl-

grün oft durch Spuren von Methylviolett verunreinigt ist, lag es nahe, an eine Allochromasie im Sinne *Lehnners*^{*)} zu denken. In der Tat zeigte es sich bei Ausschütteln einer wässerigen Lösung von Methylgrün mit Chloroform, daß letzteres eine deutliche, violette Färbung annahm, welche im Ton durchaus mit der früher erwähnten violetten Färbung der Hauptzellengranula übereinstimmte. Färbte man nun mit der gründlich ausgeschüttelten Lösung von Methylgrün, so war keine Spur einer violetten Färbung der Granula zu entdecken. Die Hauptzellengranula hatten also die geringen Spuren des im Methylgrün enthaltenen Methylviolettes an sich gerissen, was auf eine große Affinität derselben zu diesem Farbstoff schließen läßt. Höchstwahrscheinlich ist wenigstens ein Teil der guten Färbungsergebnisse, die *Heyrovsky* mit Jenner-Farbstoff, *Kokubo* mit polychromem Methylenblau, *Aschoff* mit *Giemsa*-Lösung und ich mit dem *Romanovskyschen* Farbstoff erhielten, gleichfalls auf geringe Beimengung von Methylviolett zu diesen Farbstoffen zu beziehen. Es lag nun nahe, diese Affinität der Zellkörnchen auszunützen und sie mit reinem, stark verdünntem Methylviolett darzustellen. In der Tat erhält man die klarsten Bilder, wenn man Paraffinschnitte in einer maximal verdünnten wässerigen Methylviolettlösung über Nacht stehen läßt. Die Körnchen färben sich dann tief dunkelblau, während das übrige Gewebe nur schwach angefärbt wird und bei einer nachfolgenden Differenzierung mit Alkohol den Farbstoff wieder leicht abgibt, während die von vornherein stärker gefärbten Hauptzellengranula trotz der Differenzierung den Farbstoff länger festhalten und so schließlich ganz isoliert gefärbt sein können. Andere Farbstoffe, ebenso wie Methylviolett in konzentrierter Lösung färben, wie aus dem früher Gesagten leicht verständlich, bei geeigneter, die Körnchen erhaltender Fixierung nicht nur diese, sondern auch die Kerne und das Protoplasma, so daß von einer elektiven Färbung der Hauptzellengranula nicht mehr die Rede sein kann. Als Beispiele solcher Farbstoffe wären Methylgrün, Safranin, Toluidinblau, Magentarot u. a. zu erwähnen.

Eine elektive Färbung ist aber, wie eben erwähnt, nur bei geeigneter Fixierung möglich. Vergleichen wir die Fixierungsflüssigkeiten der früher erwähnten Untersucher, so finden wir eine auffallende Übereinstimmung insofern, als alle diese Autoren Formalin, dem eine Salzlösung zugesetzt war, benutzten. *Kokubo*, *Heyrovsky* und *Müller* verwendeten Müller-Formol (Formol-Kaliumbichromat-Glaubersalz), *Harvey* benutzte Formalin-Kaliumbichromat-Sublimat. Da es bei Anwendung der eben beschriebenen Färbemethode leicht war, die Hauptzellengranula, falls sie überhaupt bei der Fixierung erhalten geblieben waren, zur Darstellung

^{*)} Ich möchte hier nicht versäumen, Herrn Privatdozenten Dr. *J. Lehner* für seine mir persönlich erteilten, freundlichen Ratschläge herzlichst zu danken.

zu bringen, lag es nahe, die verschiedene Wirkung der Fixierungsflüssigkeiten näher zu untersuchen. Diese Versuche — Einzelheiten sollen der gebotenen Kürze halber nicht erwähnt werden — führten nun zu folgenden Ergebnissen. Formol allein in 10 proz. Lösung angewandt, erhält zwar einen Teil der Körnchen, hat jedoch den Nachteil, daß erstens, wie gesagt, nicht alle Körnchen fixiert werden, und zweitens, daß sich wegen zu starker Mitfärbung des übrigen Gewebes eine reine, elektive Färbung der Hauptzellengranula nicht erzielen läßt. Verwendet man hingegen statt des reinen Formols Kaiserlingsche Mischung (Formalin — Kalium aceticum — Kalium nitricum), so sind diese beiden Nachteile behoben. Es ist aber diese veränderte Wirkung nicht dem Kalium nitricum oder aceticum als solchem zuzuschreiben, da man bei Zusatz von Kochsalz oder Karlsbader Salz den gleichen Erfolg erzielen kann; es scheint somit viel weniger auf das Salz als solches als auf die Salzkonzentration anzukommen, kurz auf eine Hypertonie des Formalgemisches gegenüber dem Gewebssaft. Die Menge des zugesetzten Salzes wird jedoch durch die bei so hoch konzentrierten Salzlösungen unvermeidliche Schrumpfung eingeschränkt, da diese das Material für histologische Zwecke unbrauchbar machen würde. Nun genügt aber die reine Formalinfixierung größeren histologischen Ansprüchen nicht immer. Deshalb wurden Versuche mit dem von *Schaffer* angegebenen Formolalkoholgemisch angestellt. Hierbei kommt der Einfluß der Salzbeimengung in besonders klarer Weise zum Ausdruck. Färbt man bloß in Formolalkohol fixiertes Material auf die angegebene Weise mit Methylviolett, so ist von den Körnchen gewöhnlich keine Spur zu entdecken, nur ein feines protoplasmatisches Maschenwerk wird dargestellt (Abb. 1). Vollkommen anders wird das Bild, sobald man auf 100 ccm Formolalkohol 3—6 g eines Salzes (am besten erwies sich Kalium aceticum) zusetzt. Bei gelungener Differenzierung erscheinen dann nur die Körnchen in den Hauptzellen auf überaus klare Weise dargestellt, während alles übrige Gewebe ungefärbt bleibt (Abb. 2).

