

(Aus der Abteilung für experimentelle Biologie. Anatomische Anstalt der Universität München.)

Zur Methodik der Fettfärbung mit Sudan III.

Von
B. Romeis.

(Eingegangen am 29. Oktober 1926.)

Vor kurzem erschienen an dieser Stelle die wertvollen Untersuchungen von *C. Kaufmann* und *E. Lehmann* über die in der histologischen Technik gebräuchlichen Fettdifferenzierungsmethoden. Die Verfasser kommen dabei unter anderem zu dem Ergebnis, daß die Sudanfärbung bei sämtlichen geprüften Fetten und Fettgemischen mit Ausnahme von zwei gesättigten Fettsäuren positiv ausfällt, so daß dieser Färbung für die färberische Darstellung von Fettstoffen und Fettgemischen im allgemeinen eine ganz überragende Bedeutung zuzusprechen ist. Weiterhin zeigte es sich, daß beim Arbeiten mit der gebräuchlichen 70proz. alkoholischen Sudanlösung an Reinsubstanzen ausgezeichnete Färbungen erhalten wurden, während die Färbung an Fettgemischen sehr oft versagte. Die Verfasser erbrachten den Nachweis, daß dies auf der lösenden Wirkung des 70proz. Alkohols beruhte. Wurde die Färbung mit einer Lösung des Farbstoffes in 40proz. Alkohol vorgenommen, so trat stark positive Reaktion ein. Es geht daraus hervor, daß der bei der Färbung zur Verwendung kommende 70proz. Alkohol für das Färbeergebnis durchaus nicht so harmlos ist, als man für gewöhnlich anzunehmen pflegt. Wie die Verfasser aber weiterhin mitteilen, haben ihre Versuche, die Färbung mit schwachprozentigen alkoholischen Lösungen nicht nur an den zu ihren Versuchen dienenden, mit bestimmten Fettstoffen getränkten Hollundermarkplättchen, sondern auch am Gewebschnitt auszuführen, unbefriedigende Ergebnisse gezeitigt.

Dieser Widerspruch in den Feststellungen der genannten Verfasser gab mir Veranlassung, die Brauchbarkeit schwachprozentiger alkoholischer Lösungen an Gewebschnitten zu untersuchen und ihre Leistung mit jener der bisher gebräuchlichen Lösungen zu vergleichen, für welche als Lösungsmittel durchgehends ein mindestens 60, meist 70 und 80proz. Alkohol vorgeschrieben ist. Der Entdecker der Methode, *Daddi*, empfiehlt „alcohole de commerce“, also vermutlich 70—80proz. Alkohol. *Michaelis* benutzt eine gesättigte Lösung des Farbstoffes in 60—70proz. Alkohol. *B. Fischer* verwendet eine gesättigte Lösung in 70proz. Alkohol; der

Alkohol wird in kochendem Zustand über den Farbstoff gegossen und die Lösung über Nacht im Brutschrank gehalten. *Herxheimer* steigert die Konzentration der Farblösung durch Zusatz von Natronlauge oder Aceton (absol. Alkohol 70,0; Wasser 10,0; 10proz. Natronlauge 20,0; oder Aceton 50,0; 70proz. Alkohol 50,0; Farbstoff bis zur Sättigung). Keine der gebräuchlichen Lösungen geht also unter einen 60proz. Alkohol herunter.

Die als Optimum angegebene Färbedauer schwankt je nach der Konzentration der Lösung. Nach *Daddi* soll sie nicht über 5—10 Minuten ausgedehnt werden. *Michaelis* färbt 15—30 Minuten. *B. Fischer* färbt nur 10—15 Minuten, doch ist nach seinen Erfahrungen auch bei längerer Einwirkung keine Auflösung von Fett zu befürchten. Er konnte selbst nach 8tägiger Färbedauer keine Abnahme bemerken. Eine nachfolgende Differenzierung in Alkohol wie sie *Daddi* anwendet, hält er nicht nur für unnötig, sondern sogar für schädlich, da sie die Stärke der Färbung sichtlich vermindert. In den von *Herxheimer* angegebenen Lösungen färbt man dagegen nur 2—3 Minuten und spült anschließend in 70proz. Alkohol kurz ab. Das letztere ist besonders bei Verwendung der NaOH-haltigen Farblösungen notwendig, da sonst auch das übrige Gewebe rötlich gefärbt bleibt.