Ich möchte hier zum Schluß auf einen lehrreichen Parallelismus hinweisen, der zwischen der Fixierung der Hauptzellengranula und Leukocytengranula besteht. Will man nämlich die Oxydasereaktion an letzteren auch am eingebetteten Material anstellen, so muß man sich ähnlich wie bei der Fixierung der Magenschleimhaut entweder eines Formalin-Salzgemisches (*Strassmann*) oder des *Orthschen* Gemisches (*Fursenko*) bedienen. Warum in beiden Fällen die Salzbeimengung zum Formalin erhaltend auf die Zellgranula oder Fermente wirkt, oder ob wir uns diese Wirkung überhaupt im Sinne einer Beizung vorzustellen haben, entzieht sich bis nun unserer Kenntnis. Immerhin wird es angezeigt sein, solche hypertonische Formalinlösungen nicht nur zur Untersuchung der gesunden und ganz besonders der kranken Magen-

schleimhaut, sondern systematisch auch auf andere Organe mit schwer darstellbaren Plasmastrukturen anzuwenden.

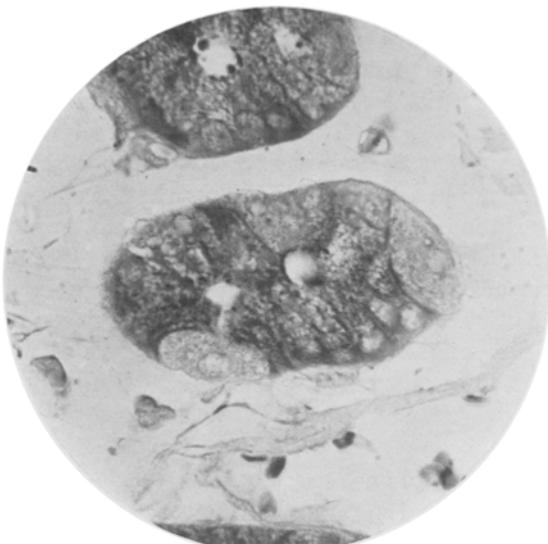


Abb. 1. Menschl. Magenschleimhaut. Formol-Alkohol. Methylviolett progressiv.

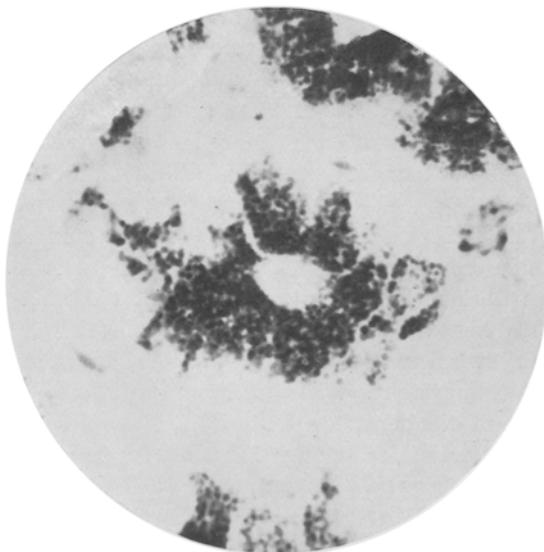


Abb. 2. Menschl. Magenschleimhaut. Formol-Alkohol und Salzzusatz. Methylviolett progressiv.

Zusammenfassend möchte ich zur Fixierung der Hauptzellgranula der Magenschleimhaut folgende Methode vorschlagen, die sich mir bei den verschiedenen Versuchen als die beste erwiesen hat.

Fixierung der frischen Schleimhautstückchen in folgender Flüssigkeit:

Formalin 40 proz	33,0 ccm
Alkohol 80 proz.	66,0 ccm
Kalium aceticum	3—6,0 g

In dieser Lösung verbleiben die Stückchen bis 24 Stunden;

Übertragen in 95 proz. Alkohol;

Absoluter Alkohol und Einbettung in Paraffin;

Färbung der entparaffinierten Schnitte in einer stark verdünnten wässerigen Lösung von Methylviolett (die Lösung soll blaßviolett und durchsichtig sein) durch 12 Stunden;

Abspülen mit destilliertem Wasser;

Differenzieren in absolutem Alkohol (etwa 1 Minute genügt in der Regel);

Aufhellen in Xylol;

Einschluß in Balsam.