Auf Grund der Befunde von *Kaufmann* und *Lehmann* untersuchte ich nun vor allem die Verwendbarkeit einer gesättigten Lösung von Sudan III in 40proz. Alkohol. Dieselbe wird in der Weise hergestellt, daß 0,1—0,2g des Farbstoffes (Marke *Grübler*, bezogen von *Dr. Hollborn*, Leipzig) in einem Erlenmeyerkölbchen mit 100 ccm 40proz. Alkohols übergossen werden und über der Flamme unter stetem Schütteln bis zum Sieden erhitzt werden, was in wenigen Minuten der Fall ist. Um ein Verdunsten des Alkohols zu verhüten, setzt man in die Öffnung des Kölbchens einen ganz lose sitzenden alten Glasstöpsel, an dem sich dann die Dämpfe kondensieren. Nach dem Erhitzen läßt man bei Zimmertemperatur langsam abkühlen. Nach einigen Stunden werden die zur Färbung benötigten 15—20 ccm in eine mit aufgeschliffenem Deckel versehenen Glasdose abfiltriert. Die gebrauchsfertige Farblösung ist nur hellorangegegelb gefärbt. Die Temperatur der Lösung soll nicht unter 15°C. herabsinken.

Bei den mit dieser Lösung vorgenommenen Färbeversuchen stellte sich bald heraus, daß sie bei Einhalten der bisher üblichen Färbezeiten nur unbrauchbare Ergebnisse zeitigt. Insofern haben also *Kaufmann* und *Lehmann* mit ihrem absprechenden Urteil völlig recht. Ganz anders wird jedoch das Ergebnis, wenn man die Färbedauer auf 24 Stunden verlängert. Das Ergebnis wird dadurch so sehr verbessert, daß ich die angegebene Änderung als zweckmäßig empfehlen möchte.

Die Vorzüge der Methode treten insbesondere dann zutage, wenn

es auf die Darstellung der feinsten Lipoidtröpfchen des Protoplasmas ankommt. Grobtropfiges Fett wird mit allen Methoden gut gefärbt; aber jene feinsten Tröpfchen, die sich z. B. in den Zellen der Schilddrüse oder anderer Inkretorgane finden, konnte ich mit keiner der anderen Sudanlösungen in dieser Vollständigkeit und Schärfe darstellen¹⁾.

Die von *Daddi* und *B. Fischer* angegebenen Lösungen lassen die Tröpfchen bei Einhalten der vorgeschlagenen Färbedauer nur schwach hervortreten. Aber auch eine Verlängerung der Färbedauer auf 24 Stunden verbesserte die Ergebnisse nicht, im Gegenteil fand ich einigemale die Zellipoide der Schilddrüsenzellen besonders in jugendlichen Organen nach 24 stündiger Einwirkung dieser Lösungen sogar schlechter gefärbt als nach 15 Minuten, ein Ergebnis, das sich nur so erklären läßt, daß bei dieser verlängerten Zeitdauer der 70proz. Alkohol der Farblösung zerstörend wirkte. Mit Rücksicht auf die Angabe *B. Fischers*, daß seine Lösung erst mit 6 Monaten volle Färbkraft bekommt, habe ich zum Vergleich auch Färbungen mit älteren Lösungen angestellt, ohne daß sich das Ergebnis geändert hätte. Im Gegenteil, bei ein bis mehrere Jahre alten Lösungen war sogar eine Abnahme der Färbekraft festzustellen, deren Ursache mir unbekannt ist.

Schärfer als Lösungen in 70proz. Alkohol färben die von *Herxheimer* angegebenen Modifikationen. Aber auch bei ihnen ist die Färbung nicht so vollständig wie bei einer 40proz. Lösung. Zudem besitzen beide Lösungen noch einige Nachteile. Die starke Alkalität der Natronlauge-Sudanlösung ist für zarte Präparate, wie mir z. B. Schrumpfungen am Kolloid der Schilddrüsenfollikel zeigten, nicht unschädlich, trotz des Alkoholgehaltes, der nach *Herxheimer* die Wirkung der Natronlauge unschädlich machen soll. Die Präparate wellen sich häufig recht stark. Sehr oft bleibt auch, zumal wenn man mit Rücksicht auf die feinsten Tröpfchen die Differenzierung im Alkohol möglichst abkürzt, das übrige Gewebe noch rötlich angefärbt. Unangenehm ist ferner die geringe Durchsichtigkeit der Lösung, die das Herausfischen der Schnitte erschwert.

Die letztgenannten Nachteile fehlen der mit Aceton versetzten Herxheimerschen Lösung, bei der auch eine Mitfärbung des Bindegewebes bei Einhalten der vorgeschriebenen Färbedauer nicht eintritt. Wenn es darauf ankommt, ein Präparat rasch zu färben, so ist diese acetonhaltige Lösung von allen die beste. Nachteilig ist, daß es in ihr leichter als in anderen Lösungen zum Ausfallen von Farbstoffkristallen kommt. Und auch sie bringt die feinen Lipoidtröpfchen nicht in der Vollständigkeit zur Darstellung wie die Lösung in 40proz. Alkohol.

¹⁾ Bei der mikroskopischen Untersuchung feinster, sudan gefärbter Tröpfchen arbeitet man am besten mit Tageslicht, das hiefür durch keine der künstlichen Lichtquellen, einschließlich des Punktlichtes, an Güte erreicht wird.

Abgesehen davon hat die Lösung in schwachprozentigem Alkohol noch den Vorteil, daß bei ihr weder ein Verlust von Fettstoffen, noch eine Überfärbung zu befürchten ist: es spielt keine Rolle, wenn der Schnitt einige Stunden länger in der Farblösung bleibt. Das Bindegewebe bleibt völlig ungefärbt. Die Anwendung irgend einer Differenzierungsflüssigkeit ist überflüssig; die bei der Übertragung der Schnitte aus der Farblösung im Wasser auftretende Diffusionswirkung ist schwächer als bei Verwendung höher prozentiger Lösungen.

Die Herstellung des Präparates gestaltet sich also in folgender Weise:

1. Schneiden des formolfixierten Materials auf dem Gefriermikrotom. Auffangen der Schnitte in Wasser oder 40proz. Alkohol.

2. Einlegen der Schnitte in eine gesättigte Lösung von Sudan III in 40proz. Alkohol für 24 Stunden.

3. Unmittelbares Übertragen in Wasser.

4. Kernfärbung in Hämalaun 10 Minuten.

5. Auswaschen in Wasser; Einlegen in Glycerin.

Nochmals möchte ich betonen: Grobtropfiges Fett bekommt man mit jeder der gebräuchlichen Sudan- oder Scharlachlösungen gefärbt, die feinen Lipoidtröpfchen der Drüsenzellen werden dagegen durch die angegebene Methode am vollständigsten und schärfsten dargestellt.

Literaturverzeichnis.

- Daddi*, Nouvelle méthode pour colorer la graisse dans les tissus. Arch. ital. de biol. **26**, 142—146. 1896. — *Fischer, B.*, Über die Fettfärbung mit Sudan III und Scharlach R. Zentralbl. f. Pathol. **13**, 943—946. 1902. — *Herxheimer, G.*, Über Fettfarbstoffe. Dtsch. med. Wochenschr. **17**, 607—609. 1901. — *Herxheimer, G.*, Bemerkungen zu dem Aufsatze des Herrn Dr. B. Fischer: „Über die Fettfärbung mit Sudan III und Scharlach R.“. Zentralbl. f. Pathol. **14**, 87—88. 1903. — *Kaufmann, C.*, und *E. Lehmann*, Sind die in der histologischen Technik gebräuchlichen Fettdifferenzierungsmethoden spezifisch? Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **261**, 623—648. 1926. — *Michaelis, L.*, Über Fettfarbstoffe. Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **164**, 263—270. 1901.