Bei gelungener Färbung erscheinen bloß die Körnchen der Hauptzellen gefärbt, und zwar in einem dunkelblauvioletten Farbtön. Zur Darstellung der Kerne ist eine Vorfärbung mit Carmin zu empfehlen*).

Literaturverzeichnis.

- ¹⁾ *Altmann*, Elementarorganismen. 2. Aufl. Leipzig 1894. — ²⁾ *Aschoff*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **201**. 1923. — ³⁾ *Bensley*, Quart. journ. of microscop. science **41**. 1899. — ⁴⁾ *Bensley*, Biol. bull. Boston **2**, 3. 1900. — ⁵⁾ *Bensley*, Amerie. journ. of anat. **2**, 1903. — ⁶⁾ *Bonnet*, Dtsch. med. Wochenschr. **19**. 1893. 430. — ⁷⁾ *Eklöf*, Anat. Hefte 1. Abt. **51**, H. 153. 1914. — ⁸⁾ *Furzenko*, Zentralbl. f. allg. Pathol. u. pathol. Anat. **22**. — ⁹⁾ *Greenwood*, Journ. of physiol. **5**. — ¹⁰⁾ *Groebels*, Zeitschr. f. Biol. **80**. 1924. — ¹¹⁾ *Harvey*, Americ. journ. of anat. **6**. 1907. — ¹²⁾ *Heidenhain*, Arch. f. mikr. Anat. **6**. 1870. — ¹³⁾ *Herxheimer*, Technik der pathol.-histol. Untersuchung. Wiesbaden 1912. — ¹⁴⁾ *Heyrovsky*, Dtsch. Zeitschr. f. Chir. **122**. 1913. — ¹⁵⁾ *Hovén*, Arch. f. exp. Zellforsch. **8**. 1912. — ¹⁶⁾ *Kölliker-Ebner*, Handbuch der Gewebslehre des Menschen. Leipzig 1903. — ¹⁷⁾ *Kokubo*, Orth.-Festschrift 1903. — ¹⁸⁾ *Kolosow*, Arch. f. mikrosk. Anat. **52**. 1898. — ¹⁹⁾ *Langley* u. *Se-wall*, Journ. of Physiol. **2**. — ²⁰⁾ *Langley*, Journ. of physiol. **3**. — ²¹⁾ *Lehner*, Zeitschr. f. d. ges. Anat., Abt. I: Zeitschr. f. Anat. u. Entwicklungsgesch. **25**. 1923. — ²²⁾ *Mayer*, Zoomikrotechnik. Berlin 1920. — ²³⁾ *Müller*, Zeitschr. f. wiss. Zool. **64**. — ²⁴⁾ *Noll* und *Sokoloff*, Arch. f. Anat. u. Phys., Phys. Abt. 1905. — ²⁵⁾ *Nussbaum*, Arch. f. mikr. Anat. **21**. 1882. — ²⁶⁾ *Prenant*, Traité d'Histologie. T. II. Paris 1911. — ²⁷⁾ *Pirone*, Zeitschr. f. allg. Physiol. **4**. 1904. — ²⁸⁾ *Renaud*, Traité d'Histologie pratique. T. II. Paris 1899. — ²⁹⁾ *Rollett*, Unters. a. d. Inst. f. Physiol. u. Histol. in Graz 1871. — ³⁰⁾ *Romeis*, Taschenbuch der mikroskopischen Technik. 2. Aufl. 1924. — ³¹⁾ *Schaffer*, Lehrbuch der Histologie und Histogenese. 2. Aufl. Leipzig 1922. — ³²⁾ *Schmidt*, Mitt. a. d. Grenzgeb. d. Med. u. Chir. **22**. 1911. — ³³⁾ *Schmorl*, Die pathologisch-histologischen Untersuchungsmethoden. 10. u. 11. Aufl. Leipzig 1921. — ³⁴⁾ *Stöhr*, Lehrbuch der Histologie. Herausgeg. von v. Moellendorff 1922. — ³⁵⁾ *Strassmann*, Zentralbl. f. allg. Pathol. u. pathol. Anat. 1909. — ³⁶⁾ *Théohari*, Arch. f. mikr. Anat. **3**. 1899. — ³⁷⁾ *Umlauf* u. *Wissig*, Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **231**. 1921. — ³⁸⁾ *Zimmermann*, Arch. f. mikr. Anat. **52**. 1898.

*.) Nach dieser Methode angefertigte Präparate wurden auf der 35. Vers. d. Anat. Ges. in Wien 1925 und in der Sitzung der Vereinigung der patholog. Anatomen Wiens am 22. VI. 1925 vorgewiesen.